

Síndrome de Holt-Oram: caracterización de una nueva mutación

L. Fernández García-Moya^a, P. Lapunzina Badía^a, A. Delicado Navarro^a, A. Sharif^b, G. Cross^b, M.^aA. Mori Álvarez^a, M.^aL. de Torres Perezhidalgo^a, M. Palomares Bralo^a, P. García Sánchez^c, L. García-Guereta Silva^d e I. López Pajares^a

^aServicio de Genética Médica. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España. ^bDepartment of Molecular Genetics. Centre for Medical Genetics. Nottingham City Hospital. Nottingham. United Kingdom. ^cServicios de Neonatología y ^dCardiología Infantil. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.

Introducción

Los síndromes cardiomiélicos comprenden cardiopatías congénitas y malformaciones esqueléticas de los miembros superiores, y están relacionados con mutaciones deletéreas de factores de transcripción con dominios del tipo T-Box. El síndrome de Holt-Oram se debe a una mutación dominante en el gen *TBX5* que altera la estructura tridimensional de la proteína impidiendo su correcta unión al ADN. Se han descrito varias mutaciones puntuales y deleciones de *TBX5* en pacientes con fenotipo de síndrome de Holt-Oram.

Pacientes y métodos

El paciente es un niño con una comunicación interauricular (CIA) del tipo *ostium secundum* grande y una comunicación interventricular (CIV) diagnosticados por clínica (soplo) y ecocardiografía. Presenta además unos dedos pulgares algo hipoplásicos y con un emplazamiento distal bilateral, con un índice de implantación de 0,19 frente a una media normal de 0,50 para su edad gestacional al nacer. Es remitido a la consulta de Genética para descartar microdeleción 22q11.2.

Resultados

El cariotipo y la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) con sonda D22S75 resultaron normales y debido a los hallazgos clínicos se realizó un estudio molecular para el síndrome de Holt-Oram. Se encontró una mutación en el intrón 7 de *TBX5* que produce una probable alteración del *splicing* del gen que da lugar a una proteína truncada en su extremo C-terminal. Los padres del propósito presentan una secuencia normal para el gen, lo que indica que la mutación se produjo *de novo*, sin que pueda descartarse un mosaicismo germinal en los padres.

Conclusiones

El síndrome de Holt-Oram es la causa más frecuente de síndrome cardiomiélico. Debería ser objeto de estudio molecular todo niño con malformaciones cardíacas y alteraciones de las extremidades superiores como pulgares ausentes, hipoplásicos, distalmente emplazados o trifalángicos.

Palabras clave:

Síndrome de Holt-Oram. Cardiopatías congénitas. Malformaciones esqueléticas. TBX5.

HOLT-ORAM SYNDROME: CHARACTERIZATION OF A NOVEL MUTATION

Introduction

Cardiomyelic syndromes encompass congenital heart disease and skeletal malformations of the upper limbs and are related to mutations in transcription factors with T-Box domains. Holt-Oram syndrome is caused by a dominant mutation in the *TBX5* gene that alters the three-dimensional structure of the protein and its DNA binding function. Several point mutations and deletions in *TBX5* have been reported in patients with the Holt-Oram syndrome phenotype.

Patients and methods

The proband was a boy with a large atrial septal defect ostium secundum type and a ventricular septal defect, diagnosed by clinical findings (heart murmur) and echocardiography. He also presented slightly hypoplastic thumbs with distal bilateral placement and an implantation index of 0.19 (compared with an average of 0.50 for his gestational age at birth). The boy was referred to the depart-

Correspondencia: L. Fernández García-Moya.
Servicio de Genética Médica. Hospital Universitario La Paz.
Pº de la Castellana, 261. 28046 Madrid. España.
Correo electrónico: lfernandez.hulp@salud.madrid.org

Recibido en octubre de 2005.

Aceptado para su publicación en febrero de 2006.

ment of medical genetics to rule out 22q11.2 microdeletion syndrome.

Results

Karyotype and fluorescence *in situ* hybridization at locus D22S75 were both normal. Because of his clinical findings, molecular study for Holt-Oram syndrome was indicated, leading to the finding of a mutation at intron 7 of *TBX5*, probably producing a splicing alteration of the gene and resulting in a protein truncated at its C-terminal end. The proband's parents presented the wild type sequence of the gene, thus indicating that the mutation was produced *de novo*, although a possible germinal mosaicism in the parents could not be ruled out.

Conclusions

Holt-Oram syndrome is the most frequent cause of cardiomyelic syndrome. All children with heart malformations and abnormalities of the upper limbs such as absent, hypoplastic, distally placed or triphalangeic thumbs should undergo molecular studies for this syndrome.

Key words:

Holt-Oram syndrome. Congenital heart disease. Skeletal malformations. *TBX5*.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Holt-Oram o displasia atriodigital (MIM 142900) es una asociación de malformaciones cardíacas y defectos óseos que afectan a las extremidades superiores. Fue inicialmente descrito en 1960 por Holt y Oram a propósito de una familia con una comunicación interauricular (CIA) y pulgares distalmente emplazados¹. Se trata de una enfermedad rara, con una frecuencia de uno por cada 100.000 recién nacidos.

Se estima que todos los individuos afectados nacen con malformaciones esqueléticas bilaterales, si bien en muchos casos el lado izquierdo está más gravemente afectado. De éstas, la más frecuente es la ausencia de pulgares (43%), seguida de radio hipoplásico (41%), pulgares hipoplásicos (39%), ausencia de radio (23%) y pulgares trifalángicos (18%) o normales (16%). Las cardiopatías congénitas se observan en el 95% de los pacientes; predomina la CIA (34%) y la comunicación interventricular (CIV) (25%)².

El síndrome de Holt-Oram presenta una herencia autosómica dominante. En 1996 se identificó como responsable el gen *TBX5*, localizado en la región cromosómica 12q24.1 como ya se había sugerido anteriormente, sin que pueda descartarse una posible heterogeneidad de locus^{3,4}. *TBX5* es un gen de 47 kb que consta de 9 exones y presenta el 97% de homología con el correspondiente *Tbx5* de ratón. La proteína resultante tiene 518 aminoácidos y contiene un dominio T-Box de unión al ADN entre los exones 3 y 7, formado por 180 aminoácidos⁵. Esta secuencia es crucial para el funcionamiento de la proteína, que está implicada en la transducción de señales durante el desarrollo. Se han descrito alrededor de 50 mutacio-

nes concretas diferentes y deleciones en *TBX5*, que causan el síndrome de Holt-Oram por haploinsuficiencia del producto^{3,7,9-12}. Estas variaciones pueden inactivar la función de *TBX5* al alterar la estructura tridimensional de la proteína o al generar péptidos truncados.

PACIENTES Y MÉTODOS

El paciente es el primer hijo de una madre de 35 años, que nació a las 39 semanas mediante una cesárea por desproporción tras una amenaza de parto prematuro. El Apgar fue de 9/10, el peso de 3.475 g (P₅₀₋₇₅), la talla 51 cm (P₅₀₋₇₅) y el perímetro cefálico 34 cm (P₂₅). Se le detectó un soplo con taquicardia paroxística supraventricular. Por ecocardiografía se identificó una CIA del tipo *ostium secundum* grande, drenaje de vena cava superior izquierda en seno coronario, CIV pequeña y arteria subclavia derecha aberrante.

Al mes de vida fue remitido a la consulta de genética médica para descartar síndrome de microdeleción 22q11.2. El paciente impresionaba clínicamente por síndrome de Holt-Oram: destacaban unos pulgares distalmente emplazados y con una ligera hipoplasia, una distancia intermamilar de 10,5 cm (> P₉₇) y unos pliegues palmares y plantares anómalos. El índice de emplazamiento del pulgar, que se estima en el 50,5% para un recién nacido de 39 semanas⁸, en nuestro paciente era de sólo del 19% (fig. 1).

Se extrajeron muestras de sangre del paciente para cultivo de linfocitos y extracción de ADN. Los procedimientos utilizados en todo momento fueron realizados tras la obtención de un consentimiento informado de los padres.

RESULTADOS

El cariotipo y la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) para descartar síndrome de microdeleción 22q11.2 (sonda D22S75; Vysis, Inc, 3100 Woodcreek Drive, Downers Grove, Illinois 60515-5400 Estados Unidos) resultaron normales.

El estudio mutacional de *TBX5* por DHPLC detectó un heterodúplex y por secuenciación del fragmento se observó un cambio de base G > A en el intrón 7, a la altura del nucleótido 756 (IVS7-1G > A). Esta mutación afectaría al *splicing* del gen, por lo que se genera un péptido interrumpido a la altura del extremo C-terminal y, por tanto, disfuncional. En la secuencia, se observa en dicha posición una heterocigosis correspondiente al alelo normal y al alelo mutado (fig. 2).

El estudio fue realizado posteriormente a los padres y en ambos se observaron secuencias normales para los dos alelos, por lo que confirmaba el origen *de novo* de la mutación. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de un mosaicismo germinal en alguno de los padres. En ese caso, habría que contar con un riesgo de recurrencia en futuros embarazos mayor que el de la población general.

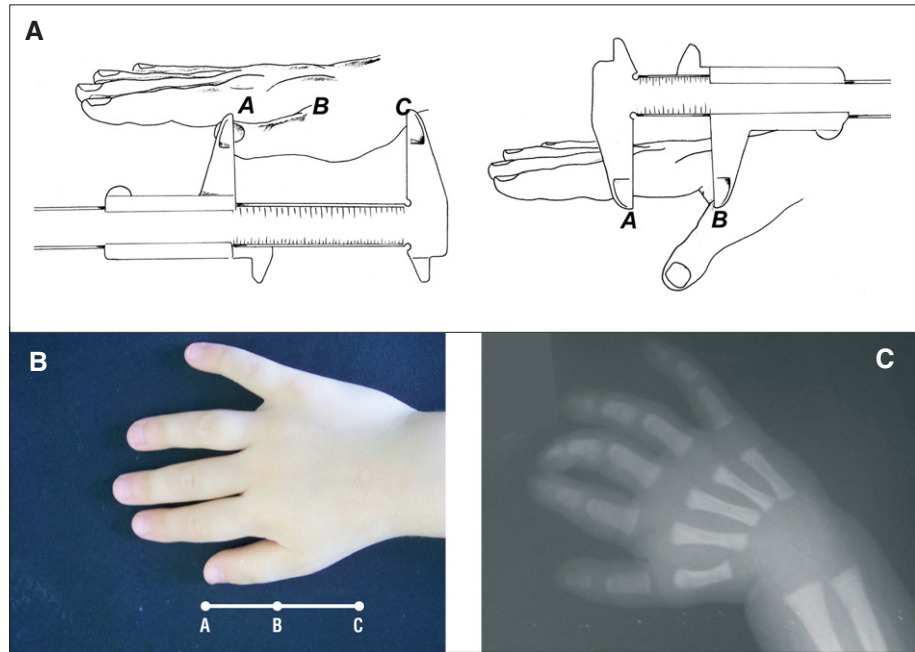


Figura 1. **A)** Índice de emplazamiento del pulgar. Se calcula mediante el cociente de distancias AB/AC. **B)** Medición de las distancias AB y AC en el paciente. **C)** Radiografía de la mano del paciente que muestra el emplazamiento distal del pulgar.

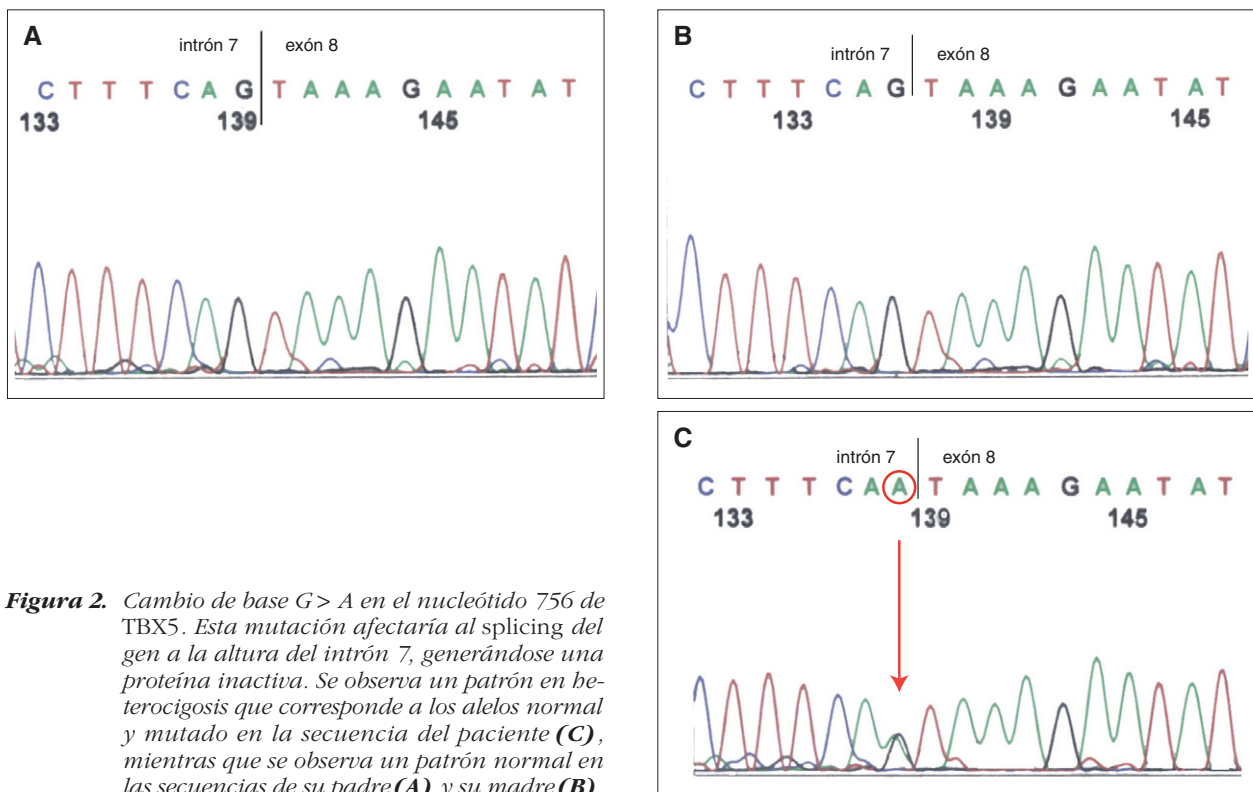


Figura 2. Cambio de base G > A en el nucleótido 756 de *TBX5*. Esta mutación afectaría al splicing del gen a la altura del intrón 7, generándose una proteína inactiva. Se observa un patrón en heterocigosis que corresponde a los alelos normal y mutado en la secuencia del paciente (**C**), mientras que se observa un patrón normal en las secuencias de su padre (**A**) y su madre (**B**).

DISCUSIÓN

Se han descrito 55 alteraciones en *TBX5* en pacientes con fenotipo de síndrome de Holt-Oram (tabla 1), aunque se ha argumentado que la tasa de detección del síndrome no supera el 35% con las técnicas ac-

tuales de análisis (SSCP, DHPLC)^{9,12}. Aproximadamente el 17% de las mutaciones descritas en *TBX5* son somáticas, y se encuentran sólo en el tejido cardíaco causando principalmente comunicaciones interauriculares o auriculoventriculares en pacientes sin malfor-

TABLA 1. Mutaciones descritas en *TBX5*

Tipo	Mutación	Localización	Referencia	
Inserción/delección de una o varias bases	<i>Frameshift</i> (con desplazamiento del marco de lectura)	100delG	Exón 2	Brassington et al 2003
		100_101insG	Exón 2	Brassington et al 2003
		246delGinsAA	Exón 4	Basson et al 1999
		280delC	Exón 4	Heinritz et al 2005
		400_401insC	Exón 5	Brassington et al 2003
		416delC	Exón 5	Yang et al 2000
		420_432del13pb	Exón 5	Basson et al 1999
		426_427insC	Exón 5	Brassington et al 2003
		456delC	Exón 5	Brassington et al 2003
		467_468insA	Exón 5	Heinritz et al 2005
		484_529ins46pb (439_484dup)	Exón 5	Heinritz et al 2005
		593_594insA	Exón 6	Li et al 1997
		727delG	Exón 7	Basson et al 1999
		798delA	Exón 8	Brassington et al 2003
		805delT	Exón 8	Cross et al 2000
		1159_1160insA	Exón 9	Li et al 1997
		1333delC	Exón 9	Sin publicar
<i>In-frame</i> (sin desplazamiento)	376_402del27pb	Exón 5	Fan et al 2003	
Cambios de base	Sin sentido	G192A	Exón 3	Fan et al 2003
		G205T	Exón 3	Basson et al 1997
		C408A	Exón 5	Gruenauer-Kloevekorn & Froster 2003
		G568T	Exón 6	Cross et al 2000
		C587A	Exón 6	Li et al 1997
		C835T	Exón 8	Li et al 1997
		G946T	Exón 8	Cross et al 2000
		C1084T	Exón 9	Heinritz et al 2005
	Antisentido	C145A	Exón 2	Yang et al 2000
		T161C	Exón 3	Yang et al 2000
		T161C (tejido cardíaco)	Exón 3	Reamon-Buettner & Borlak 2004
		C236T (tejido cardíaco)	Exón 3	Reamon-Buettner & Borlak 2004
		G238A	Exón 3	Basson et al 1999
		C287T (tejido cardíaco)	Exón 4	Reamon-Buettner & Borlak 2004
		A299G (tejido cardíaco)	Exón 4	Reamon-Buettner & Borlak 2004
<i>Splicing</i>	T305C (tejido cardíaco)	Exón 4	Reamon-Buettner & Borlak 2004	
	T361G	Exón 4	Brassington et al 2003	
	C400T (tejido cardíaco)	Exón 5	Reamon-Buettner & Borlak 2004	
	C431T (tejido cardíaco)	Exón 5	Reamon-Buettner & Borlak 2004	
	G505A	Exón 5	Cross et al 2000	
	G584C	Exón 6	Brassington et al 2003	
	C668T	Exón 7	Brassington et al 2003	
	C709T	Exón 7	Basson et al 1999	
	G710A	Exón 7	Basson et al 1997	
	G755T	Exón 7	Cross et al 2000	
Otras reestructuraciones	Deleciones	EX3-EX9del	Exón 3-Exón 9	Akrami et al 2001
		Translocaciones	t(5;12)(q15;q24)	Intrón 1a

Adaptada de Heinritz et al 2005¹³.

maciones esqueléticas ni diagnóstico de síndrome de Holt-Oram¹⁵.

Entre las mutaciones descritas figuran mutaciones puntuales y otras aberraciones cromosómicas, como deleciones y translocaciones. Las mutaciones concretas pueden ser deleciones e inserciones de una o varias bases, que pueden ocasionar un desplazamiento del marco de lectura en la traducción, en cuyo caso suelen producir la terminación prematura del producto, o bien cambios de base (transiciones, transversiones). Éstos pueden producir la terminación inmediata del producto (mutaciones sin sentido), sustituir ocasionalmente algún aminoácido y, en consecuencia alterando la conformación tridimensional de la proteína y su función (mutaciones antisentido) o generar péptidos truncados e inactivos (mutaciones del *splicing*). Algunas de estas mutaciones concretas se repiten con bastante frecuencia por lo que se consideran puntos calientes de mutación^{6,9,12}. Las reestructuraciones más grandes como las deleciones intersticiales pueden alterar la unión de la proteína al ADN, el mecanismo de la transcripción o la localización intracelular de *TBX5*¹⁰.

En nuestro paciente se describe una nueva mutación del *splicing* que probablemente causa el síndrome de Holt-Oram. Dicha mutación se produjo *de novo*, al presentar cada uno de los padres dos alelos normales para esa secuencia (fig. 2). La mutación se localiza fuera del dominio T-Box de unión al ADN en el que se han descrito la mayoría de mutaciones causantes del síndrome.

Se ha sugerido que las mutaciones cercanas al extremo N-terminal de la proteína alteran la unión de la misma al surco mayor del ADN, produciendo sobre todo manifestaciones cardíacas, mientras que las mutaciones cercanas al extremo C-terminal alteran su unión al surco menor, predominando manifestaciones esqueléticas⁵. Posteriormente se han descartado estas correlaciones genotipo-fenotipo, al menos para las mutaciones deletéreas^{9,13}. De acuerdo con esta última afirmación, nuestro paciente, portador de una mutación deletérea, presenta un cuadro con defectos cardíacos y esqueléticos de similar gravedad y relativamente frecuentes en el síndrome de Holt-Oram. En cualquier caso, la gravedad de ambos tipos de defectos sería más leve que si la mutación determinara la terminación prematura del producto, como se ha descrito recientemente¹².

TBX5 es un factor de transcripción expresado e implicado en la formación de las extremidades superiores, así como en la isomerización, la división y la morfogénesis cardíaca⁴, con lo cual es probable que las mutaciones capaces de modificar su estructura y su función alteren el desarrollo de dichos órganos. Asimismo, se han identificado otros factores de transcripción implicados en la misma vía, como *SALL4*, los cuales producen manifestaciones similares al mutar^{9,14}. Otras dianas de *TBX5* descritas son los promotores de los genes de la α -actina cardíaca, de las diferentes cadenas de la miosi-

na cardíaca, de *Nkx2-5* y el activador del factor natriurético atrial¹¹.

En definitiva, podemos concluir que nuestro paciente presenta un síndrome de Holt-Oram debido a la mutación G756A en *TBX5*. Por ello recomendamos someter a un análisis mutacional de *TBX5* a aquellos pacientes con defectos cardíacos en asociación con alteraciones esqueléticas de los miembros superiores. En caso de no hallarse la causa, también sugerimos ampliar el estudio a otros genes implicados en el síndrome de Holt-Oram o en la función de *TBX5*, como el recientemente descrito *SALL4*.

BIBLIOGRAFÍA

- Holt M, Oram S. Familial heart disease with skeletal malformations. *Brit Heart J*. 1960;22:236-42.
- Newbury-Ecob RA, Leanage R, Raeburn JA, Young ID. Holt-Oram syndrome: A clinical genetic study. *J Med Genet*. 1996; 33:300-7.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*. 1997;15:21-9.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultz J, et al. Mutations in human *TBX5* cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. 1997;15:30-5.
- Basson CT, Huang T, Lin RC, Bachinsky DR, Weremowicz S, Vaglio A, et al. Different *TBX5* interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:2919-24.
- Cross SJ, Ching YH, Li QY, Armstrong-Buisseret L, Spranger S, Lyonnet S, et al. The mutation spectrum in Holt-Oram syndrome. *J Med Genet*. 2000;37:785-7.
- Yang J, Hu D, Xia J, Yang Y, Ying B, Hu J, et al. Three novel *TBX5* mutations in chinese patients with Holt-Oram syndrome. *Am J Med Genet*. 2000;92:237-40.
- Sivan Y, Merlob P, Reisner SH. Lower limb standards in newborns. *Am J Dis Child*. 1983;137:829-32.
- Brassington AE, Sung SS, Toydemir RM, Le T, Roeder AD, Rutherford AE, et al. Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by *TBX5* genotype. *Am J Hum Genet*. 2003;73:74-85.
- Fan C, Duhagon MA, Oberti C, Chen S, Hiroi Y, Komuro I, et al. Novel *TBX5* mutations and molecular mechanism for Holt-Oram syndrome. *J Med Genet*. 2003;40:e29.
- Ghosh TK, Packham EA, Bonser AJ, Robinson TE, Cross SJ, Brook JD. Characterization of the *TBX5* binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001;18:1983-94.
- Heinritz W, Moschik A, Kujat A, Spranger S, Heilbronner H, Demuth S, et al. Identification of new mutations in the *TBX5* gene in patients with Holt-Oram syndrome. *Heart*. 2005;91:383-4.
- Heinritz W, Shou L, Moschik A, Froster UG. The human *TBX5* gene mutation database. *Hum Mutat*. 2005;26:397.
- Kohlhase J, Chitayat D, Kotzot D, Ceylaner S, Froster UG, Fuchs S, et al. *SALL4* mutations in Okihiro syndrome (Duane-radial ray syndrome), Acro-renal-ocular syndrome, and related disorders. *Hum Mutat*. 2005;26:176-83.
- Reamon-Buettner SM, Borlak J. *TBX5* mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat*. 2004; 24:104.