

MOLEKULOVÁ GENETIKA MYOPATIÍ SODÍKOVÉHO KANÁLA

RUŠČÁK J.

MOLECULAR GENETICS OF MYOPATHIES IN SODIUM CHANNEL

The common molecular basis of hyperkalemic periodic paralysis, of paramyotonia congenita and that of myotonia fluctuans are the mutations of sodium channel SCN4A gene. The mutations result in an increased probability of channel openings at rest, or slightly decreased membrane potentials, and in delayed channel inactivation, both contributing either to myotonia or paralysis. Because of the lack of a sufficient amount of molecular genetic analyses of the above mentioned diseases, the precise clinical condition cannot be predicted according to the mutation position in the channel polypeptide as the same condition can be caused by mutations in different positions and, vice versa, mutations in the same position result in different clinical conditions. Causal therapy of these conditions is not known yet. (*Fig. 1, Tab. 1, Ref. 47.*)

Key words: sodium channel, sodium channel gene mutations, hyperkalaemic periodic paralysis, paramyotonia congenita, myotonia fluctuans.

Bratisl Lek Listy 1997; 98: 701–707

Progres v biofyzikálnom výskume a molekulovogenetických poznatkoch napäťovoriadených iónových kanálov pomohol upresniť klasifikáciu niektorých myotonických a paralytických ochorení priečne pruhovaného svalstva. Moderné biofyzikálne metodiky a využitie poznatkov molekulovogenetickej analýzy umožnili odlišiť dve skupiny svalových ochorení s podobnými symptómami, a to skupinu chorôb podmienenú mutáciami génu chloridového kanála a skupinu, ktorej molekulovogenetický podklad tvoria mutácie génu sodíkového kanála priečne pruhovaného svalu.

V tomto prehľade sa pokúsime zhrnúť poznatky o molekulovogenetických aspektoch chorôb sodíkového kanála priečne pruhovaného svalstva.

Spoločnou molekulovou bázou hyperkáliemickej periodickej paralýzy, paramyotonia congenita a myotonia fluctuans sú mutácie génu sodíkového kanála SCN4A. Mutácie spôsobujú zvýšenú pravdepodobnosť otvárania kanálov pri pokojových alebo mierne znížených membránových potenciáloch a spomalenú inaktiváciu kanálov, čo v konečnom dôsledku vedie k myotónii alebo paralýze. Pre nedostatočný počet molekulovogenetických analýz uvedených chorôb nemožno zatiaľ na základe pozície mutácií v kanálovom polypeptide predpovedať klinický obraz, keďže rovnaký klinický obraz spôsobujú mutácie v odlišných pozíciách a na druhej strane mutácia v tej istej pozícii vedie k odlišnému klinickému obrazu. Kauzálnu terapiu týchto chorôb zatiaľ nepoznáme. (*Obr. 1, tab. 1, lit. 47.*)

Kľúčové slová: sodíkový kanál, mutácie génu sodíkového kanála, hyperkáliemická periodická paralýza, paramyotonia fluctuans, myotonia congenita.

Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 12, s. 701–707

Stručná charakteristika sodíkového kanála

Napätovozávislý sodíkový kanál reprezentuje integrálny glykoproteínový komplex v membránach excitabilných buniek zodpovedný za náhly prechodný vzrast permeability pre sodíkové ióny pri depolarizácii membrány. Biofyzikálnym prejavom progredujúcej propagácie depolarizácie membrány je akčný potenciál.

Kanálový komplex tvoria dva odlišné polypeptidy membrán, a to jeden s molekulovou hmotnosťou 260–314 kD označovaný ako alfa podjednotka a druhý s molekulovou hmotnosťou 34–38 kD, ktorý sa označuje ako beta podjednotka (Casadei a Barchi, 1987; Kraner a spol., 1985; Lombet a Lazdunski, 1984). Obidva polypeptidy sú silne oglykozylované. Afinity chromatografiou na kolónach s naviazanými protilátkami proti oboj subjednotkám sa v tkanivových kultúrach zistil výskyt kompletných subjednotiek s vyššie uvedenou molekulovou hmotnosťou, ako aj výskyt tých istých polypeptidov s molekulovou hmotnosťou o 20–30 % nižšou, čo je podmienené ich nedokončenou glykozyláciou v Golgiho aparáte. Intracelulárne lokalizované polypeptidy sa považujú za bunkovú zálohu kanálových polypeptidov (Roberts a Barchi, 1987; Schmidt a Catterall, 1987; Wollner a spol., 1987).

Za všetky biofyzikálne charakteristiky sodíkového kanála zodpovedá väčšia alfapodjednotka, čo sa dokázalo sledovaním jej vlastností po vsadení purifikovaného polypeptidu do lipidickej dvojvrstvy, štúdiom exprimovanej alfapodjednotky polypeptidu v oocytach *Xenopus laevis* (pazúrnatka vodná), ako aj charakteristikami sodíkového kanála elektrického orgánu raje elektrickej, v ktorom chýba betapodjednotka (Kraner a spol., 1985; Noda a spol., 1986; Tamkun a spol., 1984).

Izolácia alfapodjednotky sodíkového kanála a jej komplementárnej DNA (cDNA) umožnili stanoviť primárnu štruktúru polypeptidového reťazca a jeho priestorové umiestnenie do lipidickej dvojvrstvy membrány.

Modely sodíkového kanála vychádzajúce z biofyzikálnych charakteristík a primárnej štruktúry polypeptidu sú založené na domnienke, že kanálový peptid sa skladá zo štyroch (I–IV) homologných intramembránových polypeptidických sekvencií označovaných ako domény alebo repety, ktoré sú spojené dlhšími, intracelulárne uloženými úsekmi peptidových reťazcov označovaných ako interdomény. Každá doména pozostáva z 225–325 aminokyselinových zvyškov. Tvoria ju 6 transmembránových alfa-helixových segmentov (S1–S6) spojených krátkymi extramembránovými sekvenciami nazývanými intersegmenty. Každá doména okupuje 1/4 kanála, a takto štyri domény usporiadané vedľa seba do kruhu vytvárajú peptidovými reťazcami ohraničenú vodnú štrbinu kanála. Sekvencia intramembránových úsekov je veľmi konzervatívna vo všetkých typoch sodíkových kanálov, no primárna štruktúra extramembránových regiónov je druhovo i tkanivovo veľmi variabilná.

Segmenty S1, S2 a S3 každej domény, ktoré obsahujú viaceré ionizované zvyšky, sú amfipatické a sú uložené v kanálovej štrbine. Segment S4 je charakteristický tým, že v každej tretej pozícii má bázičný lyzín alebo arginín a nemá priamy kontakt s vodným pórom. Bázičné aminokyseliny vytvárajú na povrchu alfa-helixu segmentu S4 špirálový pás pozitívnych nábojov reagujúcich na zmeny membránového potenciálu a považujú sa za zložku napätového senzora kanála (Yang a Horn, 1995). V segmente S4 prvej domény sa nachádzajú štyri bázičné aminokyseliny, v S4 druhej a tretej domény po päť bázičných zvyškov a v S4 štvrtej domény osem bázičných aminokyselín. Hydrofóbne segmenty S5 a S6 ohraničujú doménu z vonkajšej strany štrbiny a sú spojené dlhým intersegmentom sčasti inzerovaným v membráne (Kallen a spol., 1994; Patton a spol., 1993; West a spol., 1992).

Predpokladá sa, že väzbové miesto pre sodík sa nachádza na aniónových zvyškoch intersegmentu S5–S6, na ktoré sa má viazať s vysokou afinitou i blokátor sodíkových tokov tetrodotoxín (TTX) (Kallen a spol., 1994). Tento názor však spochybňujú údaje o TTX insenzitívnych kanáloch, ktoré majú aniónové sekvencie zachované, afinita väzby TTX je však na nich až o dva rády nižšia, ako aj zistenia, že nahradenie lyzínu v pozícii 1422 a alanínu v pozícii 1714 glutamátom má za následok stratu selektivity kanála pre sodík a získanie selektivity pre vápnik (Heinemann a spol., 1992).

Pre inaktiváciu kanála je nevyhnutný hydrofóbny zvyšok fenylalanínu na tretej interdoméne. Ak sa v sekvencii Ile I488, Phe I489, Met I490 nahradia tieto aminokyseliny glutamátom, len zámena Phe I489 má za následok vymiznutie rýchlej fázy inaktivácie (Lehmann-Horn a spol., 1993; Patton a spol., 1993). Rovnako zámena Phe 1764 za Ala a Val 1774 za Ala kompletne ruší

Tab. 1. Mutácie svalového sodíkového kanála a svalové myopatie (podrobne pozri text).

Tab. 1. Mutations of muscular sodium channel, and muscular myopathies (details in text).

HYPERKÁLIEMICKÁ PERIODICKÁ PARALÝZA (HPP)
HYPERKALAEMIC PERIODIC PARALYSIS (HPP)

Zámena aminokyseliny v pozícii na:

Amino acid mutation localised on:

Thr	698	Met
Thr	704	Met
Val	1783	Ile
Met	1360	Val
Met	1585	Val
Met	1592	Val
Ala	1156	Thr

PARAMYOTONIA CONGENITA (PC)

PARAMYOTONIA CONGENITA (PC)

Zámena aminokyseliny v pozícii na:

Amino acid mutation localised on:

Ser	804	Phe
Gly	1306	Val
Thr	1313	Met
Arg	1433	Leu
Arg	1448	His
Arg	1448	Cys
Arg	1448	Pro

MYOTONIA FLUCTUANS (MSC)

MYOTONIA FLUCTUANS (MSC)

Zámena aminokyseliny v pozícii na:

Amino acid mutation localised on:

Val	1589	Met
Ile	1160	Glu
Gly	1306	Ala
Gly	1306	Glu
Gly	1306	Val

Baquero a spol., 1995; Cannon a Strittmatter, 1993; Ebers a spol., 1991; Heine a spol., 1993; Lerche a spol., 1993; McClatchey a spol., 1992; Ptacek a spol., 1991, 1992, 1993, 1994; Ricker a spol., 1994; Rojas a spol., 1991; Wang a spol., 1995.

rýchlu fázu inaktivácie, čo poukazuje na kritickú úlohu hydrofóbnych zvyškov pri inaktivácii kanála (McPhee a spol., 1995).

Schéma sodíkového kanála je na obrázku 1.

V svalovom tkanive sa vyskytujú dva typy sodíkového kanála, ktoré sa okrem Mr odlišujú jednotkovou vodivosťou a citlivosťou na toxíny: typ svalového kanála dospelého jedinca a embryonálny typ. Kanál zrelého inervovaného svalu s jednotkovou vodivosťou 25–30 pS je blokovaný TTX v koncentrácii 10^{-9} mol.l⁻¹, kým embryonálny typ s vodivosťou 10–15 pS je blokovaný TTX v koncentrácii 10^{-7} mol.l⁻¹. Gén kódujúci alfapodjednotku základnej izoformy sodíkového kanála v inervovanom kostrovom sval

dospelého človeka sa označuje ako gén SCN4A. Gén je lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 17 v oblasti 23.1—25.3. Kompletná kódujúca oblasť SCN4A predstavuje 32,5 kb genomickej DNA a skladá sa z 24 exónov (od 54 báz po viac ako 2,2 kb) a 23 intrónov (od 97 báz po 4,85 kb). Exónová organizácia génu nevykazuje žiaden vzťah k predpovedaným funkčným doménam proteínov kanála a miesta spojov sa nachádzajú i na viacerých transmembránových segmentoch (Ambrose a spol., 1992; George a spol., 1993; McClatchey a spol., 1992 a; Wang a spol., 1992; Zhou a spol., 1994).

Z primárnej štruktúry dedukovaná Mr kanála inervovaného svalu je 208,5 kD, v molekule má 1836 aminokyselinových zvyškov, embryonálny typ sa skladá z 2016 aminokyselinových zvyškov a jeho Mr je 227 kD (George a spol., 1993; Kallen a spol., 1994). (Podrobnejšie informácie o sodíkovom kanáli pozri Ruščák, 1989).

Zmeny funkcie sodíkového kanála a dedičné myotónie

Skupina ochorení adynamia — paramyotónia je spôsobená dysfunkciou sodíkových kanálov a patria sem:

1. hyperkáliemická a normokáliemická periodická paralýza,
2. paramyotonia congenita,
3. myotonia fluctuans (myotonia sodíkového kanála).

Všetky choroby, patriace do skupiny 1—3, sú dedičné autozómovo dominantným spôsobom. Ataky svalovej slabosti sú kľúčovým symptómom hyperkáliemickej periodickej paralýzy. Hlavným prejavom paramyotónie je chladom a námahou vyvolaná svalová stuhnutosť, ktorá vyústi do svalovej slabosti. Charakteristickým obrazom myotonia fluctuans je menlivosť stupňa svalovej slabosti. Na rozdiel od hyperkáliemickej periodickej paralýzy a paramyotonia congenita tu vlastná svalová slabosť nie je rozhodujúcim kritériom. Chýba aj vzťah symptómov s chladom (Lehmann-Horn a spol., 1993; Ricker a spol., 1994).

Hyperkáliemická periodická paralýza, označovaná aj ako adynamia episodica hereditaria Gamstorp, sa u oboch pohlaví prenáša s úplnou penetranciou. Ataky generalizovanej slabosti sa objavujú v prvej dekáde. Zvyčajne vznikajú vo včasných ranných hodinách alebo po námahe. Trvajú 15 minút až 2 hodiny a spontánne ustupujú. Na rozdiel od hypokáliemickej periodickej paralýzy nikdy nie je oslabené dýchacie svalstvo. Záchvat slabosti vyvoláva chlad, emocionálny stres, hypoglykémia, podanie kálie a odpočinok po predchádzajúcej namáhavej práci. Generalizovanú slabosť sprevádza významný vzostup hladiny kálie v sére (na 5—7 mmol/l). Hladina sérového kálie niekedy zostáva na hornej hranici normy. Zriedkavo sa zvýši tak vysoko, že ohrozuje i činnosť srdca. Na ekg zázname sa počas ataku objavuje vysoká a zahrotená vlna T ako príznak hyperkáliémie. Zotavenie možno zlepšiť miernym cvičením. Po skončení záchvatu môže pretrvávajúť niekoľko dní mierna slabosť. Medzi atakmi je hladina sérového kálie normálna. V druhej polovici života sa frekvencia záchvatov obyčajne znižuje. Hyperkáliemická periodická paralýza sa niekedy vyskytuje v asociácii s myotóniou alebo paramyotóniou (Ebers a spol., 1991; Heine a spol., 1993; Ptáček a spol., 1993).

Veľmi zriedkavá normokáliemická periodická paralýza pripomína hyperkáliemickú periodickú paralýzu. Líši sa od nej tým, že aj počas ťažkých atakov paralýzy sa hladina sérového kálie nezvyšuje. Pacienti s normokáliemickou periodickou paralýzou reagujú

zhoršením na orálne podané kálium. Veľké dávky sodíka znižujú slabosť, podanie glukózy je bez účinku. Nie sú jednoznačné zmeny hladín sérových elektrolytov, no počas atakov sa pozoruje zvýšené vylučovanie sodíka a retencia kálie. Znížené vylučovanie kálie obličkami, neúčinnosť glukózy a chýbanie narastania hladín sérového kálie počas atakov odlišujú túto poruchu od hyperkáliemickej periodickej paralýzy.

Paramyotonia congenita je autozómovo dominantné ochorenie s úplnou penetranciou a väzbou na gén SCN4A. Hlavné príznaky tejto choroby sú: 1. paradoxná myotónia, t.j. svalová stuhnutosť, ktorá sa objavuje počas svalovej námahy a zvyšuje sa pokračujúcou námahou, 2. zvýraznenie svalovej stuhnutosti, indukovanej fyzickou námahou, chladom, 3. predilekcia postihnutia svalov tváre, krku a dlhých svalov prevažne horných končatín a 4. vo väčšine prípadov slabosť po dlhšie trvajúcej námahe a expozícii chladu.

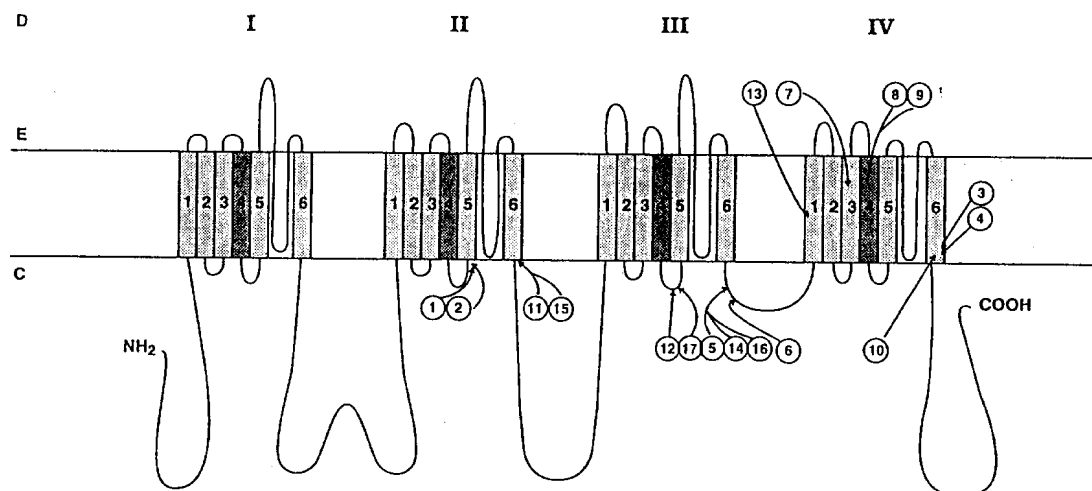
Paramyotonicke symptómy sú prítomné už pri narodení a zostávajú nezmenené počas celého života.

U niektorých paramyotonických pacientov sa vyskytujú aj ataky hyperkáliemickej svalovej slabosti (paramyotonickej periodickej paralýzy).

Pobyt v chlade vyvoláva stuhnutosť tvárového svalstva. Tvár sa podobá maske a postihnutý niekoľko sekúnd nie je schopný otvoriť oči. Pri práci v chlade dochádza k stuhnutiu horných končatín a pacient nimi niekoľko minút nemôže hýbať. Stuhnutosť rýchlo prechádza do svalovej slabosti. Po zohriatí nemusia končatiny získať silu ani po niekoľkých hodinách. Dolné končatiny sú spravidla postihnuté menej. V teple viacerí pacienti nemajú nijaké problémy. Pre chorobu nie sú typické bolesti svalov, svalová atrofia alebo hypertrofia.

Myotonia fluctuans je relatívne nová nozologická jednotka. Ide o nondystrofickú myotóniu typu paramyotónie s autozómovo dominantným typom dedičnosti. Je charakterizovaná difúznymi myotonicnými výbojmi svalov a spomalenou relaxáciou po voluntárnych pohyboch. Na rozdiel od klasického typu, kde chlad vyvoláva svalovú slabosť, u postihnutých chlad a záťaž spôsobuje len svalovú stuhnutosť. Nikdy nie je prítomná svalová slabosť. Svalová stuhnutosť sa provokuje cvičením alebo častejšie odpočinkom po fyzickej námahe. Trvá 30 minút až 2 hodiny. Obdobia atakov sa striedajú s asymptomatickými obdobiami (od toho názov fluctuans), ktoré trvajú niekoľko dní až týždňov (tzv. dobré a zlé dni). Niekedy možno vyvolať ťažký atak myotónie pozitívnym káliom, no bez sprievodnej slabosti (Ricker a spol., 1994).

Lehmann-Horn a spol. (1987) prví začali sériu prác zacielených na objasnenie membránovej abnormality pri myotóniách. Zistili, že abnormálna depolarizácia vo svalových vzorkách od pacientov s hyperkáliemickou periodickou paralýzou sa dala blokovat TTX. Navyše zistili trvalý intracelulárne smerujúci sodíkový prúd pri membránových potenciáloch pozitívnejších ako -60 mV a zvýšenie koncentrácie kálie v inkubačnom médiu z 3,5 mmol/l na 10 mmol/l, čo pokladajú za spúšťací mechanizmus trvalého vtoku sodíka do svalových vlákien. Neskoršie registrácie pomocou napätového zámku (patch clamp) ukázali chybnú inaktíváciu sodíkových kanálov. Pozorovania boli v súlade s hypotézou, že trvalý vstup sodíka do svalového vlákna sprevádza trvalý výstup kálie zo svalového vlákna. To spôsobuje zvýšenie hladiny extracelulárneho kálie. Extracelulárne hladiny kálie sa fyziologicky zvyšujú aj pri fyzickej námahe. Preto sa ataky slabosti počas



Obr. 1. Schematické znázornenie sodíkového kanála rozvinutého do plochy. D — domény, E — extracelulárna lokalizácia, C — intracelulárna lokalizácia. Čísla 1–6 v lipidickej dvojvrstve označujú segmenty, čísla v krúžkoch so šípkami ukazujú pozície mutácií. Podľa Hudsona a spol. (1995).

Hyperkáliemická periodická paralýza: 1, 2, 3, 4, 13

Paramyotonia congenita: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

Myotonia fluctuans: 14, 15, 16, 17

odpočinku po cvičení, charakteristické pre hyperkáliemickú periodickú paralýzu, dávajú do súvislosti s patologickým vzostupom koncentrácie kálie v T-tubuloch. Táto zvýšená hladina kálie znižuje membránový potenciál natoľko, že narušuje normálnu excitabilitu svalového vlákna (Rüdel a spol., 1993). Podobný abnormálny sodíkový prúd sa našiel i vo svaloch pacientov s paramyotonia congenita. V tomto prípade bola abnormalita indukovaná podchladením svalového tkaniva na 27 °C a bola spojená s dramatickým poklesom pnutia svalového vlákna pri záškľbe (twitch tension) (Hoffmann a Wang, 1993).

Špekuluje sa o tom, že patomechanizmus hyperkáliemickej periodickej paralýzy by mohol byť podobný i pri paramyotonia congenita. To znamená, že i pri tejto chorobe je defekt na membránach svalových vlákien. Elektrofyziologické sledovania vodivosti sarkolemálnych zložiek ukázali, že aj svaly od asymptomatických pacientov s hyperkáliemickou periodickou paralýzou — bez príznakov myotónie — mali podobné abnormity sodíkových prúdov ako svaly pri paramyotonia congenita, kým poruchy chloridovej vodivosti sa nepozorovali. Merania svalových membránových potenciálov in vivo počas spontánnych a káliom vyvolaných záchvatov pri hyperkáliemickej periodickej paralýze ukázali výraznú depolarizáciu pokojového membránového potenciálu (z -69 mV na -46 mV). Predpokladá sa, že táto depolarizácia svalovej membrány by mohla vyvolávať elektrickú instabilitu myofibril a následnú paralýzu (Hoffmann a Wang, 1993).

Čo sa zdá kritickým v patofyziológii svalového tkaniva pri ochoreniach sodíkového kanála, je spustenie abnormálneho vstupu sodíka, recipročný výtok kálie, disperzia takto nadbytočného kálie von z T-tubulov a účinky týchto abnormálnych iónových zmien na pokojový membránový potenciál. Pri vzostupe koncentrácie kálie v T-tubuloch a poklese membránového potenciálu na -50 mV dochádza k opakovaným výbojom akčných potenciálov, čo sa prejaví myotóniou. Pri poklese membránového poten-

ciálu pod hodnotu -40 mV membrána už nie je excitabilná a objaví sa paralýza. Environmentálny podnet (pokoj po záťaži, požitie kálie a nízke teploty) mení membránový potenciál svalového vlákna vo vzťahu k týmto prahom a slúži ako katalyzátor atakov myotónie, paralýzy alebo oboch (Cannon a spol., 1993; Hoffmann a Wang, 1993).

Mutácie génu sodíkového kanála a sprievodné klinické prejavy

Poruchy funkcie sodíkového kanála sú determinované tým istým génom (genetická homogenita), no odlišnými mutáciami tohto génu (molekulogenetická heterogenita). Defekty génu alfa-podjednotky sodíkového kanála priečne pruhovaných svalov — SCN4A — zodpovedajú za varianty hyperkáliemickej periodickej paralýzy, ďalej za paramyotonia congenita, normokáliemickú periodickú paralýzu a myotonia fluctuans (Abdalla a spol., 1992; Lehmann-Horn a spol., 1993).

Mutácie génu SCN4A môžu produkovať široké spektrum fenotypov svalových ochorení charakterizovaných epizodickými abnormitami membránovej excitability. Zistilo sa viacero rozličných mutácií, ktoré sa však v géne nevyskytujú "predpovedateľným" spôsobom.

Ako prvá bola objavená mutácia, ktorá je na druhom mieste vo frekvencii u všetkých rodín s hyperkáliemickou periodickou paralýzou. Spôsobuje zámenu A4774G, ktorá má za následok nahradenie Met1592Val v membránovom segmente S6 domény IV (Ptáček a spol., 1993). Podmieňuje formu hyperkáliemickej periodickej paralýzy, ktorá je spojená s myotóniou a nevedie k trvalej svalovej slabosti. Miesto zámene aminokyseliny je blízko intracelulárnej časti segmentu S6, regiónu pokladaného za akceptora inaktívácie vrátoč. Je preto možné, že štruktúrna zmena mení inaktíváciu kanála, čo je v súlade i s elektrofyziologickými nálezmi (Rojas a spol., 1991).

Najčastejšia mutácia vedúca k hyperkáliemickej periodickej paralýze s prejavmi myotónie alebo bez myotonických symptómov je zámena cytozínu za tymín (C2188T). Spôsobuje náhradu polárnej aminokyseliny treonín v pozícii 698 a 704 za hydrofóbnu aminokyselinu metionín v segmente S5 domény II. Táto mutácia mení napätovú závislosť aktivácie o -10 mV až -15 mV, v dôsledku čoho vzniká trvalý intracelulárny prúd iónov sodíka vyvolávajúci aktiváciu už pri -70 mV. Tento typ mutácie je spojený s formou hyperkáliemickej periodickej paralýzy, pri ktorej je svalová slabosť trvalá (Ferro a spol., 1993; Ptáček a spol., 1993). Zamenené aminokyseliny sú opäť blízko medziväzby S5/S6 patriacej k hypotetickej akceptorovej oblasti inaktivačných vrátok (Fontaine a spol., 1990). Obe mutácie A4774G a C2188T sú situované v regiónoch génu, ktoré sú veľmi konzervatívne v evolúcii. Pomerne mierne klinické dôsledky môže vysvetliť fakt, že vlastnosti nahrádzajúcich aminokyselín sú podobné vlastnostiam nahrádzaných aminokyselín.

Mutácia G3466A spôsobuje hyperkáliemickú periodickú paralýzu s neúplnou penetranciou. Mutácia má za následok zámenu Ala1156Thr na intersegmente S4/S5 domény III (Ptáček a spol., 1993). Na rozdiel od troch uvedených mutácií nie je štvrtá mutácia A4078G v blízkosti intersegmentového regiónu. Spôsobuje nahradenie Met1360Val na segmente S1 domény IV. V postihnutej rodine sa klinické prejavy objavili len u mužov. Ženy nesúce mutáciu nikdy neokúsili ataky slabosti, aj keď nález myotónie pri elektromyografickom vyšetrení podporoval výskyt defektných sodíkových kanálov. Táto mutácia vyvoláva pomalú inaktiváciu napätovo riadených sodíkových kanálov (Lehman-Horn a spol., 1991). Treba sa nakoniec zmieniť o údajoch Ferra a spol. (1993), ktorí v jednom prípade familiárnej hyperkáliemickej periodickej paralýzy nezistili mutácie SCN4A génu sodíkového kanála. Pozorovali veľmi skorý začiatok choroby, navodenie atakov bezprostrednou fyzickou námahou a výrazné postihnutie svalov tváre. Liečba acetazolamidom bola v tejto skupine pacientov neúčinná. Nevylučujú, že ide o mutáciu iného génu než SCN4A. Mutácia Val783Ile na S6 domény II má za následok hyperkáliemickú periodickú paralýzu kombinovanú s dysrytmiou myokardu (Baquero a spol., 1995). Valín v pozícii 1783 majú všetky typy sodíkových kanálov, čo by svedčilo o úlohe tohto zvyšku pri inaktivácii sodíkového kanála. Arytmie pri tejto mutácii sa pripisujú poruche funkcie sodíkového kanála prevodového systému myokardu, ktorý obsahuje sodíkový kanál typu inervovaného svalového vlákna (Coraboeuf a spol., 1993).

Stojí za zmienku, že aj periodická paralýza ustajnených koní je spôsobená mutáciou na homológom géne koní. Mutácia spôsobuje nahradenie Phe1421Leu na intersegmente S2/S3 domény IV, čo je blízko od miesta nahradenia Arg1433Leu, ktoré vyvoláva u ľudí paramyotonia congenita. Choroba koní je asociovaná s myotóniou, ktorá vyvoláva u nich žiadanú svalovú hypertrofiu. Z tohto dôvodu bol mutovaný gén diseminovaný chovateľmi natoľko, že až vyše 5 % tohto plemena (tri milióny koní registrovaných v USA) je postihnutých (Cannon a spol., 1995; Lehmann-Horn a spol., 1991).

Génové mutácie v rodinách s paramyotonia congenita postihujú vysoko konzervované aminokyselinové zvyšky v interdoméne III–IV v tej časti sodíkového kanála, o ktorej sa predpokladá, že je zapojená do vrátkovania kanála. Abnormálna funkcia tejto časti kanála akoby vyvolávala abnormity vtoku sodíkových iónov a jedinečný tepelne závislý fenotyp pri tomto ochorení (Lehmann-Horn a spol., 1993; McClatchey a spol., 1992 b; Ptáček a spol., 1992).

Vo všetkých dosiaľ študovaných rodinách s paramyotonia congenita sa zistili bodové mutácie v dost rozdielnych častiach SCN4A: C3938T transverzia spôsobujúca substitúciu Thr1313Met bola objavená v génovom regióne kódujúcom interdoménu medzi repetom III a IV. V rodinách s touto mutáciou trpia postihnuté osoby na svalovú stuhnutosť zosilňovanú chladom. Dve mutácie na susediacich nukleotidových miestach 4342(4343 sa zistili v génovej oblasti, kódujúcej S4 transmembránový segment domény IV. Segmenty S4 sa pokladajú za napätový senzor mechanizmu kanálovej inaktivácie (Yang a Horn, 1995). Jedna z mutácií spôsobuje zmenu CGT na TGT, ktorá vedie k substitúcii Arg1448Cys. Táto mutácia, pri ktorej je pozitívny náboj nahradený neutrálnou aminokyselinou, sa zistila v rodine, v ktorej postihnutí členovia trpeli na chladom indukované stuhnutie (bez slabosti) a na spontánne epizodické ataky svalovej slabosti. Na tej istej pozícii kodónu nahradenie arginínu za slabo pozitívny histidín (Arg1448His) sa zistilo v dvoch rodinách so svalovým stuhnutím vyvolaným chladom a káliom v kombinácii so spontánnymi epizodickými atakmi svalovej slabosti. Tieto mutácie spôsobujú spomalenie inaktivácie otvorených sodíkových kanálov, ale neovplyvňujú vlastný vtok sodíkových iónov. V tomto procese sa predpokladá rozhodujúca úloha S4 helixu domény IV v spájaní procesu aktivácie a inaktivácie (Chachine a spol., 1994; Ptáček a spol., 1993). Nahradenie arginínu za prolín v pozícii 1448 malo za následok ťažký typ chladom navodenej myotónie spojenej so slabosťou a s mimoriadnou citlivosťou na chlad (Wang a spol., 1995).

Iná bodová mutácia sprevádzaná substitúciou Arg1433Leu lokalizovaná v segmente S3 domény IV bola objavená v rodine s typickou paramyotonia congenita charakterizovanou svalovou stuhnutosťou a vyvolanou chladom a stuhnutosťou prechádzajúcou do chabej parézy po cvičení s ochladenými svalmi (Ptáček a spol., 1993).

Pri myotonia fluctuans bola jedna z mutácií lokalizovaná v exóne 24, kde dochádza k zámene Val1589Met. Táto aminokyselina je lokalizovaná v transmembránovom segmente S6 domény IV tesne pod cytoplazmatickým povrchom, t.j. v oblasti, o ktorej sa predpokladá, že účinkuje ako akceptor inaktivácie vrátok kanála. Elektrofyziológickými štúdiami sa zistili v priečne pruhovaných svaloch zvýšené počty neaktivujúcich sa sodíkových kanálov. Je zaujímavé, že zámena metionínu za valín na pozícii 1592 zapríčiňuje hyperkáliemickú periodickú paralýzu (Heine a spol., 1993; Lehmann-Horn a spol., 1993).

Myotonia fluctuans bola opísaná i pri mutácii génu SCN4A, ktorého bodová mutácia sa zistila na pozícii glycínu 1306. Substitúcia Gly1306Glu vyvoláva stav, pri ktorom je svalová stuhnutosť permanentne oveľa silnejšia ako pri už spomínaných formách myotonia fluctuans. Elektromyografický záznam preukazuje trvalú myotonickú aktivitu. Pre kontinuálnu myotóniu bola choroba značená ako "permanentná myotónia". Ďalšia zámena Gly1306Val spôsobuje paradoxnú myotóniu s malým chladovým zhoršením. Stuhnutosť sa zhoršuje orálnym požitím kálie, nie však podchladením a nikdy sa nepozoruje svalová slabosť. Pri ďalšej mutácii Gly1306Ala sa stuhnutosť objavuje aj za tepla a navyše pri cvičení sa navodí svalová bolesť. Táto stuhnutosť sa neprovokuje ani nezhoršuje orálne požitím káliom, ale ako stuhnutosť, tak aj bolesť znižuje acetazolamid, na základe čoho je pomenovaná ako atypická (acetazolamid senzitivná myotónia) (Lehmann-Horn a spol., 1993; Lerche a spol., 1993; Ptáček a spol., 1993; Ricker a spol., 1994).

Z údajov v tabuľke vyplýva, že dosiaľ známe bodové mutácie génu SCN4A vyvolávajú poruchy svalovej činnosti s nepredpovedateľným klinickým obrazom. Mutácie v tom istom kodóne spôsobujú odlišné klinické prejavy a na druhej strane mutácie v odlišných kodónoch vyvolávajú tie isté poruchy. Príčiny týchto fenoménov zatiaľ vysvetliť nevieme nielen pre nedostatok informácií o vzťahoch štruktúry a funkcie v divokom type kanála, ale aj pre nedostatočný počet analyzovaných ochorení spôsobených mutáciou svalového sodíkového kanála. Zdá sa, že mutačná zámena aminokyselín v regiónoch napätového senzora, či v regiónoch podmieňujúcich inaktiváciu kanála má rovnaký výsledný efekt, a to zvýšený intracelulárny vtok sodíka spôsobujúci abnormálnu aktiváciu kanálov i pri vyšších negatívnych potenciáloch, viacnásobný vzrast pravdepodobnosti otvárania kanálov pri pokojových potenciáloch, predĺženie fázy inaktivácie a oneskorené zatvorenie kanála na fyziologické depolarizačné podnety. Zmeny pomeru Na_i/Na_o môžu potom vo svaloch spôsobiť hyperexcitabilitu membrán (myotónia), ako aj ich inexcitabilitu (paralýzu). Nakoľko sú pri týchto javoch zahrnuté aj iné membránové systémy, ako chloridové, vápnikové, či káliové kanály alebo sodíková pumpa, nemáme zatiaľ jednoznačne overené informácie (Cannon a Strittmatter, 1993; Cannon a spol., 1995; Ebers a spol., 1991; Hoffmann 1995; Hudson a spol., 1995; Koch a spol., 1991; Lehmann-Horn a spol., 1993; Okamura a spol., 1993; Rüdell a spol., 1993).

Domnievame sa, že obmedzený počet doteraz identifikovaných porúch funkcií sodíkového kanála je limitovaný metodickou náročnosťou molekulovogenetickej diagnostiky. Viac svetla do problematiky diagnostiky funkčných porúch priečne pruhovaných svalov uvádzaných pod spoločným názvom myopatie prinesú nepochybne až diagnostické postupy umožňujúce skriningové vyhodnocovanie mutácií génu sodíkového kanála SCN4A.

Terapia

Terapia pri všetkých typoch patológie sodíkového kanála sa zameriava na zadržanie patologickej kaskády vyvolanej abnormálnou funkciou sodíkového kanála alebo na zastavenie procesov začínajúcich abnormálnou inaktiváciou kanálov.

Tokainid, derivát lidokaínu a štruktúrne podobný mexiletín redukujú symptomatickú myotóniu pri paramyotonia congenita. Sú to antiarytmické liečivá, ktoré blokujú malé sodíkové prúdy počas plateau fázy srdcového akčného potenciálu. V pokusoch in vitro nie je tokainid schopný zvrátiť chladom navodenú depolarizáciu svalových buniek, preto farmakologická báza efektu tejto látky pri paramyotonia congenita ostáva neznáma.

Acetazolamid, káliové diuretikum, sa používa pri profylaktickej liečbe hyperkáliemickej periodickej paralýzy. Táto látka pravdepodobne účinkuje cez systémovú redukciu kálie, a tým prispieva v zotrúvaní svalu pod prahom, ktorý iniciuje ataky myotónie a paralýzy (Hudson a spol., 1995; Lehmann-Horn a spol., 1993; Rüdell a spol., 1993).

Literatúra

Abdalla J.A., Casley W.L., Hudson A.J., Murphy E.G., Cousin H.K., Armstrong H.A., Ebers G.C.: Linkage analysis of candidate loci in autosomal dominant myotonia congenita. *Neurology*, 42, 1992, s. 1561–1564.

Ambrose C., Cheng S., Fontaine B., Nadeau J. H., MacDonald M., Gusella J. F.: The alpha-subunit of the skeletal muscle sodium channel is encoded proximal to Tk-1 on mouse chromosome 11. *Mamm. Genome*, 3, 1992, s. 151–155.

Baquero J.Z., Ayala A.R., Wang J., Curless R.G., Feero W.G., Hofman E.P., Ebeid M.R.: Hyperkalemic periodic paralysis with cardiac dysrhythmia: a novel sodium channel mutation. *Ann. Neurol.*, 37, 1995, s. 408–411.

Cannon S.C., Corey D.P.: Loss of Na^+ channel inactivation by anemone toxin (ATX II) mimics the myotonic state in hyperkalemic periodic paralysis. *J. Physiol. Lond.*, 466, 1993, s. 501–520.

Cannon S.C., Hayward J., Beeck J., Brown R.H.Jr.: Sodium channel inactivation is impaired in equine hyperkalemic peiodic paralysis. *J. Neurophysiol.*, 73, 1995, s. 1892–1899.

Cannon S.C., Strittmatter S.M.: Functional expression of sodium channel mutations identified in families with periodic paralysis. *Neuron.*, 10, 1993, s. 317–326.

Casadei J. M., Barch R. L.: Monoclonal antibodies against the voltage-sensitive sodium channel from rat skeletal muscle-mapping antibody binding sites. *J. Neurochem.*, 48, 1987, s. 773–778.

Coraboeuf E., Deroabaie E., Coulombe A.: Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in dog heart. *Ann. J. Physiol.*, 236, 1979, s. 11561–11567.

Ebers G.C., George A.L., Barchi R.L., Ting-Passador S.S., Kallen R.G., Lathrop G.M., Beckmann J.S., Hahn A.F., Brown W.F., Campbell R.D.: Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis are linked to the adult muscle sodium channel gene. *Ann. Neurol.*, 30, 1991, s. 810–816.

Ferro W.G., Barany F., Zhou J., Todorovic S.M., Convit R., Galloway G., Hausmanova-Petrusewicz J., Fidzińska A., Arahata K., Wessel H.B., Wadelius C., Marks H.G., Hartlage P., Hayakawa H., Hoffmann E.P.: Hyperkalemic periodic paralysis: rapid molecular diagnosis and relationship of genotype to phenotype in 12 families. *Neurology*, 43, 1993, s. 668–673.

Fontaine B., Khurana T.S., Hoffmann E.P., Bruns G.A.P., Haines J.L., Trofatter J.A., Hanson M.P., Rich J., McFarlane H., Yasek D.M., Romano D., Gusella J.F., Brown R.H.: Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science*, 250, 1990, s. 1000–1002.

George A.L., Iyer G.S., Kleinfeld R., Kallen R.G., Barchi R.L.: Genomic organisation of the human skeletal muscle sodium channel gene. *Genomics*, 15, 1993, s. 598–606.

Heine R., Pika U., Lehmann H.F.: A novel SCN4A mutation causing myotonia aggravated by cold and potassium. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 1993, s. 1349–1353.

Heinemann S.H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K., Numa S.: Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356, 1992, s. 441–443.

Hoffmann E.P., Wang J.: Duchenne—Becker muscular dystrophy and the nondystrophic myotonias. Paradigms for loss of function and change of function of gene products. *Arch. Neurol.*, 50, 1993, s. 1227–1235.

Hoffmann E.P.: Voltage gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride and calcium regulation in skeletal muscle. *Ann. Rev. Med.*, 46, 1995, s. 431–441.

- Hudson A.J., Ebers G.C., Bulman D.E.:** The skeletal sodium and chloride channel diseases. *Brain*, 118, 1995, s. 547—563.
- Kallen R.G., Cohen S.A., Barchi R.L.:** Structure, function and expression of voltage dependent sodium channels. *Mol. Neurobiol.*, 7, 1994, s. 383—428.
- Koch M.C., Ricker K., Otto M., Grimm T., Bender K., Zoll B., Harper P.S., Lehmann-Horn F., Rüdell R., Hoffmann E.P.:** Linkage data suggesting allelic heterogeneity for paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis on chromosome 17. *Hum. Genet.*, 88, 1991, s. 71—74.
- Kraner S.D., Tanaka J.C., Barchi R.L.:** Purification and functional reconstitution of the voltage-sensitive sodium channel from rabbit T-tubular membranes. *J. Biol. Chem.*, 260, 1985, s. 6341—6347.
- Lehmann-Horn F., Iaizzo P.A., Hatt H., Franke C.:** Altered gating and conductance of Na⁺ channels in hyperkalemic periodic paralysis. *Pflug. Arch. Europ. J. Physiol.*, 418, 1991, s. 297—299.
- Lehmann-Horn F., Kuther G., Ricker K., Grafe P., Ballanyi K., Rüdell R.:** Adynamia episodica hereditaria with myotonia: a non-inactivating sodium current and the effect of extracellular pH. *Muscle Nerve*, 10, 1987, s. 363—374.
- Lehmann-Horn F., Rüdell R., Ricker K.:** Non-dystrophic myotonias and periodic paralysis. *Neuromusc. Disorders*, 3, 1993, s. 161—168.
- Lerche H., Heine R., Pika U., George A.L., Mitrovic N., Browatzki M., Weiss T., Rivet-Bastide M., Franke C., Lomonaco M.:** Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III—IV linker. *J. Physiol. Lond.*, 470, 1993, s. 13—22.
- Lombet A., Lazdunski M.:** Characterization, solubilization, affinity labelling and purification of the cardiac Na⁺ channels using Tityrus toxin gamma. *Europ. J. Biochem.*, 141, 1984, s. 651—660.
- McClatchey A.I., Lin C.S., Wang J., Hoffmann E.P., Rojas C., Gusella J.F.:** The genomic structure of the human skeletal muscle sodium channel gene. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1992, s. 521—527.
- McClatchey A.I., Van-den Bergh P., Pericak-Vance M.A., Raskind W., Verellen C., McKenna-Yasek D., Rao K., Haines J.L., Bird T., Brown R.H.:** Temperature-sensitive mutations in the III—IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell*, 68, 1992, s. 769—774.
- McPhee J.C., Ragsdale D.S., Scheuer T., Catterall W.A.:** A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *J. Biol. Chem.*, 270, 1995, s. 12025—12034.
- Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T.:** Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature*, 322, 1986, s. 826—828.
- Patton D.E., West J.W., Catterall W.A., Goldin A.L.:** A peptide segment critical for sodium channel inactivation functions as an inactivation gate in a potassium channel. *Neuron*, 11, 1993, s. 967—974.
- Ptáček L.J., George A.L., Barchi R.L., Griggs R.C., Riggs J.E., Robertson M., Leppert M.F.:** Mutations in an S4 segment of the adult skeletal muscle sodium channel cause paramyotonia congenita. *Neuron*, 8, 1992, s. 891—897.
- Ptáček L.J., George A.L., Griggs R.C., Tawil R., Kallen R.G., Barchi R.L., Robertson M., Leppert M.F.:** Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell*, 67, 1991, s. 1021—1027.
- Ptáček L.J., Gouw L., Kwiecinski H., McManis P., Mendell J.R., Barohn R.J., George A.L., Barchi R.L., Robertson M., Leppert M.F.:** Sodium channel mutations in paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis. *Ann. Neurol.*, 33, 1993, s. 300—307.
- Ptáček L.J., Trimmer J.S., Agnew W.S., Roberts J.W., Petajan J.H., Leppert M.:** Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis map to the same sodium—channel gene locus. *Amer. J. Hum. Genet.*, 49, 1991, s. 851—854.
- Ricker K., Moxley R.T., Heine R., Lehmann-Horn F.:** Myotonia fluctuans. A third type of muscle sodium channel disease. *Arch. Neurol.*, 51, 1994, s. 1095—1102.
- Roberts R., Barchi R.L.:** The voltage-sensitive sodium channel from rabbit skeletal muscle: chemical characterization of subunits. *J. Biol. Chem.*, 262, 1987, s. 2298—2303.
- Rojas C.V., Wang J.Z., Schwartz L.S., Hoffmann E.P., Powel B.R., Brown R.H.:** A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na⁺ channel alpha subunit in hyperkalemic periodic paralysis. *Nature*, 354, 1991, s. 387—389.
- Ruščák M.:** Biochemická charakteristika napäťovo závislého sodíkového kanála. *Bratisl. lek. Listy*, 90, 1989, s. 556—564.
- Rüdell R., Ricker K., Lehmann-Horn F.:** Genotype-phenotype correlations in human skeletal muscle sodium channel diseases. *Arch. Neurol.*, 50, 1993, s. 1241—1247.
- Schmidt J.W., Catterall W.A.:** Palmytylation, sulfatation and glycosylation of the alpha subunit of the sodium channel. *J. Biol. Chem.*, 262, 1987, s. 13713—13723.
- Tamkun M.M., Talvenheimo J.A., Catterall W.A.:** The sodium channel from rat brain. Reconstitution of neurotoxin-activated ion flux and scorpion toxin binding from purified components. *J. Biol. Chem.*, 259, 1984, s. 1676—1688.
- Wang J., Dubowitz V., Lehmann-Horn F., Ricker K., Ptáček L., Hoffmann E.P.:** In vivo sodium channel structure/function studies: consecutive Arg 1448 changes to Cys, His and Pro at the extracellular surface of IVS4. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 50, 1995, s. 77—88.
- Wang J.Z., Rojas C.V., Zhou J.H., Schwartz L.S., Nicholas H., Hoffmann E.P.:** Sequence and genomic structure of the human adult skeletal muscle sodium channel alpha subunit gene on 17q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 182, 1992, s. 794—801.
- West J.W., Patton D.E., Scheuer T., Wang Y., Goldin A.L., Catterall W.A.:** A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 10910—10914.
- Wollner D.A., Messner D.J., Catterall W.A.:** Beta2 subunits of sodium channels from vertebrate brains. *J. Biol. Chem.*, 262, 1987, s. 14709—14715.
- Yang N., Horn R.:** Evidence for voltage dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron*, 15, 1995, s. 213—218.
- Zhou J., Hoffmann E.P.:** Pathophysiology of sodium channelopathies. Studies of sodium channel expression by quantitative multiplex fluorescence polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.*, 269, 1994, s. 18563—18571.