

# Myoklonická epilepsie a hluchota u sourozenců s mutací 7512T>C v genu pro mitochondriální tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> – kazuistiky

## Myoclonic Epilepsy and Deafness in Siblings with the 7512T>C Mutation in the Mitochondrial Encoded tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> Gene – Case Reports

### Souhrn

Mitochondriální choroby je různorodá skupina nemocí postihujících především nervovou soustavu, srdce a skeletální svalstvo. Kauzální mutace mitochondriálních onemocnění jsou přítomny jak v jaderné DNA (mendelovská dědičnost), tak v DNA mitochondriální (maternální dědičnost). Prezentujeme klinický průběh onemocnění spolu s výsledky biochemických a molekulárněgenetických vyšetření u sourozenců s mitochondriální chorobou na podkladě 7512T>C mutace v genu pro mitochondriální tRNA pro serin. Mutace se projevuje myoklonickou epilepsií, hluchotou, ataxií, kalcifikacemi v bazálních gangliích a snížením cytochrom c oxidázy. Informace by měly napomoci ke zpřesnění diagnózy u pacientů s tímto fenotypem.

### Abstract

Mitochondrial diseases are a very heterogeneous group of disorders affecting the nervous system, heart and skeletal muscle. The mutations are situated in nuclear DNA with Mendelian heredity and in mitochondrial DNA with maternal-type heredity. We describe a natural clinical course, the results of biochemical and molecular genetic measurements from two siblings with mitochondrial disorders due to mutation 7512T>C in the gene for mitochondrial tRNA for serine. The mutation is associated with myoclonic epilepsy, deafness, ataxia, calcification in the basal ganglia and decreased cytochrome c oxidase activity. The data should prove helpful in the exact diagnosis of patients with this phenotype.

### Poděkování

Práce vznikla za podpory grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR IGA MZČR NS 9782-4.

P. Ješina<sup>1</sup>, K. Vinšová<sup>1</sup>,  
O. Brantová<sup>1</sup>, M. Tesařová<sup>1</sup>,  
Z. Hájková<sup>1</sup>, H. Hansíková<sup>1</sup>,  
L. Wenchich<sup>1</sup>, T. Honzík<sup>1</sup>,  
M. Magner<sup>1</sup>, J. Zámečník<sup>2</sup>,  
P. Ryška<sup>3</sup>, J. Zeman<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika dětského a dorostového lékařství UK 1. LF a VFN v Praze

<sup>2</sup> Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2. LF a FN v Motole, Praha

<sup>3</sup> Radiologická klinika LF UK a FN Hradec Králové



**MUDr. RNDr. Pavel Ješina, Ph.D.**  
Klinika dětského a dorostového lékařství UK 1. LF a VFN v Praze  
Ke Karlovu 2  
128 08 Praha 2  
e-mail: paveljesina@seznam.cz

Přijato k recenzi: 18. 5. 2009

Přijato do tisku: 5. 10. 2009

### Klíčová slova

mitochondriální porucha – myoklonická epilepsie – hluchota – kalcifikace v bazálních gangliích – deficit cytochrom c oxidázy – transferová RNA

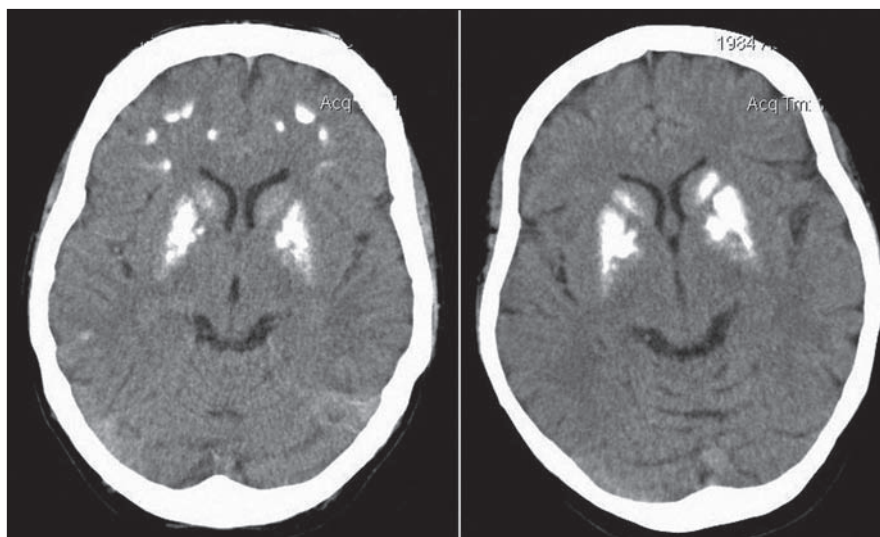
### Key words

mitochondrial disease – myoclonic epilepsy – deafness – calcification in basal ganglia – cytochrome c oxidase deficiency – transfer RNA

## Úvod

Mitochondriální choroby představují klinicky, biochemicky a geneticky heterogenní skupinu chorob spojených s postižením systému oxidativní fosforylace (OXPHOS) a pyruvátdehydrogenázy, často označované jako mitochondriální encefalomyopatie. Nervová soustava, zejména mozek, dále pak srdce a skeletální svalstvo, jsou tkáně s vysokými energetickými nároky, čímž představují nejpostiženější systémy. Mitochondriální choroby jsou řazeny mezi nejčastější dědičná metabolická onemocnění, jejich frekvence je v současné době udávána přibližně 1 : 3 500–1 : 4 000. K růstu incidence dochází díky zpřesňujícím diagnostickým metodám a v jejich důsledku včasné a exaktní diagnostice. Jedná se o závažná, nevléčitelná, často fatální onemocnění, postihující jak dětskou, tak i dospělou populaci. Geneticky jsou mitochondriální choroby značně komplikované, protože patogenní mutace mohou být jak v jaderné DNA (nDNA) s mendelovským typem dědičnosti, tak v DNA mitochondriální (mtDNA) s typem dědičnosti maternálním [1].

V buňkách je mtDNA přítomna v tisících kopiích. Podle podílu mutovaných a nemutovaných mtDNA určujeme hladinu heteroplazmie. MtDNA kóduje 13 polypeptidových podjednotek komplexů dýchacího řetězce, dvě ribozomální RNA (rRNA) a 22 transferových RNA (tRNA). Více než 60 % všech bodových mutací v mtDNA postihuje právě tRNA, což představuje více než 100 dosud popsáných patologických mutací. Častěji jsou přítomny mutace v tRNA pro leucin (UUR), izoleucin, lysin a serin (UCN). Tyto mutace jsou obvykle spojeny s neurosenzorickým postižením, zahrnujícím myoklonickou epilepsii, senzoryneurální hluchotu a/nebo cerebelární symptomy. Mezi nejznámější patří klinické jednotky známé jako myoklonická epilepsie s „ragged red“ vlákny (MERRF) a mitochondriální encefalopatie s laktátovou acidózou a „stroke-like“ atakami (MELAS), které jsou nejčastěji zapříčiněny mutacemi v tRNA pro lysin (tRNA<sup>Lys</sup>), resp. leucin (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>). Podobné klinické symptomy byly však popsány i u dalších bodových mutací v mtDNA, a to jak v genech pro tRNA, tak i pro podjednotky komplexů dýchacího řetězce [2]. Bylo identifikováno i několik dalších mutací v tRNA pro serin (tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>). V rodinách nesoucích některé z těchto mutací



**Obr. 1.** Nativní vyšetření CT mozku. Oboustranné kalcifikace v bazálních gangliích (nucleus caudatus, putamen) a talamu. Dále jsou patrné vícečetné kalcifikace v bílé hmotě frontálních a parietálních laloků.

byly pozorovány syndromové nebo nesyndromové typy hluchoty jako hlavní patofyziologické příznaky [3].

V textu je dokumentován případ první rodiny z České republiky, ve které se podařilo prokázat vzácnou mutaci 7512T>C v genu pro tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> v mtDNA. Tato mutace byla publikována u pacientů s myoklonickou epilepsií, hluchotou, ataxií a kalcifikacemi v bazálních gangliích [4]. Předkládáme souhrnný klinický popis průběhu onemocnění a výsledků biochemického vyšetření funkce OXPHOS včetně molekulárněgenetických analýz u dvou pacientů s touto mutací s cílem rozšířit diferenciálně diagnostickou rozvahu u pacientů s obdobným fenotypem.

## Kazuistika 1

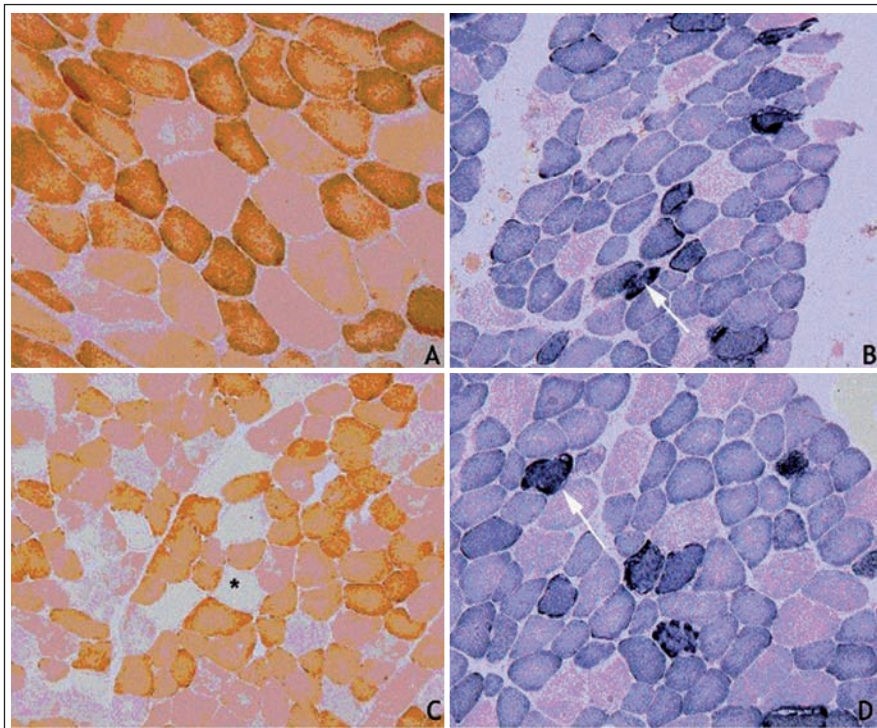
Proband 1 je 29letý muž, starší ze dvou sourozenců s anamnézou myoklonické epilepsie a hluchoty. Rodiče probanda jsou nepřibuzní a zdraví. Peri- a postnatální data jsou fyziologická. V dětství se projevila porucha sluchu, která je nyní charakterizována jako bilaterální percepční hypakuzie s 84% ztrátou sluchu podle Fowlera. Částečně je korigována pomocí naslouchadel. Ve věku 21 let se objevily první myoklonické záchvaty. Generalizované tonicko-klonické křeče byly pozorovány o dva roky později. Na EEG záznamech byly opakovaně popisovány atypické komplexy hrot-vlna ve fronto-temporo-parietální oblasti oboustranně. Byla zahájena léčba valproátem, která měla zpočátku dobrý

efekt. Pro nakušení záchvatů terapie změněna na lamotrigin (celková denní dávka 150 mg). Nyní jsou myoklonické záchvaty končetin pozorovány denně, zejména po ránu. V neurologickém vyšetření je přítomen nálezh frustního paleocerebelárního syndromu. CT vyšetření mozku prokázalo oboustranné kalcifikace v oblasti nucleus caudatus, putamen a v talamu. Kromě toho byly nalezeny vícečetné hrudkovité kalcifikace v bílé hmotě frontálních a parietálních laloků (obr. 1). Vyšetření očního pozadí ani perimetru neprokázala patologické změny. V základních laboratorních testech dominuje nálezh elevace CK (max. 49  $\mu$ kat/l; norma do 3,8), myoglobinu (1900  $\mu$ g/l; norma do 92) a přechodně zvýšení ALT (max. 1,4  $\mu$ kat/l; norma do 0,8) a AST (max. 2,1  $\mu$ kat/l; norma do 0,7). Intermitentně byla zachycena hyperlaktacidurie (max. 157 mM/mol kreatininu; norma do 30) a elevace alaninu v séru (max. 816  $\mu$ mol/l; norma do 500). Měření enzymové aktivity komplexů dýchacího řetězce ukázalo lehce sníženou aktivitu cytochrom c oxidázy (COX; komplex IV systému OXPHOS) v kožních fibroblastech (obr. 3a). Proto bylo indikováno provedení svalové biopsie, která prokázala snížení jak hladiny aktivity COX (snížení na 20 % kontrolních hodnot), tak i ATP syntázy (30 % kontrolních hodnot). Detekována byla i volná F<sub>1</sub>-část ATP syntázy. Obsah ostatních komplexů OXPHOS nebyla změněna v porovnání s kontrolou (obr. 3b). Histochemické vyšetření svalové

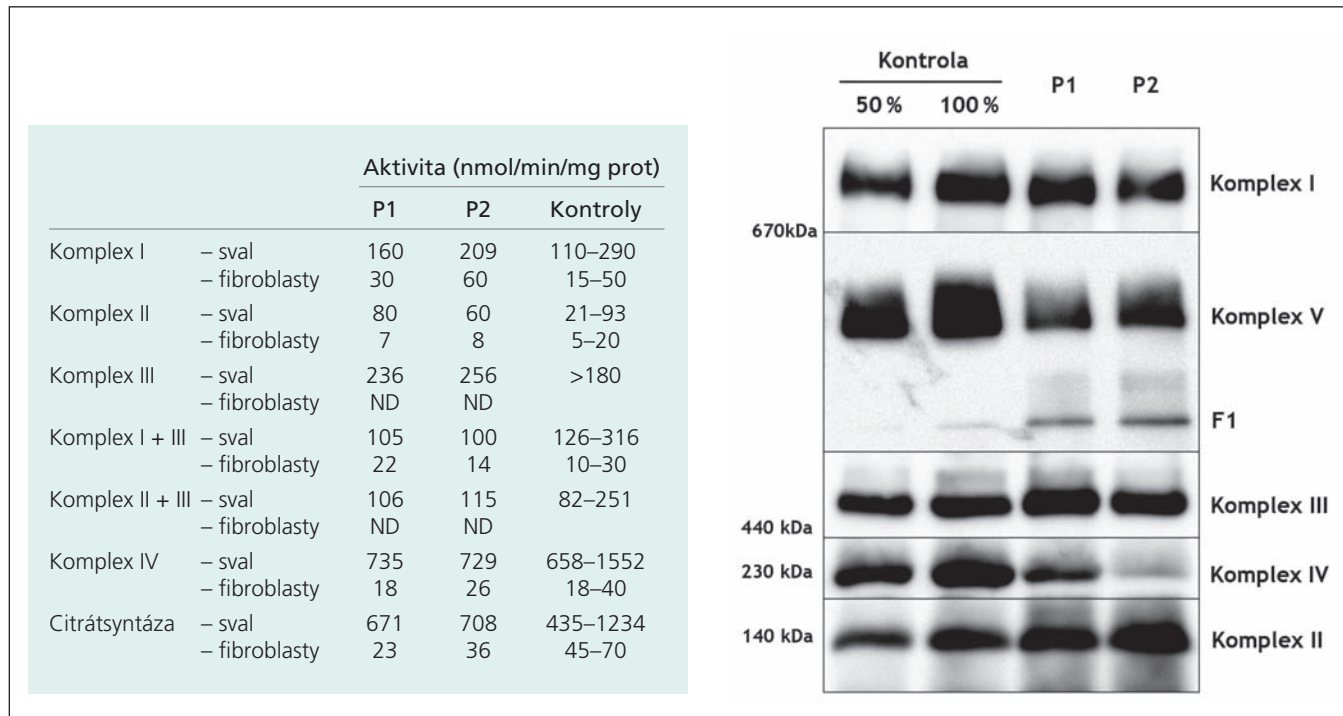
biopsie prokázalo u pacienta přítomnost četných „ragged-red“ vláken (obr. 2b) a kromě toho byla detekována SDH (sukcinát-dehydrogenáza, komplex II) pozitivita cév, což jsou nálezy svědčící pro mitochondriální onemocnění. Ve vzorcích byla pozorována vlákna se sníženou aktivitou COX (obr. 2a). Při pátrání po genetické příčině pacientova fenotypu byla provedena molekulárně-genetická analýza v různých tkáních (kožní fibroblasty a sval), která neprokázala větší delece mtDNA, ani prevalentní mutace pro MERRF (8344A>G) a MELAS (3243A>G). Při sekvenování mtDNA byla nalezena mutace 7512T>C v tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, která byla potvrzena i pomocí PCR-RFLP. V dostupných tkáních (krev, kožní fibroblasty, sval) byla stanovena hladina heteroplazmie (91–95 %) dané mutace (obr. 4).

**Kazuistika 2**

Proband 2 je 24letá žena, sestra pacienta 1, s normální peri- a postnatální anamnézou. Ve věku 5 let podstoupila bez komplikací kardiologický zákrok pro defekt septa síní. Přibližně od 12 let věku začala hůře slyšet a následně byla proká-

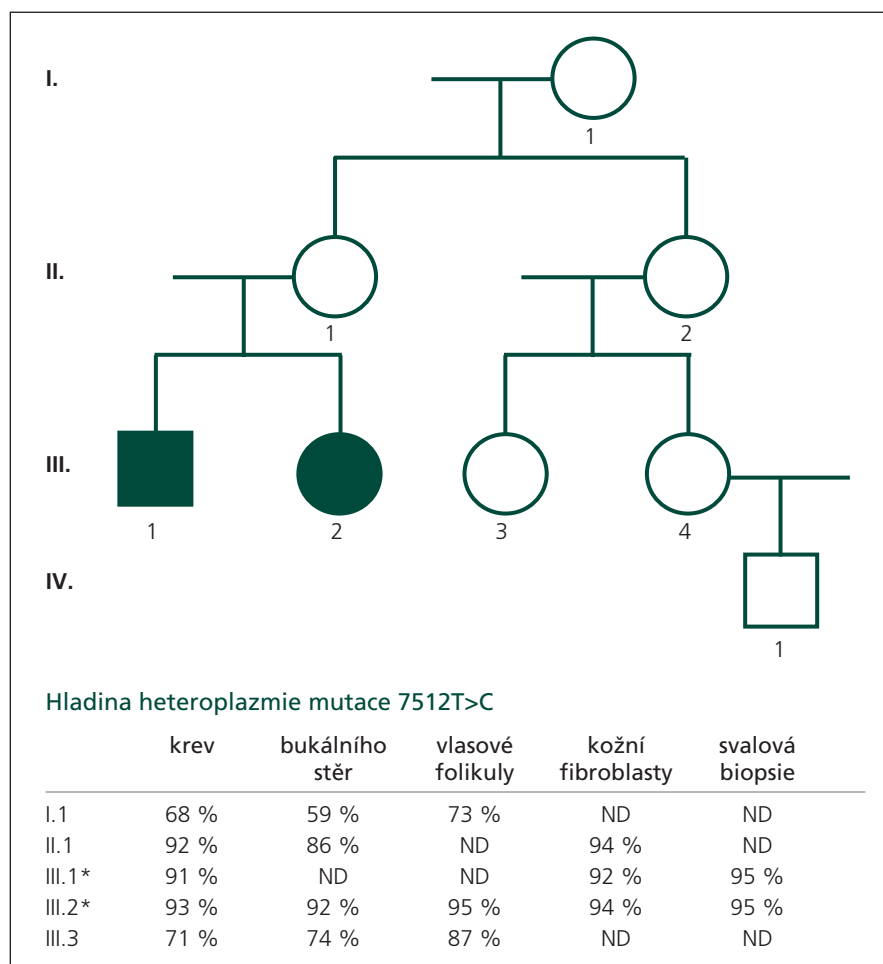


Obr. 2. Histochemické vyšetření vzorku svalové ukázalo přítomnost četných vláken se sníženou aktivitou COX u pacienta 1 (a), řady COX negativní vláken u pacientky 2 (c, \*). U obou pacientů byla zachycena četná „ragged-red“ vlákna (b, d, bílá šipka).



Obr. 3. Specifické enzymové aktivity ve svaly a kulturách kožních fibroblastů, kde byla změřena hraniční hodnota komplexu I + III ve svaly u pacienta 1 (P1) a 2 (P2) (a).

Analýza rovnovážného množství komplexů OXPHOS ve vzorcích svalových biopsií u obou pacientů, kde je prokázán signifikantní pokles množství komplexu IV (cytochrom c oxidázy) a mírné snížení množství komplexu V (ATP syntázy) a přítomnost aditivních bandů odpovídající F<sub>1</sub>-části (b).



Obr. 4. Rodokmen. Mutace 7512T>C byla detekována u obou probandů (III.1., III.2), u jejich matky (II.1), babičky (I.1) a sestřence (III.3).

zána oboustranná percepční hypakuzie (ztráta dle Fowlera 66 %), která je nyní korigována naslouchadly. Ve věku 19 let se začaly objevovat první neurologické obtíže – myoklonické záškuby s ranním maximem, pacientce začaly vypadávat předměty z rukou, navíc udávala cefaleu. EEG záznam prokázal četné epizody nepravidelných generalizovaných hrot-vlna komplexů. Byla zahájena terapie valproátem, po kterém došlo ke zlepšení stavu. V současné době je převáděna na lamotrigin z důvodu negativního účinku valproátu na beta-oxidaci mastných kyselin v mitochondriích a hladinu karnitinu a pro jeho hepatotoxické účinky. Generalizované záchvaty u této pacientky pozorovány nebyly. V neurologickém nálezu je popisována frustrní paleocerebelární symptomatika a divergentní strabismus. Kardiologické vyšetření (ECHO, EKG) nesevčí pro kardiomyopatii. Zobrazovací metody (MR a CT) prokázaly výrazné kalcifikace

v bazálních gangliích oboustranně v nucleus caudatus a putamen a také v talamu (obr. 1b). Dále byly nalezeny ojedinělé drobné kalcifikace v levé mozečkové hemisféře. V základních laboratorních vyšetřeních je přítomna elevace kreatinkinázy (max. 22  $\mu$ kat/l; norma do 2,5), myoglobinu (830  $\mu$ g/l; norma do 76) a transamináz ALT (max. 1,35  $\mu$ kat/l; norma do 0,8) a AST (max. 2,15  $\mu$ kat/l; norma do 0,7) v séru. Opakovaně byla nalezena hyperlaktacidurie (max. 2355 mM/mol kreatininu; norma do 30) a elevace alaninu v séru (max. 1 382  $\mu$ mol/l; norma do 500). Elektroforetická analýza vzorků bioptovaného svalu prokázala obdobný nálezu jako u bratra. V histologickém nálezu byla potvrzena četná „ragged-red“ vlákna, přítomnost SDH pozitivní cév a vlákna COX negativní (obr. 2c, d). Obdobně jako v případě jejího staršího bratra byla provedena molekulárněgenetická analýza, která pomocí PCR-RFLP proká-

zala mutaci 7512T>C, a byla stanovena hladina heteroplazmie (92–95 %) v dostupných tkáních – krev, kožní fibroblasty a sval (obr. 4).

### Diskuze

Představujeme první rodinu v České republice, u které byla jako kauzální příčina onemocnění sekvenací potvrzena mutace (substituce T za C) v mitochondriálním genu pro tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> na pozici 7512. Ve všech dosud popsáných případech [4] jsou hlavními příznaky tohoto mtDNA defektu myoklonická epilepsie, hluchota, ataxie a kalcifikace v bazálních gangliích.

Mutace 7512T>C narušuje vysoce konzervovaný pár bazí (vazba G-U) v aminoakceptorovém raménku tRNA pro serin. To pravděpodobně vede ke snížení jeho stability a postihuje funkci tRNA [5]. Dochází ke snížení syntézy mitochondriálně kódovaných polypeptidů a následně k defektům respirace v mitochondriích. Podle našich elektroforetických analýz dochází i ke strukturálnímu poškození mitochondriální ATP syntázy. Možným vysvětlením je fakt, že její dvě podjednotky jsou kódovány právě mtDNA. Následkem snížené aktivity COX a strukturálních změn ATP syntázy dochází k poklesu produkce ATP v buňce, a to zejména v energeticky náročných tkáních, mezi které patří mimo jiné i kochleární buňky (vláskové buňky nebo stria vascularis), vedoucí k rozvoji hluchoty [6].

Z genetického hlediska je důležité, že mtDNA je předávána další generaci matkou (maternální dědičnost). Mitochondrie spermie jsou umístěny v bičiku, který neproniká do oocyty, a tím není mtDNA od otce předávána na potomky. Díky mitotické a meiotické segregaci nacházíme v různých tkáních pacientů odlišnou hladinu heteroplazmie. Procesy během segregace mohou vést k situaci, kdy dceřinná buňka může nést více nebo méně mutantních mtDNA než buňka mateřská. Je známo, že ve vertikální linii dochází ke zvyšování heteroplazmie (tedy ke zvyšování počtu buněk s mtDNA nesoucí mutací). To souvisí s existencí tzv. prahového efektu („thresholdu“), kdy je pro manifestaci dysfunkce nutné, aby byl překročen určitý poměr mitochondrií s mutantní mtDNA (ve většině případů více než 90 %) [7]. Dosud publikované práce zabývající se pacienty s patologickými mutacemi v tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> uvádějí většinou stu-

peň heteroplazmie mutované mtDNA vyšší než 95 %. Vyšší „threshold“ se zdá být příčinou fenotypových projevů onemocnění, což u naší rodiny dokumentuje rodokmen s uvedenými stupni heteroplazmie v jednotlivých tkáních jak u probandů, tak u asymptomatických maternálních příbuzných (obr. 4). V průběhu života dochází ke změnám v množství mtDNA molekul v řadě tkání. Tím se také může měnit hladina heteroplazmie mutace. Problémem proto zůstává možnost prenatální diagnostiky mitochondriálních onemocnění způsobenými mutacemi v mtDNA. Zatím je dostupná pouze diagnostika v rodinách s generalizovaným typem onemocnění s mendelovským typem dědičnosti.

Do poruch spojených s „nesyndromovou hluchotou“ je zapojeno více než 50 nukleárních genů. Předchozí studie ukázaly [8], že více než 5 % všech případů hluchoty je zapříčiněno mutacemi v mtDNA (cca > 45 mutací), což představuje jednu z nejvíce frekventovaných genetických příčin hluchoty. Předpokládá se, že funkce buněk kochley jsou více náchylné ke změnám v processingu nebo translaci způsobené mutacemi v mitochondriální tRNA nebo rRNA [9].

Mezi základní projevy mutace 7512T>C patří vedle hluchoty a epilepsie kalcifikace v bazálních gangliích (obr. 1). Řada symptomů spojených s mitochondriálními chorobami (např. Kearns-Sayreův syndrom; mutace 7480A>G v genu pro tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>) se obecně projevuje kalcifikacemi v CNS, především v bazálních gangliích [10]. Vedle kalcifikací v bazálních gangliích, které jsou zmiňovány ve všech případech pacientů s touto mutací,

jsou uváděny kalcifikace i v jiných částech mozku, zejména v mozečku [8]. V diferenciálně diagnostické rozvaze je třeba vyloučit další příčiny kalcifikací, zejména hypoparatyreózu, případně pseudohypoparatyreózu. Méně pravděpodobně přichází v úvahu renální insuficience, stav po intoxikaci CO, kalcifikace v tumorech nebo po infekcích, manifestující se většinou odlišnými anamnestickými údaji a jiným klinickým průběhem. Mezi další příčiny mohou patřit Cockayneův syndrom, Fahrůva choroba (familiární cerebrovaskulární ferrokalcinóza) a Aicardi-Goutièresův syndrom.

Klinický průběh většinou multisystémového onemocnění s familiárním výskytem a elevací laktátu vede lékaře k podezření na mitochondriální etiologii onemocnění. S rostoucím množstvím nově popsanych mitochondriálních poruch na molekulární bázi se však přesně cílená genetická diagnostika stává komplikovanější. Pacienti s fenotypem myoklonické epilepsie, hluchoty, ataxie, deficiencie COX a kalcifikacemi v bazálních gangliích, spojené s maternální dědičností, by měli být vyšetřeni na přítomnost mutace v genu pro tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, především mutaci 7512T>C. Diagnostika mitochondriálních poruch je v České republice dostupná na našem pracovišti, v mitochondriální laboratoři Kliniky dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze.

#### Seznam zkratk

ATP	adenosintrifosfát
COX	cytochrom c oxidáza
MELAS	mitochondriální encefalopatie s laktátovou acidózou a stroke-like ataky
MERRF	myoklonická epilepsie s „ragged red“ vlákny

mtDNA	mitochondriální DNA
nDNA	nukleární DNA
OXPPOS	systém oxidativní fosforylace
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus v délce restričních fragmentů
rRNA	ribozomální RNA
tRNA	transferová RNA

#### Literatura

- DiMauro S. Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659(2–3): 107–114.
- Schoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Siebel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu</sup> mutation. *Cell* 1990; 61(6): 931–937.
- Toompuu M, Levinger LL, Nadal A, Gomez J, Jacobs HT. The 7472insC mtDNA mutation impairs 5' and 3' processing of tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322 (3): 803–813.
- Nakanuta M, Nakano S, Goto Y, Ozawa M, Nagahama Y, Fukuyama H et al. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214(1): 86–93.
- Chomyn A, Enriquez JA, Micol V, Fernandez-Silva P, Attardi G. The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA<sup>Leu(UCN)</sup> mutation cause aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J Biol Chem* 2000; 275(25): 19198–19209.
- Guan MX, Enriquez JA, Fischer-Ghodsian N, Puranam R, Lin CP, Marion MA et al. The deafness-associated mtDNA 7445 mutation, which affects tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase ND6 subunit gene expression. *Mol Cell Biol* 1998; 18(10): 5668–5879.
- Goto YI, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalopathies. *Nature* 1990; 348(6302): 651–653.
- Jacobs HT, Hutchin TP, Käppi T, Gillies G, Minkkinen K, Walker J et al. Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(1): 26–33.
- Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *Clin Genet* 2007; 71(5): 379–391.
- Muñoz A, Mates F, Simon R, Garcia-Silva MT, Cabello S, Arenas J. Mitochondrial diseases in children: neuroradiological and clinical features in 17 patients. *Neuroradiology* 1999; 41(12): 920–928.

[www.urologickelisty.cz](http://www.urologickelisty.cz)