

# Спектр мутаций в гене *MYBPC3* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией

Поляк М.Е., Ховалыг А.Б., Букаева А.А., Дземешкевич С.Л., Заклязьминская Е.В.

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского», Москва, Россия; margaritapolyak@gmail.com

**Актуальность.** Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является одним из самых частых моногенных заболеваний сердца. Диагностика первичной ГКМП затруднительна из-за необходимости исключения большого количества причин вторичной гипертрофии миокарда. Генетические причины первичной ГКМП также разнообразны — при полном скрининге всех известных генов, ответственных за ГКМП, удастся выявить мутации в 60% семейных случаев. **Целью** данной работы было изучение спектра мутаций в гене *MYBPC3* и оценка его вклада в развитие гипертрофии миокарда в группе российских пациентов. **Материалы и методы.** Работа была выполнена на образцах ДНК 77 пациентов. Поиск мутаций в генах, ответственных за развитие ГКМП, проводился либо методом прямого секвенирования по Сенгеру гена *MYBPC3*, либо методом полупроводникового секвенирования гена *MYBPC3* в составе панели генов на платформе IonTorrent с последующим подтверждением выявленных генетических вариантов методом секвенирования по Сенгеру. **Результаты и обсуждение.** В гене *MYBPC3* были выявлены 6 мутаций в 10 неродственных семьях, что составило 13% случаев. Было также обнаружено 4 варианта с неизвестным клиническим значением (VUCS) в 5 неродственных семьях и 2 частых полиморфизма в кодирующей области. Нон-сенс-мутация p.Q1233X встретилась в пяти неродственных семьях, что составляет 6,5% случаев. **Выводы.** Мутации в гене *MYBPC3* были обнаружены у 10 неродственных пробандов, что составило 13% случаев. Относительно невысокая частота может быть обусловлена клинической гетерогенностью группы, тем не менее, поиск мутаций в отдельных генах при подозрении на ГКМП представляется менее целесообразным по сравнению с использованием таргетных панелей генов.

**Ключевые слова:** гипертрофическая кардиомиопатия, ген *MYBPC3*, секвенирование, таргетные панели генов

## Введение

В настоящее время известно около 2500 моногенных заболеваний, при которых сердце и/или сосуды вовлечены в патологический процесс. Описано около сотни заболеваний, при которых поражения сердца и сосудов являются ведущими в клинической картине. Кардиомиопатии — заболевания миокарда, при которых сердечная мышца структурно и функционально изменена в отсутствие патологии коронарных артерий, артериальной гипертензии и поражения клапанного аппарата. Согласно руководству Европейского общества кардиологов (2014) [1], кардиомиопатии классифицируются в соответствии со специфическими морфологическими и/или функциональными критериями, а затем подразделяются на подтипы в зависимости от генетически или негенетически детерминированного характера заболевания. По данным Erdmann J et al. [2], на долю ГКМП приходится до 60% случаев первичных кардиомиопатий.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) характеризуется первичным (не связанным с другими заболеваниями) утолщением стенок левого желудочка (ЛЖ) и/или межжелудочковой перегородки (МЖП), с возможным вовлечением в процесс правого желудочка. В среднем, частота ГКМП оценивается как 1:500, что делает ГКМП одним из самых частых заболеваний. Доля истинно наследственных форм неизвестна, по приблизительным оценкам, около половины случаев ГКМП являются генетически детерминированными.

Диагностика ГКМП проводится методами электрокардиографии, эхокардиографии и МРТ согласно разработанным диагностическим критериям [3], однако, несмотря на хороший доступный уровень визуализации, постановка диагноза «ГКМП» сопряжена с определенными трудностями. Диагноз «ГКМП» является диагнозом исключения. Для того, чтобы сделать вывод о первичной природе ГКМП, необходимо исключить довольно широкий спектр патологий, приводящих к вторичной ГКМП. Так, длительно текущая артериальная гипертензия может приводить к развитию компенсаторной гипертрофии миокарда. В этом случае кардиолог должен решить, является ли артериальная гипертензия достаточной причиной для развития ГКМП той или иной степени.

Подтверждением диагноза «первичная ГКМП» возможно молекулярно-генетическими методами. Наиболее частые генетические формы ГКМП связаны с мутациями в генах миофиламентов. Известны более 20 генов, кодирующих 3 функциональных класса белков, мутации в которых могут привести к заболеванию: белки миофиламентов, Z-дисков, и вовлеченные в сигнальный путь регуляции  $\text{Ca}^{+2}$ -опосредованного высвобождения кальция. К генам, вовлеченным в патогенез при ГКМП, относятся гены  $\beta$ -миозина, миозин-связывающего белка C, сердечных тропонинов T, C, I, легких цепей миозина, сердечного  $\alpha$ -актина, титина и др. При полном скрининге всех известных генов, ответственных за ГКМП, удастся выявить мутации в 60% семейных случаев. Такой же объем исследований у больных спора-

дическими формами ГКМП позволяет установить молекулярную причину заболевания не более чем у 30% больных.

Частоты встречаемости мутаций в генах, ответственных за развитие ГКМП, сильно варьируют. По данным нескольких исследований, на долю генов *MYH7* и *MYBPC3* приходится до 80% подтвержденных молекулярно-генетическими методами случаев первичной ГКМП. В данной работе мы представляем результаты анализа спектра генетических вариантов в гене *MYBPC3* у пациентов с гипертрофией миокарда.

### Материалы и методы

Работа была выполнена на образцах ДНК 77 пациентов, обратившихся в РНЦХ за лечением или медико-генетическим консультированием. Для анализа использовались архивные клинические данные и результаты актуальных исследований. От всех пациентов и доноров было получено информированное согласие на забор, хранение и использование в исследовательских целях биологического материала (венозная кровь). Критерием включения в исследование являлось наличие гипертрофии миокарда, обнаруженное методами эхокардиографии и/или МРТ, и подозрение на первичный характер заболевания.

Выделение ДНК из крови проводилось методом фено-хлороформной экстракции и с использованием коммерческого набора Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Амплификация кодирующих и прилегающих интронных областей проводилась методом ПЦР. Поиск мутаций в генах, ответственных за развитие ГКМП, проводился либо методом прямого секвенирования по Сенгеру генов *MYBPC3*, *MYH7*, либо методом полупроводникового секвенирования генов *MYBPC3*, *MYH7*, *ACTC1*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ZASP*, *TAZ*, *TNNT2*, *TNNI3* на платформе IonTorrent с последующим подтверждением выявленных генетических вариантов методом секвенирования по Сенгеру. Обработка результатов секвенирования проводилась с помощью программы Chromas и IGV. В качестве последовательности сравнения использовалась референсная последовательность базы данных NCBI RefSeq NG\_007667. Биоинформатический анализ выявленных генетических вариантов проводился с помощью ресурсов PolyPhen2, SIFT и NetGene2.

### Результаты и обсуждение

У всех пациентов был выполнен анализ кодирующей последовательности прилегающих интронных областей гена *MYBPC3*. Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-амплификации кодирующих и прилегающих интронных областей с последующим секвенированием методом Сенгера были подобраны с помощью ресурсов PerlPrimer и PrimerQuest (последовательности прайме-

ров доступны по запросу). Были выявлены 6 мутаций в 10 неродственных семьях, что составило 13% случаев. Было также обнаружено 4 варианта с неизвестным клиническим значением (VUCS) в 5 неродственных семьях. Кроме того, были идентифицированы 2 частых полиморфизма в кодирующей области, не имеющие, по данным литературы, выраженного клинического значения. Выявлено в общей сложности 12 генетических вариантов, из них 6 (50%) составляют мутации, 4 (33%) — VUCS и 2 (17%) приходится на долю частых полиморфизмов. Список выявленных мутаций представлен в таблице.

Таблица  
Список выявленных мутаций в гене *MYBPC3*

| №  | Мутация               | Число неродственных семей, в которых выявлена указанная мутация |
|----|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1. | c.1629_1630delGAinsAG | 1                                                               |
| 2. | c.2781_2782insCACAA   | 1                                                               |
| 3. | p.Q1233X              | 5                                                               |
| 4. | p.R943X               | 1                                                               |
| 5. | p.N515del             | 1                                                               |
| 6. | p.S217G               | 1                                                               |

Из выявленных шести мутаций 1 является миссенс-, 2 — нонсенс-, 2 — инсерция/делеция и 1 — делеция трех нуклеотидов без сдвига рамки считывания. Распределение генетических вариантов в гене *MYBPC3* представлено на рис. 1.

Было выявлено 4 варианта с неизвестным или спорным клиническим значением: p.E619K, p.F621L, p.V896M и p.R1048H.

Наблюдалось скопление генетических вариантов в экзонах 17—19 и 26—29. Однако небольшое количество обнаруженных мутаций не позволяет говорить об этих экзонах, как о «горячих точках» гена *MYBPC3*. Единственная мутация, обнаруженная нами в нескольких семьях, — нонсенс-мутация p.Q1233X. Она встре-

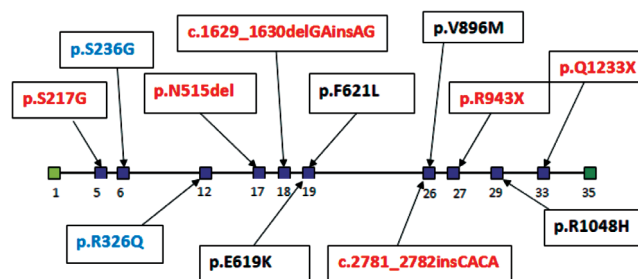


Рис. 1. Распределение найденных генетических вариантов в гене *MYBPC3*. Красным цветом указаны мутации, черным — генетические варианты с неизвестным или спорным клиническим значением, синим — частые полиморфизмы

тилась в пяти неродственных семьях, что составляет 6,5% случаев. Нонсенс-мутация в гетерозиготном состоянии *p.Q1233X* была обнаружена в 33 экзоне гена *MYBPC3* у пациентов из 5 неродственных семей. У всех носителей данной мутации в экзоне 12 гена *MYBPC3* был обнаружен генетический вариант *p.R326Q* в гетерозиготном состоянии. В одной семье наблюдалась со-

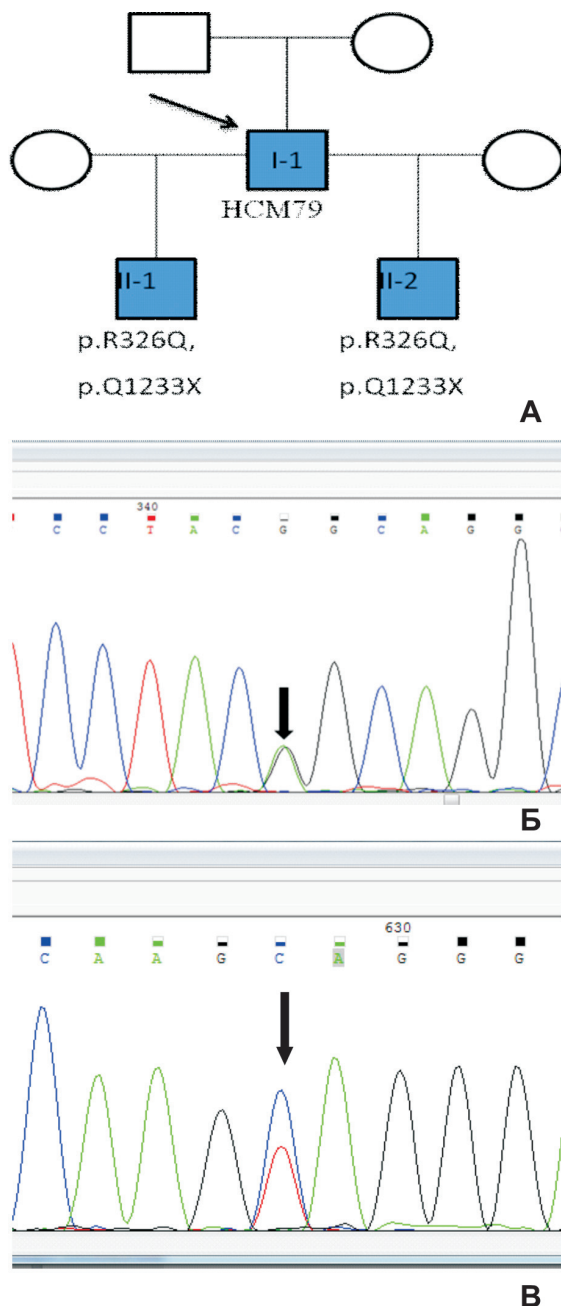


Рис. 2. А — родословная семьи с совместной передачей генетического варианта *p.R326Q* и мутации *p.Q1233\**. Б — фрагмент хроматограммы с генетическим вариантом *p.R326Q* в гетерозиготном состоянии. В — фрагмент хроматограммы с мутацией *p.Q1233\** в гетерозиготном состоянии.

вместная передача генетических вариантов *p.Q1233X* и *p.R326Q* от отца обоим сыновьям. Родословная данной семьи и фрагменты хроматограмм в генетическими вариантами *p.R326Q* и *p.Q1233\** представлены на рис. 2 (А, Б и В соответственно). Для генетических вариантов *p.R326Q* и *p.Q1233\** был проведен анализ частот в контрольной группе, состоящей из 103 условно здоровых доноров. Для анализа частоты генетического варианта *p.R326Q* в контрольной группе применялись модификации стандартных методов: ПЦР с введением сайтов рестрикции (ACRS-PCR — artificially created restriction site) в комбинации с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и детекцией в полиакриламидном геле. Из 103 условно здоровых доноров шестеро (5,8%) оказались носителями генетического варианта *p.R326Q*, частота аллеля в контрольной группе составила 2,9%.

Полученный результат согласуется с данными литературы [4]. Однако, по данным открытых источников, частота генетического варианта *p.R326Q* очень низкая — 0,0055/509 (ExAC), 0,0008/4 (1000 Genomes), 0,0025/32 (GO-ESP). Возможно, это связано с преобладанием данного генетического варианта в отдельных популяциях.

В ранних исследованиях ГКМП генетический вариант *p.R326Q* интерпретировался как «мягкая» мутация. Недавно была проведена переоценка его потенциального функционального значения, и вариант *p.R326Q* был классифицирован как VUCS [5]. Полученные нами данные о высокой частоте генетического варианта *p.R326Q* в популяции позволяют предположить, что данный вариант является не VUCS, а полиморфизмом, не имеющим клинического значения.

Поскольку было установлено, что генетические варианты *p.R326Q* и *p.Q1233X* лежат в одном аллеле, шестерым условно здоровым носителям замены *p.R326Q* было проведено секвенирование по Сенгеру 33 экзона гена *MYBPC3* с целью оценки встречаемости генетического варианта *p.Q1233X*. В исследованных образцах ДНК здоровых доноров генетического варианта *p.Q1233X* обнаружено не было.

Для вариантов с неустановленным или спорным клиническим значением был проведен биоинформатический анализ с помощью ресурсов PolyPhen2 и SIFT. По результатам биоинформатического анализа были получены данные в пользу потенциальной патогенности генетических вариантов *p.F621L* и *p.R1048H*.

## Выводы

В ходе проведенной ДНК-диагностики группе из 77 пациентов с гипертрофией миокарда мутации в гене *MYBPC3* были обнаружены у 10 неродственных пробандов, что составило 13% случаев. Было также обнаружено 4 варианта с неустановленным или спорным клиническим значением, два из которых после биоин-

форматического анализа были признаны потенциально патогенными. Относительно невысокий процент выявленных мутаций может быть обусловлен гетерогенностью группы пациентов: поскольку ГКМП является диагнозом исключения, проведение дифференциальной диагностики между первичной и вторичной ГКМП, а также между вторичной ГКМП и сочетанием первичной ГКМП с другой патологией сердца, зачастую затруднительно. Глубокое фенотипирование носителей мутаций может установить характерные особенности отдельных генетических вариантов ГКМП, что облегчит в дальнейшем дифференциальную диагностику. Однако для проведения глубокого фенотипирования необходима клиническая информация большого числа пациентов-носителей одинаковой мутации. В связи с этим поиск мутаций в отдельных генах представляется менее перспективным, чем использование таргетных панелей генов.

### Список литературы

1. The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC): Perry M. Elliott\* (Chairperson) (UK) Aris Anastasakis (Greece), Michael A. Borger (Germany) .Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy ESC 2014
2. Erdmann J, Hafer A, von Tenspolde W, Binner P, Scheffold T. Vererbung der hypertrophen Kardiomyopathie. Symptomfreie Krankheitsträger molekulargenetisch identifizieren. Cardio Vasc, 6(2): 32-5 (2006)
3. McKenna W.J., Spirito P., Desnos M. Experience from clinical genetics in hypertrophic cardiomyopathy: proposal for new diagnostic criteria in adult members of affected families. Heart 1997;77: 130-132.
4. Голубенко М.В., Макеева О.А., Пузырев К.В., Пузырев В.П. Исследование полиморфизма генов тяжелой цепи  $\beta$ -миозина (*MYH7*) и миозинсвязывающего белка C (*MYBPC3*) при гипертрофической кардиомиопатии и эссенциальной гипертензии. // Медицинская Генетика, 2003. — Т. 2, №1. — с. 35-40.
5. Jipin Das K, M.B.B.S., Jodie Ingles, Ph.D., GradDipGenCouns. Determining pathogenicity of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy: importance of periodic reassessment. Volume 16 ,Number 4. April 2014. Genetics in medicine.

## Mutation spectrum in *MYBPC3* gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy

Polyak M.E., Khovalyg A.B., Bukaeva A.A., Dzemeshevich S.L., Zaklyazminskaya E.V.

Petrovsky Russian Research Centre of Surgery, Moscow, Russia, margaritapolyak@gmail.com

**Introduction.** Hypertrophic cardiomyopathy is one of the most frequent monogenic cardiovascular diseases. However, diagnosis of primary HCM is very challenging due to many causes of secondary hypertrophy. Genetic causes of HCM are also quite diverse — after screening of all causative genes known, mutations can be identified in 60% of familial cases. **The aim** of this study was to investigate mutation spectrum of *MYBPC3* gene in the group of patients with myocardium hypertrophy. **Material and methods.** DNA samples of 77 patients with myocardium hypertrophy were collected. Mutation screening was performed by Sanger sequencing of *MYBPC3* gene or by semiconductor sequencing of *MYBPC3* gene as a part of gene panel on Ion Torrent platform followed by confirmation of detected variants by Sanger sequencing. **Results and discussion.** In *MYBPC3* gene 6 mutations were detected in 10 unrelated families. Also 4 variants of unknown clinical significance were found and 2 frequent coding polymorphisms. Nonsense mutation p.Q1233\* was found in 5 unrelated families (6.5% of cases). **Conclusion.** Mutations in *MYBPC3* gene were detected in 10 unrelated probands. Relatively low frequency of *MYBPC3* mutations can be due to clinical heterogeneity of myocardium hypertrophy. Nevertheless, screening of gene panels appears to be more promising in HCM patients, than partial sequencing of genes involved.

**Key words:** hypertrophic cardiomyopathy, *MYBPC3* gene, sequencing, gene panels