

Поиск новых генетических факторов, связанных с развитием гипертрофической кардиомиопатии в российской популяции

Филатова Е.В.¹, Шадрина М.И.¹, Власов И.Н.¹, Крылова Н.С.², Маслова М.Ю.², Потешкина Н.Г.², Сломинский П.А.¹

1 — ФГБУН Институт молекулярной генетики
123182, г. Москва, пл. Курчатова, д.2

2 — ФГБОУ ВО Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самая распространённая форма наследственных заболеваний сердца с преимущественно аутосомно-доминантным типом наследования. Однако до сих пор не выявлены все гены, которые могут быть связаны с патогенезом ГКМП. В связи с этим, целью данной работы стали изучение и поиск новых генетических факторов, связанных развитием ГКМП в российской популяции.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, генетика, секвенирование следующего поколения, целевой экзом.

Для цитирования: Филатова Е.В., Шадрина М.И., Власов И.Н., Крылова Н.С., Маслова М.Ю., Потешкина Н.Г., Сломинский П.А. Поиск новых генетических факторов, связанных с развитием гипертрофической кардиомиопатии в российской популяции. *Медицинская генетика* 2020; 19(5): 6-8.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.6-8

Автор для корреспонденции: Филатова Е.В., e-mail: filatovaev@img.ras.ru

Финансирование. Работа поддержана грантами РФФИ № 19-015-00343, 18-015-00322.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Search for new genetic factors associated with the development of hypertrophic cardiomyopathy in the Russian population

Filatova E.V.¹, Shadrina M.I.¹, Vlasov I.N.¹, Krylova N.S.², Maslova M.S.², Poteshkina N.G.², Slominsky P.A.¹

1 — Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences
Kurchatov Sq. 2, Moscow, 123182, Russia

2 — Pirogov Russian National Research Medical University
Ostrovityanova st. 1, Moscow, 117997, Russia

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common form of inherited heart disease with a predominantly autosomal dominant type of inheritance. However, all genes that may be associated with the pathogenesis of HCM have not yet been identified. In this regard, the aim of this work was to search for new genetic factors associated with the development of HCM in the Russian population.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy, genetics, next generation sequencing, targeted exome.

For citation: Filatova E.V., Shadrina M.I., Vlasov I.N., Krylova N.S., Maslova M.S., Poteshkina N.G., Slominsky P.A. Search for new genetic factors associated with the development of hypertrophic cardiomyopathy in the Russian population. *Medical genetics*. 2020; 19(5): 6-8. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.05.6-8

Corresponding author: Filatova E.V., e-mail: FilatovaEV@img.ras.ru

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grants no. 19-015-00343, 18-015-00322).

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самая распространённая форма наследственных заболеваний сердца, которая характеризуется гипертрофией стенки, как правило, левого желудочка, и встречается в общей популяции с частотой 1:500.

По современным представлениям в большинстве случаев ГКМП – аутосомно-доминантное заболева-

ние. В настоящее время для приблизительно 50 генов и 1500 патогенных вариантов в них показана связь с развитием ГКМП. Однако до сих пор не выявлены все гены, которые могут быть связаны с патогенезом ГКМП, и как минимум в 25% случаев генетическая основа ГКМП остаётся не выявленной. При этом патогенетическая значимость большинства выявленных при

ГКМП мутаций остаётся до конца не выясненной, поскольку из-за низкой встречаемости большинства мутаций в популяции и небольшого размера семей провести косегрегационный анализ в достаточном объёме не представляется возможным.

Таким образом, очень важно изучать генетический ландшафт при ГКМП в различных популяциях, особенно в России, поскольку у российских больных до сих пор не описан полный спектр генов и мутаций, которые вносят вклад в развитие ГКМП в нашей популяции. В связи с этим, целью данной работы стали изучение и поиск новых генетических факторов, связанных развитием ГКМП в российской популяции.

Материалы и методы

В исследуемую выборку вошли 99 неродственных друг другу пациентов с ГКМП. Все они были русскими по происхождению из Московского региона. Всем отобраным пациентам был поставлен диагноз ГКМП в соответствии с Европейскими диагностическими критериями для семейной ГКМП (толщина межжелудочковой перегородки ≥ 15 мм и отсутствие других причин для гипертрофии) на базе ГКБ №52 Крыловой Н.С., доцентом кафедры Общей терапии РНИМУ им. Пирогова. Средний возраст пациентов составил $54,54 \pm 15,48$ лет, в исследование вошли 40 мужчин и 59 женщин. От всех пациентов было получено информированное согласие в соответствии с Хельсинской декларацией. Исследование было одобрено Этическими комитетами РНИМУ и ИМГ РАН.

Геномная ДНК была выделена из цельной крови с помощью набора Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research). Концентрацию ДНК измеряли с использованием флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen) и набора Quant-iT DNA BR Assay Kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Секвенирование экзона проводили с использованием набора SureSelect Focused Exome Enrichment kit (Agilent Technologies, Inc.) и секвенатора Illumina HiSeq 2500. Было проведено секвенирование около 4800 генов и областей генома, для которых показана связь с развитием различных заболеваний, со средним покрытием в 30 прочтений. Некоторые варианты были верифицированы с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Биоинформатический анализ полученных данных проводился с использованием различных биоинформатических ресурсов. Анализ последовательностей проводился в программной среде “R” с использованием данных Ensembl Variation и Ensembl Gene [1], доступ к которым был получен с помощью пакета “R” BioMart [2]. Классификация эффекта замены была проведена

с помощью Variant Effect Predictor [3]. Патогенетическая значимость выявленных вариантов оценивалась с помощью алгоритмов Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT), Rare Exome Variant Ensemble Learner (REVEL) и Combined Annotation Dependent Depletion (CADD). Вариант считали потенциально патогенетически значимым, если оценка Polyphen составляла $>0,5$, SIFT $<0,05$, CADD PHRED >20 и REVEL $>0,5$. Кроме того, патогенетическая значимость выявленных вариантов была оценена с использованием базы данных ClinVar [4].

Подбор направляющих РНК и ДНК-доноров для внесения мутаций в геном модельной линии H9c2 (кардиомиоциты крысы) с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas осуществлялся с помощью ресурсов BLAST, GenBank, CRISPROR Tool. Трансфекция компонентов системы CRISPR/Cas и внесения с её помощью модификаций в геном клеток проводилась с использованием реактивов CRISPRMAX (ThermoFisherScientific) и EnGen Spy Cas9 NLS (NEB) согласно рекомендациям производителей.

Результаты и обсуждение

Проведённое целевое секвенирование ДНК пациентов с ГКМП позволило выявить как спектр патогенетически значимых вариантов в основных генах ГКМП, так и ряд новых вариантов с предполагаемой патогенетической значимостью, характерных для пациентов с ГКМП из России. У пяти пациентов нами были выявлены варианты с доказанной патогенетической значимостью в генах *MYBPC3* и *MYH7*, а также 37 потенциально патогенетически значимых вариантов в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *MYL2*, *MYL3*, *TPM1*, *ACTN2*, *LDB3*, *TTN*, *MYH6*, *TCAP*, *NEXN*, *TRIM63*, *VCL*, включая несколько впервые выявленных вариантов в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TPM1*, *NEXN*, *TTN*. Общая частота выявленных в основных генах ГКМП патогенетически значимых вариантов в российской популяции составила 20%, что в два раза ниже, чем в среднем в мире. Таким образом, проведённый клинико-генетический анализ позволил выявить небольшой вклад известных отдельных патогенетически значимых вариантов и генов в развитие ГКМП в российской популяции.

Кроме того, нами ведётся изучение влияния выявленных патогенетически значимых вариантов в генах *MYBPC3* и *MYH7* на фенотип кардиомиоцитов с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas в культуре клеток H9c2. В настоящее время получены первые данные, свидетельствующие о том, что патогенные варианты могут приводить к изменению фенотипа кардиомиоцитов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о потенциальной патогенетической значимости выявленных вариантов для развития ГКМП. В целом полученные нами данные расширяют наши представления о механизмах развития ГКМП и работы сердечно-сосудистой системы в целом.

Благодарности. Работа была выполнена с помощью оборудования Центра коллективного пользования «Центр клеточных и генных технологий» Института молекулярной генетики.

Литература/References

1. Zerbino D. R. et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46: D754-D761. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx1098>.
2. Smedley D. et al. The BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data repositories. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: W589-598. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv350>.
3. McLaren W. et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016; 17: 122. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
4. Landrum M. J. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46: D1062-D1067. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx1153>