

Семейный случай дилатационной кардиомиопатии, ассоциированной с мутацией в гене фактора сплайсинга RBM20

Сивицкая Л.Н.¹, Вайханская Т.Г.², Левданский О.Д.¹, Курушко Т.В.², Даниленко Н.Г.¹

¹ — Институт генетики и цитологии Национальной Академии Наук Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь, cytoplasmic@mail.ru

² — Республиканский научно-практический центр «Кардиология», ул. Р. Люксембург, 110, 220036, г. Минск, Беларусь

В статье представлена семья, в которой на протяжении двух поколений регистрировались случаи дилатационной кардиомиопатии (ДКМП). Целью исследования было определить генетическую причину развития этого заболевания. Материалом служили образцы ДНК, полученные из буккального эпителия пробанда и членов семьи. Методы: клинические и лабораторные методы для установления и верификации диагноза, NGS и прямое секвенирование для определения патогенного варианта, вызвавшего развитие кардиомиопатии. Результаты: выявлена гетерозиготная мутация с.1901G>A в гене фактора альтернативного сплайсинга *RBM20* (10q25.2), приводящая к замещению высоко консервативного аргининового остатка на глутаминовый в RS-домене белка — p.R634Q. Ее носительство cosegregировало с фенотипом ДКМП у членов семьи. Мутации в этом гене приводят к нарушению альтернативного сплайсинга и образованию нетипичных вариантов зрелой мРНК. Приведены публикации о роли *RBM20* в регулировании сплайсинга генов, экспрессируемых в сердечной мышце. Выводы: вариант с.1901G>A в гене *RBM20* следует рассматривать как патогенный. Молекулярно-генетический анализ позволил уточнить диагноз пробанда и ее сына — ДКМП 1DD.

Ключевые слова: дилатационная кардиомиопатия, *RBM20*, альтернативный сплайсинг, NGS.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке НТП Союзного государства «ДНК-идентификация».

Family dilated cardiomyopathy case associated with mutation in the splicing factor gene RBM20

Sivitskaya L.N.¹, Vaikhanskaya T.G.², Liaudanski A.D.¹, Kurushka T.V.², Danilenko N.G.¹

¹ — Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Academicheskaya str. 27, 220072, Minsk, Belarus, cytoplasmic@mail.ru

² — Republican Scientific and Practical Centre «Cardiology», R. Luxemburg st., 110B, 220036, Minsk, Belarus

The article presents a family with cases of dilated cardiomyopathy (DCM) registered for two generations. The study aim was to determine the genetic cause of the disease development. Materials: DNA samples obtained from the buccal epithelium of the proband and family members. Methods: clinical and laboratory methods for diagnosis establishing and verifying, NGS and direct sequencing for the definition of the pathogenic variant leading to the cardiomyopathy. Results: a heterozygous mutation c.1901G>A was identified in the gene of the alternative splicing factor *RBM20* (10q25.2), leading to the replacement of the highly conserved arginine residue by glutamine in the RS domain of the protein — p.R634Q. Its carriage co-segregated with the DCM phenotype in family members. Mutations in this gene lead to the alternative splicing disruption and the formation of atypical mRNA variants. Published articles about the splicing regulation of genes expressed in the cardiac muscle by *RBM20* are reviewed. Conclusion: variant c.1901G>A in the *RBM20* gene should be considered as pathogenic. The molecular genetic analysis specified the diagnosis of the proband and her son — DCM 1DD.

Key words: dilated cardiomyopathy, *RBM20*, alternative splicing, NGS.

Введение

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является наиболее частым типом кардиомиопатий и характеризуется дилатацией левого или обоих желудочков, ослаблением систолической функции сердца при отсутствии ишемической болезни, артериальной гипертензии и объемной пе-

регрузки вследствие клапанной патологии. Около 35% случаев ДКМП являются семейными и связаны с генетическими причинами, а именно мутациями в генах, кодирующих белки цитоскелета, саркомера, ионных каналов, десмосом, митохондрий, ядра и др. Кроме того, описано несколько факторов сплайсинга, нарушения в работе ко-

торых приводят к развитию кардиомиопатий, в том числе дилатационной [1]. Среди прочих, такая взаимосвязь была обнаружена для гена *RBM20* (RNA-binding motif protein 20, 10q25.2), мутации в котором приводят к изменению альтернативного сплайсинга [2–4]. Нарушения именно в этом гене преобладают в группе пациентов молодого возраста (средний возраст 28,5 лет) с трансплантацией сердца вследствие ДКМП [2, 5].

Ген *RBM20* (10q25.2) состоит из 14 экзонов и кодирует белок, содержащий мотив для распознавания РНК. Основным местом его экспрессии является сердечная мышца, в меньшей степени скелетные мышцы. Белок *RBM20* необходим для сборки сплайсосомы и регулирования альтернативного сплайсинга посредством распознавания интронных UCUU-элементов, расположенных вблизи дифференциально сплайсируемых экзонов. Транскрипты многих генов, экспрессирующиеся в сердечной мышце, имеют UCUU мотив и поэтому являются мишенью для связывания с *RBM20*. В работе Maatz с соавт. (2014) показано, что альтернативный сплайсинг 18 генов напрямую регулируется *RBM20* [6]. Среди них *TTN*, *NEXN*, *MYH7*, *TNNT2*, *RYR2*, нарушения в которых приводят к развитию ДКМП. В норме в состав их зрелой мРНК не попадают взаимоисключающие экзоны, что приводит к синтезу тканеспецифичных вариан-

тов РНК. Мутации в гене *RBM20* влекут за собой нарушения в альтернативном сплайсинге и образование нетипичных вариантов зрелой мРНК, часто не характерных для сердечной мышцы. Такие изменения приводят к развитию агрессивных форм ДКМП, сопровождающихся желудочковыми аритмиями, остановкой сердца и внезапной сердечной смертью [6, 7].

В статье представлен семейный случай ДКМП, ассоциированной с мутацией в гене *RBM20*.

Материалы и методы

Клинический случай

У пробанда К. (1974 г.р., жен.) жалобы на чувство нарушения сердечного ритма и одышка при быстрой ходьбе впервые появились в 30-летнем возрасте. При клиническом обследовании выявлены нарушения сердечного ритма и проводимости в виде желудочковой экстрасистолии и неспецифической внутрижелудочковой блокады. При суточном мониторинге ЭКГ регистрировалась желудочковая эктопия с индексом от 1% до 15%. При отсутствии структурных изменений в сердце по данным эхокардиографического (ЭхоКГ) исследования, пациентке была назначена эффективная антиаритмическая терапия. У кардиолога пациентка в дальнейшем не наблюдалась.

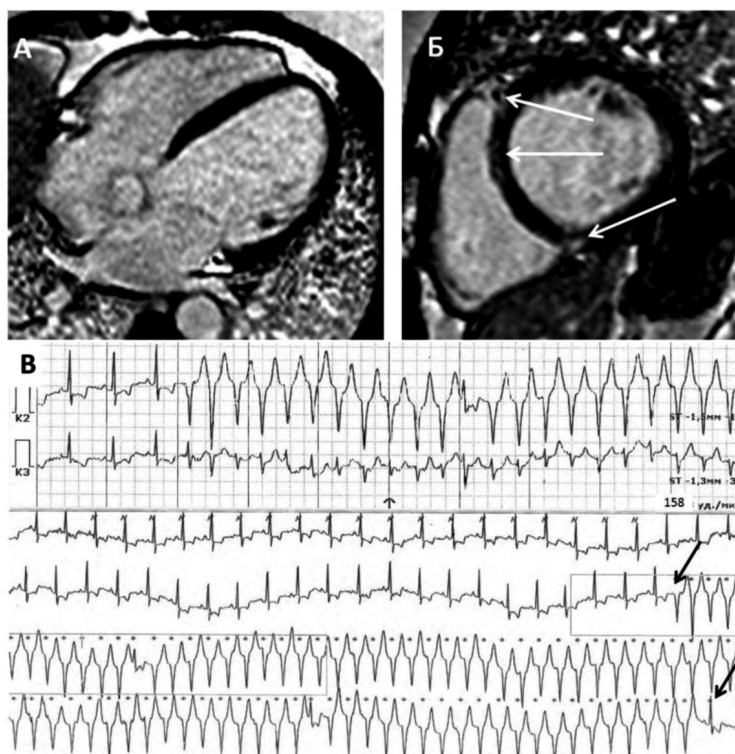


Рис. 1. МРТ сердца с контрастным усилением у пробанда К.: А — стандартная 4-камерная позиция по длинной оси в конечную диастолу сердечного цикла — признаки дилатации левого предсердия и обоих желудочков; Б — проекция по короткой оси — признаки отсроченного накопления контрастного вещества (гадолиний) в точках прикрепления свободной стенки ПЖ и в средне-базальных сегментах межжелудочковой перегородки. Зоны фиброза указаны стрелками. В — фрагмент суточного мониторинга ЭКГ. Стрелками обозначены начало пароксизма желудочковой тахикардии и восстановление синусового ритма.

Через 10 лет при резком ухудшении клинического состояния при ЭхоКГ впервые была выявлена дилатация левых отделов сердца с диффузным гипокинезом миокарда левого желудочка (ЛЖ) и нарушение локальной сократительной функции правого желудочка (ПЖ). Параметры ЛЖ в В-режиме: КДО 244 мл, КСО 153 мл, ФВ 37%, КДД 69 мм; параметры ПЖ в В-режиме: КДО 82 мл, КСО 56 мл, ФВ 32%.

МРТ с контрастным усилением выявило признаки ДКМП: бивентрикулярное расширение полостей сердца со снижением глобальной и нарушением локальной сократительной функции. В отсроченную фазу сканирования зоны фокального накопления контрастного вещества определялись в точках прикрепления свободной стенки ПЖ и в средне-базальных сегментах межжелудочковой перегородки (рис. 1).

При динамическом суточном мониторинровании ЭКГ на фоне медикаментозной терапии (иАПФ + бета-блокатор, наблюдение составило 28 месяцев) клинически значимой эктопии не регистрировалось (до 300 ЖЭС/сут., единичные). Пациентка почувствовала себя значительно лучше и самостоятельно отменила прием лекарственных средств. После 3-месячной отмены базовой терапии при контрольном суточном мониторинровании выявлено патологическое количество желудочковых экстрасистол (7856 ЖЭС: одиночные, парные, групповые и два пароксизма неустойчивой мономорфной желудочковой тахикардии (ЖТ) с ЧСС 158 уд./мин). Фрагмент суточного мониторинрования ЭКГ с пароксизмом ЖТ представлен на рис. 1.

При каскадном семейном обследовании фенотип ДКМП выявлен у сына пациентки (III-2) (рис. 2). По данным ЭхоКГ у 18-летнего юноши обнаружено расширение полости ЛЖ со снижением глобальной и локальной сократительных функций ЛЖ (ФВ 40%), а также незначительное снижение глобальной сократительной функции ПЖ. При МРТ-исследовании выявлены признаки отсроченного накопления контрастного вещества (гадолиний) в нижних точках прикрепления свободной стенки ПЖ. На ЭКГ зарегистрированы признаки полной блокады правой ножки пучка Гиса. При суточном мониторинровании патологической эктопической активности не выявлено.

Генетические исследования

От пробанда К. и его родственников было получено письменное информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования образцов биологического материала и разрешение на анонимную публикацию результатов. Биологическим материалом послужили буккальные эпителиоциты ротовой полости. Выделение ДНК осуществляли фенол-хлороформным методом с использованием протеинкиназы К по стандартному протоколу.

NGS

Геномная ДНК пациента К. была использована для next-generation sequencing (NGS) на приборе MiSeq System (Illumina Inc., USA). Секвенирование было выполнено с использованием коммерческой панели True Sight Cardio Sequencing Kit (Illumina Inc., USA), охватываю-

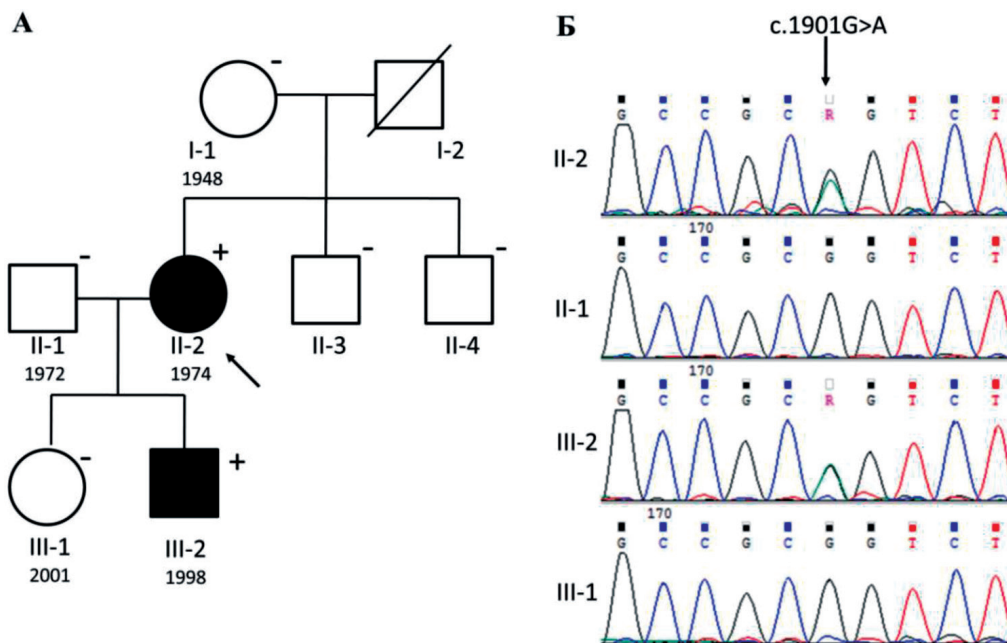


Рис. 2. А – Генеалогическое древо семьи пациента. Символом (-) и (+) обозначено отсутствие или наличие мутации по результатам ДНК-анализа, отсутствие символа – ДНК-анализ не был проведен. Указаны годы рождения членов семьи. Б – Результаты секвенирования по Сэнгеру родственников пробанда К.

шей 174 гена, изменения в которых приводят к развитию кардиомиопатий различного генеза.

Оценку качества «сырых» данных NGS формата FASTQ проводили с использованием программы FASTQC. Картирование прочтений выполняли с помощью BWA на референсный геном UCSC hg19 (NCBI build37). Первичное аннотирование осуществляли ресурсами SAMtools v.1.18 и GATK v3.2/2 с образованием «сырого» VCF-файла. Дальнейшее аннотирование вариантов было выполнено в программе ANNOVAR [8] с использованием баз данных «1000 Genomes Project», Exome Aggregation Consortium, «Exome sequencing project», ClinVar, Reveal [9].

Секвенирование по Сэнгеру

Метод секвенирования по Сэнгеру был использован для проверки вариантов, идентифицированных при NGS как потенциально патогенные у пробанда К. и родственников. Секвенирование выполняли с использованием Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit согласно протоколу производителя на приборе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Праймеры были разработаны с помощью NCBI/Primer-BLAST и синтезированы в ОДО «Праймтех» (Минск, Беларусь). Нуклеотидная последовательность праймеров и условия ПЦР доступны по запросу.

Результаты и обсуждение

В результате NGS у пациента К. была выявлена гетерозиготная замена в 9-м экзоне гена *RBM20* — с.1901G>A (NM_001134363, rs267607001). Эта мутация приводит к замещению высоко консервативного аргининового остатка на глутаминовый в RS-домене белка — р.R634Q. Генетическое тестирование родственников пробанда выявило эту же замену у сына и исключило носительство у других родственников, что указывает на положительную сегрегацию мутации и ДКМП фенотипа в семье (рис. 2). Смерть отца в возрасте 60 лет не была связана с заболеванием сердца.

Несмотря на то, что замена с.1901G>A зарегистрирована в Exome Variant Server и NCBI dbSNP, ее частота в контрольных выборках «1000 Genomes», ESP6500 и ExAC не приводится. Алгоритмы предсказания патогенности расценивают эту мутацию как вероятно патогенную.

Впервые р.R634Q была описана Brauch с соавт. (2009) в норвежской семье, где на протяжении 4 поколений регистрировались случаи ДКМП и внезапной сердечной смерти [2]. Носительство этой мутации у членов семьи косегрегировало с ДКМП и являлось основной причиной сердечной смерти. В 2010 Li с соавт. также описали случаи дилатационной кардиомиопатии, ассоциированной с заменой в кодоне 634 [3].

Экзон 9 гена *RBM20* кодирует RS-домен, богатый аргинином и серином (Arginine-Serine rich domen). Имен-

но в нем описан ряд патогенных мутаций, ассоциированных с ДКМП, в связи с чем он считается «горячей точкой». Показано, что этот домен ответственен за взаимодействие с белками, входящими в состав сплайсосомы. Мутации в нем нарушают связь *RBM20* с факторами альтернативного сплайсинга, при этом не мешая взаимодействию с коровыми факторами. В работе Maatz с соавт. (2014) проанализировано 97 экзонов, регулируемых *RBM20*. Было показано, что их сплайсинг значительно чаще подавляется, нежели активируется *RBM20*. Таким образом, этот фактор чаще выступает в качестве выборочного репрессора сплайсинга, не позволяя включаться в состав зрелой мРНК тем экзонам, которые не характерны для сердечной ткани. Мутации в гене *RBM20*, в том числе в RS-домене, приводят к потере функции подавления сплайсинга отдельных экзонов и образованию нетипичных форм мРНК [6].

Такой механизм включения/исключения экзонов показан для ряда генов, экспрессируемых в сердце. Например, ген *TTN*, кодирующий эластичный белок саркомера — титин, является первоочередной мишенью для *RBM20* [6]. Известно множество изоформ титина, которые образуются благодаря альтернативному сплайсингу. Наиболее распространены N2B и N2BA, экспрессируемые в разные периоды онтогенеза. Соотношение этих изоформ определяет пассивную жесткость миокарда. Их «смена» после рождения человека необходима для выполнения надлежащей диастолической функции сердца [7, 10]. Мутации в гене *RBM20* приводят к изменению соотношения изоформ титина и, как следствие, к развитию ДКМП. Отметим, что на долю ДКМП, развившейся в результате нарушений в гене *TTN*, приходится до 25% случаев. Из них в 31% случаев причиной являются сплайсинг-мутации, что подтверждает патогенность неверно сплайсированных форм титина [7].

Другой ген — *PDLIM3* — кодирует белок, связывающий альфа-актинин в Z-диске миофибрилл. Известны две изоформы *PDLIM3*, экспрессируемые в сердечной и скелетной мышечной ткани. В сердце основной является форма, в состав которой входит экзон 4 и исключены экзоны 5 и 6, характерные для скелетной мускулатуры человека и мыши. При дефиците *RBM20* у мышей наблюдался сдвиг в пользу преобладания изоформы с экзонами 5 и 6 в сердце, что приводило к развитию кардиомиопатии [6].

К генам, альтернативный сплайсинг которых напрямую регулируется *RBM20*, кроме упомянутых выше, относятся *NEXN*, *MYH7*, *TNNT2*, *RYR2*, *SORBS1*, *RTN4*, *OBSCN*, *MYOM1*, *LRRFI1*, *MLIP*, *LMO7*, *LDB3*, *LMMT*, *ENAH*, *DST*, *SAMK2D*. Все они имеют несколько изоформ, среди которых есть специфичные для сердечной ткани. Посредством *RBM20* можно регулировать их синтез, в связи с чем этот фактор сплайсинга рассматривают как потенциальную мишень при разработке препаратов для лечения кардиомиопатий [11].

Заключение

Методом NGS была определена генетическая причина развития дилатационной кардиомиопатии в семье, где на протяжении двух поколений регистрировались случаи этого заболевания. Носительство мутации с.1901G>A в гене *RBM20* cosegregировало с фенотипом ДКМП у членов семьи. По совокупности сведений, включая данные научной литературы и популяционных баз, этот вариант следует рассматривать как патогенный. Таким образом, молекулярно-генетический анализ пробанду и ее сыну позволил установить диагноз ДКМП 1DD (OMIM#613172).

Список литературы

1. Beqalli A. Alternative splicing in cardiomyopathy. *Biophys Rev.* 2018;10(4):1061-1071.
2. Brauch KM, Karst ML, Herron KJ, et al. Mutations in RNA binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(10):930-941.
3. Li D, Morales A, Gonzalez-Quintana J, et al. Identification of novel mutations in *RBM20* in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci.* 2010;3(3):90-97.
4. Refaat MM, Lubitz SA, Makino S, et al. Genetic variation in the alternative splicing regulator, *RBM20*, is associated with dilated cardiomyopathy. *Heart Rhythm.* 2012;9(3):390-396.
5. Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, Amr A et al. Genotype-phenotype associations in dilated cardiomyopathy: meta-analysis on more than 8000 individuals. *Clin Res Cardiol* (2017) 106: 127-139.
6. Maatz H, Jens M, Liss M, et al. RNA-binding protein *RBM20* represses splicing to orchestrate cardiac pre-mRNA processing. *J Clin Invest.* 2014;124(8):3419-3430.
7. Zahr HC, Jaalouk DE. Exploring the crosstalk between *LMNA* and splicing machinery gene mutations in dilated cardiomyopathy. *Front Genet.* 2018;9:231.
8. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research.* 2010;38:e164
9. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):877-885.
10. Guo W, Schafer S, Greaser ML, et al. *RBM20*, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nat med.* 2012;18(5):766-773.
11. Guo W, Sun M. *RBM20*, a potential target for treatment of cardiomyopathy via titin isoform switching. *Biophys Rev.* 2018;10(1):15-25.