DOI: 10.48305/jims.v42.i774.0574

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و دوم/شماره‌ی ۷۷٤/هفته‌ی دوم شهریور ۱٤۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۴ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۶/۱۵

استفاده از روش توالی‌یابی اگزوم در شناسایی جهش‌های ژنتیکی کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک و کاردیومیوپاتی اتساعی

دینازهرا مختاری[۱]، فاطمه اکبریان[۲]، پریسا علی‌دوست سلیمی[۳]، سمیرا کلائی نیا[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک و کاردیومیوپاتی اتساعی، عمدتاً با تظاهرات بالینی مختلف و در افراد با سابقه‌ی ژنتیکی پدیدار می‌شوند، در این حالت توالی‌یابی اگزوم امکان بررسی جامع از مناطق کدکننده‌ی پروتئین ژنوم را فراهم می‌کند و شناسایی انواع واریانت‌های نادر و بالقوه‌ی بیماری‌زا مرتبط با این شرایط را تسهیل می‌نماید. علاوه براین، داده‌های حاصل از توالی‌یابی اگزوم می‌تواند بینش گسترده‌تری را در مورد مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در پاتوژنز کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک و اتساعی ارایه دهد.

روش‌ها: نمونه‌ی خون از دو فرد بیمار از دو خانواده ایرانی دارای کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک و کاردیومیوپاتی اتساعی و اعضای خانواده‌های آن‌ها جمع‌آوری گردید، سپس با استفاده از روش Salting out، نمونه‌ی DNA آن‌ها استخراج شد. نمونه‌ها جهت انجام توالی‌یابی اگزوم به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند و سپس داده خام در مرکز قلب و عروق شهید رجائی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. طراحی پرایمر و PCR برای واریانت‌های کاندید و همچنین توالی‌یابی سنگر برای بیماران و خانواده آن‌ها انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، دو واریانت گزارش شده‌ی مختلف، یکی در ژن TPM1 (c.466G>A:p.E156K) و دیگری در ژن ACTN2 (c.2648C>T:p.A883V) در خانواده‌ی A (هردو هتروزیگوت) و یک واریانت گزارش شده در ژن (c.2218C>T:p.R740X) در خانواده‌ی B (هموزیگوت) شناسایی شدند. جهش‌های یافته شده در بیماران تأیید و در اعضای خانواده‌ی سگرگیت شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، جهش‌های ژن‌هایTPM1، ACTN2 و NRAP در خانواده‌های دارای افراد مبتلا به کاردیومیوپاتی می‌تواند در علت‌یابی بیماری و شناسایی افراد در معرض خطر خانواده، کمک‌کننده می‌باشد.

واژگان کلیدی: کاردیومیوپاتی؛ توالی‌یابی اگزوم؛ جهش؛ بیماری‌های قلبی؛ ایران

ارجاع: مختاری دینازهرا، اکبریان فاطمه، علی‌دوست سلیمی پریسا، کلائی نیا سمیرا. **استفاده از روش توالی‌یابی اگزوم در شناسایی جهش‌های ژنتیکی کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک و کاردیومیوپاتی اتساعی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۷۴): ۵۷۴-۵۸۱.

مقدمه

بیماری‌های مربوط به عضله‌ی قلب که تحت عنوان کاردیومیوپاتی در نظر گرفته می شود، عمدتاً در نتیجه‌ی اختلال در عملکرد عضلات قلب یا فعالیت الکتریکی قلب ایجاد می‌گردد. کاردیومیو پاتی در گروه بیماری‌های هتروژن طبقه‌بندی شده و اغلب منجر به بروز نارسایی پیشرونده‌ی قلبی می‌شوند و در صورت عدم پیوند قلب، در نهایت منجر به مرگ بیمار خواهد شد (۱). بر اساس گزارش انجمن قلب آمریکا، کاردیومیوپاتی‌ها به چهار نوع اصلی تقسیم می‌شوند که عبارتند از: کاردیومیو پاتی اتساعی (Cardiomyopathy Deliated, DCM)، کاردیومیو پاتی هایپرتروفیک (Hypertrophic Cardiomyopahty, HCM)، کاردیومیو پاتی محدودکننده و کاردیومیو پاتی بطن راست آریتموژنیک. این در حالی است که بر اساس گزارش انجمن ژنتیک پزشکی و ژنومیک آمریکا (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)، کاردیومیوپاتی‌ها به دو گروه اولیه و ثانویه طبقه‌بندی شده‌اند. در این طبقه‌بندی کاردیومیوپاتی‌های اولیه دربرگیرنده‌ی اختلالات محدود به قلب (غیرسندرمی) هستند که

۱- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران

۳- دکتری تخصصی، مرکز قلب و عروق شهیدرجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- استادیار، مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک، مرکز قلب و عروق شهیدرجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سمیرا کلائی نیا: استادیار، مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک، مرکز قلب و عروق شهیدرجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

Email: samira.kalayi@yahoo.com

علل ژنتیکی، غیر ژنتیکی یا اکتسابی دارند و اغلب منجر به مرگ قلبی-عروقی یا نارسایی قلبی پیشرونده می‌شوند (۲) در حالی که کاردیومیوپاتی‌های ثانویه به یک اختلال سیستمیک عمومی (سندرمی) مربوط است که از پیامدهای آن می‌توان التهاب، عفونت، افزایش فشار میوکارد یا بار حجمی و عوامل سمی را نام برد (۳).

از شایع‌ترین انواع کاردیومیوپاتی می‌توان به HCM و DCM اشاره کرد که عوامل ژنتیکی نقش مؤثری در بروز هر دوی آن‌ها دارد (۴، ۵). اگرچه هر دو بیماری شیوع نسبتاً بالایی دارند (HCM حدود ۱ در ۵۰۰ نفر (۶) و DCM ۵ در ۱۰۰،۰۰۰ نفر) (۷)، اما هنوز از میزان شیوع آن‌ها در ایران گزارش مشخصی وجود ندارد (۸-۱۰).

HCM نوعی اختلال ژنتیکی است که تاکنون بیش از ۱۲ ژن جهش یافته وابسته به این بیماری شناسایی شده است (۱۱). عمده‌ی این جهش‌ها در ژن‌های مربوط به پروتئین‌های انقباضی سارکومری ایجاد می‌شود (۱۲) و از علائم بالینی آن می‌توان ضخیم شدن غیر طبیعی دیواره‌های بطن اشاره کرد (۱۳). HCM به علت درگیری عضله بطن چپ به عنوان کشنده‌ترین نوع بیماری‌های ماهیچه‌ی قلب در نظر گرفته می‌شود. کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک در هر سنی می‌تواند رخ بدهد و سابقه‌ی خانوادگی اهمیت به سزایی در بروز آن دارد (۱۴). DCM معمولاً از بطن چپ شروع می‌شود، باعث بزرگ شدن و ضعیف شدن بطن‌ها شده و با گذشت زمان می‌تواند بر بطن راست نیز تأثیر بگذارد. کاردیومیوپاتی اتساعی منجر به نارسایی قلبی، بیماری دریچه‌ی قلب، ضربان قلب نامنظم و لخته شدن خون در قلب می‌شود. در ایالات متحده این بیماری سومین علت اصلی نارسایی قلبی بعد از بیماری عروق کرونری و فشار خون بالا گزارش شده است (۱۵، ۱۶).

با پیدایش تکنیک های تعیین توالی نسل جدید (Next generation sequencing) NGS، پیشرفت‌های اساسی در زمینه ژنتیک به وجود آمده است به نحوی که می‌توان در مدت زمان کوتاه تعداد زیادی از ژن‌ها را مورد مطالعه قرار داد (۱۷). از انواع توالی‌یابی نسل جدید می‌توان توالی‌یابی اگزوم (Whole exome sequencing) WES (۱۸) را نام برد، که یک روش ژنومی اختصاصی بر نواحی کدکننده پروتئین (تقریباً ۲-۱ درصد ژنوم را تشکیل می‌دهد) در ساختار ژنوم می‌باشد (۱۹).

مطالعات نشان داده است که ۸۵ در صد جهش‌ها در همین ۲-۱ درصد ژنوم قرار گرفته‌اند (۲۰). از آن‌جا که بیمارهای کاردیومیوپاتی به یکی از معضلات مهم در جامعه پزشکی تبدیل شده، به نظر می‌رسد بررسی‌های ژنتیکی این بیماری و یافتن ژن‌های مداخله‌کننده در آن امری ضروری بوده و در مدیریت بالینی، غربالگری خانواده و همچنین تعیین خطر برای سایر اعضا خانواده بسیار کمک‌کننده است. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی جامع عوامل ژنتیکی دخیل در بیماران کاردیومیوپاتی اتساعی و هایپرتروفیک با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید می‌باشد.

روش‌ها

بیماران مطالعه و ارزیابی بالینی

در این مطالعه، از دو فرد مبتلا به HCM، DCM و خانواده‌ی آن‌ها (شامل والدین، خواهر و برادر) که به انستیتو قلب و عروق شهید رجایی تهران بین سال‌های ۱۴۰۲-۱۴۰۱ مراجعه کرده‌اند، نمونه‌گیری خون انجام شد. افراد مورد مطالعه با استفاده از تست‌های بالینی اکوکاردیوگرافی و امآرآی قلبی توسط پزشک متخصص به عنوان بیمار کاردیومیوپاتی تشخیص داده شدند. پس از دریافت فرم رضایت‌نامه‌ی کتبی و تأیید کمیته اخلاق انستیتو شهید رجایی (IR.RHC.REC.1399.105)، افراد اشاره شده مورد بررسی ژنتیک قرار گرفتند. مشخصات بیماران مورد مطالعه به شرح زیر است:

بیمار A، مرد ۵۸ ساله با مشکل تنگی نفس، به انستیتو مراجعه کرده و نتایج اکوکاردیوگرافی و امآرآی، بیماری فرد HCM تشخیص داده شد. بیمار B، دختر ۵ ساله به علت احساس در در ناحیه‌ی قفسه سینه به انستیتو مراجعه کرده و نتایج اکوکاردیوگرافی و امآرآی، بیماری فرد DCM تشخیص داده شد.

استخراج DNA

DNA تمام بیماران با روش ترسیب نمکی (Salting out) استخراج و میزان خلوص و کیفیت DNA نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ در صد بررسی گردید. تمام نمونه‌ها استخراجی به صورت تک باند و فاقد هر گونه آلودگی پروتئینی حاصل شد.

تعیین توالی اگزوم

توالی‌یابی اگزوم با استفاده از ۱۰ نانوگرم DNA بیماران (خانواده A: III-3 و خانواده B: III-2) برای ساخت کتابخانه و غنی‌سازی اگزون ها با استفاده از کیت SureSelect V6-Post و پلاتفرم Novaseq 6000 با متوسط عمق خوانش x ۱۰۰ توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. آنالیز داده‌های خام حاصل از WES با استفاده از سیستم عامل لینوکس در بخش NGS واقع در مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک انستیتو قلب و عروق شهید رجائی انجام شد. آنالیز داده‌ی خام شامل مراحل بررسی کیفیت، هم ردیف‌سازی، واریانت کالینگ، انوتیشن، فیلترینگ و اولویت‌بندی با سیستم عامل لینوکس و پایپ لاین تنظیم شده در انستیتو رجائی انجام گردید و واریانت‌های پاتوژنیک احتمالی مشخص شد. هم ردیف‌سازی با استفاده از ژنوم مرجع ورژن hg19 انجام گرفت. واریانت‌ها در پایگاه

داده‌ی مختلف شامل Genome ۱۰۰۰ (با فراوانی بالای ۵ درصد)، ExAC (با فراوانی بالای ۵ در صد) و esp6500 (با فراوانی بالای ۱۰ درصد)، حذف شدند. در مرحله‌ی بعد، واریانت‌های گزارش شده در snp138NonFlagged، واریانت‌های Synonymous و واریانت‌های نواحی Intronic، Intergenic، Upstream/Downstream و ۵'-UTR/3'-UTR حذف گردید. در ادامه، جهت بررسی و اولویت‌بندی پاتولوژیک بودن واریانت‌ها از نرم‌افزارهای PROVEAN، SIFT، PolyPhen2، MutationTaster و CADD استفاده شد. واریانت‌هایی که در پایگاه‌های داده‌ای همچون ClinVar، HGMD، OMIM، DECIPHER، GeneCard و AceView در ژن هایی که مربوط به علائم قلب و عروق بودند و همچنین بطور اختصاصی در قلب بیان بالایی داشتند، انتخاب و در نهایت سه واریانت شناسایی شد.

توالی‌یابی سنگر

بعد از شناسایی واریانت‌های کاندید، برای تأیید واریانت‌ها، از روش توالی‌یابی سنگر استفاده شد. آغازگرهای رفت و برگشت برای واریانت‌های شناسایی شده (جدول ۱) در بیماران و سایر اعضای خانواده طراحی و PCR (Thermos Fisher Scientific) انجام گرفت. شرایط دمایی و زمانی به ترتیب برای مرحله وا سر شته شدن (۹۵° C–۹۴ / ۵–۲ دقیقه)، مرحله‌ی واسرشتی (۹۵° C–۹۴ / ۳۰–۲۰ ثانیه)، مرحله‌ی اتصال پرایمر (۷۰° C–۵۰ / ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه)، مرحله‌ی طویل شدن (۷۲° C / ۴۵ ثانیه)، مرحله‌ی طویل شدن نهایی (۷۲° C / ۱۵–۵ دقیقه) با ۳۵–۲۵ سیکل برای سنتز کامل DNA در نظر گرفته شد. برای اطمینان از صحت PCR، این واکنش‌ها به همراه کنترل منفی انجام شدند. آغازگر ها پس از طراحی با برنامه Generunner مورد ارزیابی قرار گرفتند و در پایگاه NCBI بلست شد. آغازگرها از شرکت ژن فناوران تهیه شده است. در نهایت نمونه‌های با کیفیت قابل قبول جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و سپس آنالیز شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ناحیه‌ی ژنی	توالی پرایمر
اگزون ۲۱ ژن ACTN2	F: TATCCTCGCATTGTGGCTC R: CGGCAGTTCCATCTCACA
اگزون ۲۱ ژن NRAP	F: AGTCAGAGAAGTGCCAACCA R: AGTAAGTGGCAACCGAGGAT
اگزون۵ ژنTPM1	F: TCTACTGTTGCGAGGTTGG R:GAGAAATGGCAGTTAGCACAGT

یافته‌ها

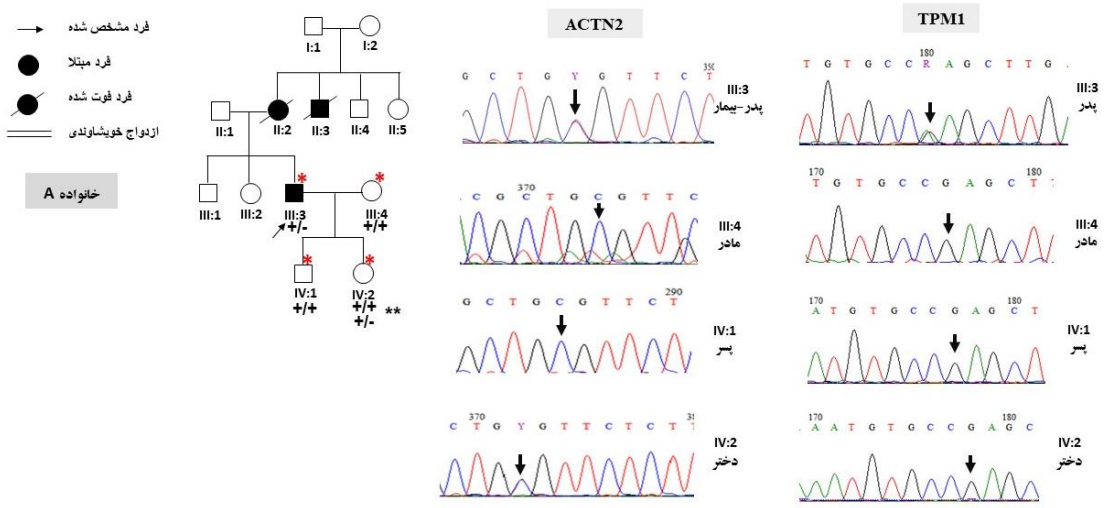
شجره‌ی خانوادگی افراد مبتلا در شکل ۱ و ۲ مشخص شده است. خانواده‌ی A شامل بیمار مورد مطالعه (III-3)، همسر بیمار، پسر (فرزند اول) و دختر (فرزند دوم) است. خانواده‌ی B شامل پدر، مادر، برادر (فرزند اول فوت شده) و بیمار مورد مطالعه (III-2) است. افراد مورد بررسی شامل ۵ نفر مرد و ۴ نفر زن می‌باشد. بیمار A مبتلا به HCM و بیمار B مبتلا به DCM بود. نتایج بدست آمده نشان داد که یک جهش بدمعنی (missense) بصورت هتروزیگوت در ژن TPM1 در اگزون ۵ به وقوع پیوسته است، که بر طبق معیارهای ACMG این جهش جز طبقه‌بندی جهش بیماری‌زا (Pathogenic) می‌باشد. همچنین ژن ACTN2 در اگزون ۲۱ بصورت اتوزومال غالب (هتروزیگوت) به ارث می‌رسد که بر طبق ACMGاین جهش جز طبقه‌بندی جهش نامشخص (VUS) می‌باشد که هر دو ژن در خانواده A شناسایی شد. یک جهش بدمعنی به صورت هموزیگوت در ژن NRAP در اگزون ۲۱ خانواده‌ی B تشخیص داده شد که بر طبق ACMG این جهش جز طبقه‌بندی جهش احتمالاً بیماری‌زا (Likely Pathogenic) می‌باشد.

نتایج آنالیز توالی سنگر

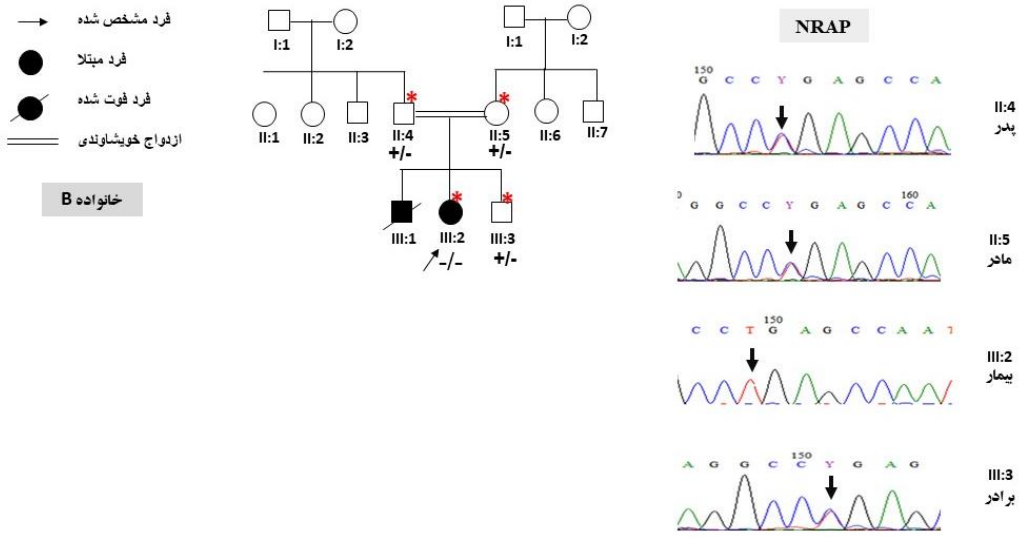
در این بررسی، در بیمار A (III-3) و خانواده‌ی (III-4,IV-1,IV-2) A ژن های TPM1, ACTN2 مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲) و بر اساس نتایج آزمایش جهش ذکر شده در بیمار A مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک تأیید شد. نتایج آنالیز سگریگیشن برای تأیید واریانت‌های ژنتیکی احتمالی در خانواده‌ی A نرمال شد به استثنای اینکه فرزند دوم خانواده در ژن ACTN2 بصورت هتروزیگوت (ناقل) می باشد. همچنین ژن NRAP در بیمار B (III-2) و خانواده‌ی بیمار B (II-4, II-5, III-3) بررسی گردید، جهش در بیمار B دیده شد و نتایج سکانس بیمار مبتلا به کاردیومیوپاتی اتساعی تأیید شد. نتایج سگریگیشن خانواده‌ی B بصورت هتروزیگوت می‌باشد (شکل ۱ و ۲).

نتایج حاصل از NGS بیماران

پس از انجام تست WES (جدول ۲) و دریافت داده‌ی خام (Fastq file)، آنالیز داده با استفاده از پایپ‌لاین تنظیم شده در بخش NGS انستیتو قلب و عروق شهید رجائی انجام شد. واریانت‌های کاندید نهایی با علائم بالینی قلبی مطابقت داده، در نهایت یک جهش بدمعنی بصورت هتروزیگوت در ژن TPM1در اگزون ۵ تشخیص داده شد. بر طبق ACMG این جهش جز طبقه‌بندی جهش بیماری‌زا می‌باشد. ژن ACTN2 در اگزون ۲۱ به صورت اتوزومال غالب (هتروزیگوت) به ارث می‌رسد. بر طبق ACMG این جهش جز طبقه‌بندی جهش نامشخص VUS می‌باشد.



شکل ۱- شجره‌ی خانوادگی بیمار A: (*): نمونه خون‌های افراد مورد مطالعه، (+/–): نتایج ژنوتایپی، (**): آنالیز سگرگیشن پروباند IV-2 برای ژن‌های TPM1 هموزیگوت (+/+) و ژن ACTN2 هتروزیگوت (–/+). نتایج حاصل از تأیید واریانت‌های بیمار و اعضا خانواده‌های آن به ترتیب از راست به چپ: خانواده A ژن TPM1، آنالیز سکانس III-3 دارای واریانت c.G466A (هتروزیگوت) از نوع موتانت و آنالیز سکانس IV-2، III-4 و IV-1 دارای سکانس نرمال؛ خانواده A ژن ACTN2، آنالیز سکانس IV-2 و III-3 دارای واریانت c.C2648T (هتروزیگوت) از نوع موتانت و آنالیز سکانس III-4 و IV-1 با سکانس نرمال



شکل ۲- شجره‌ی خانوادگی بیمار B: (*): نمونه خون‌های افراد مورد مطالعه، (+/–): نتایج ژنوتایپی. نتایج حاصل از تأیید واریانت‌های بیمار B و تعدادی از اعضا خانواده‌های آن به ترتیب از راست به چپ: ؛ خانواده B ژن NRAP، آنالیز سکانس III-2 دارای واریانت c.C2218T (هموزیگوت) از نوع موتانت و آنالیز سکانس II-4، II-5 و III-3 دارای واریانت c.C2218T (هتروزیگوت) دارای سکانس نرمال

جدول۲- نتایج جهش‌های حاصل از NGS بیمار A(III-3) ژن ACTN2،TPM1 و بیمار B (III-2) ژن NRAP

فنوتایپ	ACMG	ژنوتایپ	Nomenclature	dbNSP	رونویسی	ژن
*HCM	بیماری‌زا	هتروزیگوت	c.G466A p.E156K	rs199476315	NM_001018008	TPM1
HCM	نامشخص	هتروزیگوت	c.C2648T p.A883V	rs769564893	NM_001103	ACTN2
*DCM	احتمالاً بیماری‌زا	هموزیگوت	c.C2218T p.R740X	rs878872989	NM_006175	NRAP

* HCM: Hypertrophic cardiomyopathy; Het: Hetrozygous; * DCM: Dilated cardiomyopathy; Hom: Homozygous

بحث

در این مطالعه، با استفاده از توالی‌یابی اگزوم، سه واریانت بد معنی به عنوان عامل پاتوژن احتمالی در دو بیمار شناسایی شد که عبارتند از: واریانت بیماری‌زا c.466G>A در ژن TPM1، واریانت نامشخص c.2648C>T (VUS) در ژن ACTN2 و واریانت (احتمالاً) بیماری‌زا c.2218C>T در ژن NRAP. ژن TPM1 از سانی واقع در کروموزوم ۱۵q۲۲ و شامل ۱۵ اگزون است که اکثر جهش‌ها در اگزون‌های ۳، ۴، ۵، ۷ و ۸ گزارش شده است (۲۰).

TPM1، کدکننده‌ی پروتئین‌های متصل شونده به اکتین است که در تشکیل، تثبیت و تنظیم رشته‌های اکتین اسکلت سلولی نقش دارد و همچنین نقش مهمی در تنظیم انقباض با میانجی‌گری پاسخ کلسیم کمپلکس تروپونین به رشته‌های اکتین در عضلات اسکلتی و قلبی ایفا می‌کند.

جهش در TPM1 منجر به انواع بیماری‌های قلبی نظیر HCM، DCM و LVNC می‌شود و تظاهرات بالینی آن شامل تنگی نفس، خستگی، درد قفسه سینه، تپش قلب و مرگ ناگهانی قلبی می‌باشد. تا به امروز، حدود سی جهش از TPM1 برای DCM در پایگاه داده HGMD گزارش شده است (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر، واریانت شناسایی شده، c.466G>A:p.E156K در اگزون ۵ ژن TPM1 منجر به جایگزینی گلوتامیک اسید به لیزین شد که این امر منجر به بروز فنوتیپ HCM در بیمار مورد مطالعه گردید (۲۱). این در حالی است که در مطالعه‌ی دیگر، جهش در اگزون ۶ و ۲ ژن TPM1 به عنوان عامل HCM در نظر گرفته شده است (۲۲، ۲۳).

ژن ACTN2، واقع در کروموزوم۱q۴۳ و شامل ۲۳ اگزون است. این ژن مسئول کدکننده‌ی پروتئین اتصال آلفا اکتینین ۲ در دیسک Z سارکومریک قلب است و رشته‌های اکتین میوفیبریلار را بهم متصل می‌کند (۲۴). ACTN2 دارای چندین نقش ساختاری و عملکردی در سارکومر و دستگاه انقباضی می‌باشد و در سازماندهی کانال یونی در دیسک Z قلب نیز نقش دارد (۲۵). در خانواده‌ی A، پروباند IV-2 با سن ۱۱ سال، ژن ACTN2 بصورت ناقل در بیماری HCM شناسایی شد (شکل ۱)، از آن‌جا که این بیماری عمدتاً در سنین بالا بروز می‌کند، لذا فرد مورد نظر باید تحت نظر پزشک قرار بگیرد تا احتمال بروز بیماری در سنین بالا یا ایست قلبی کاهش یابد. جهش در ACTN2 بر فعالیت الکتریکی قلب و همچنین ساختار سارکومر تأثیر داشته و می‌تواند منجر به HCM، DCM، آریتمی دهلیزی نوجوانان، عدم تراکم بطن چپ و در نهایت مرگ ناگهانی شود (۲۶).

تا به امروز، بیش از ۴۱ جهش از ACTN2 در پایگاه داده HGMD گزارش شده است. با این حال، اکثر جهش‌های ACTN2 در HCM و جهش‌های کمتری در DCM شناسایی شدند (۲۷، ۲۸).

در مطالعه‌ی حاضر، در فرد مبتلا به HCM، جهش جدید در c.C2648T:p.A883V شناسایی شد که این تغییر منجر به جایگزینی آلانین با والین گردید. جهش‌های مختلفی نظیر c.959T>G:p.L320R در این ژن شناسایی گردید که منجر به DCM در فرد شده است (۲۸).

در مطالعه‌ی جامع‌تری از خانواده‌های مبتلا به HCM که با علائم بالینی مختلف بررسی شده‌اند، چهار جهش بدمعنی هتروزیگوت Glu583Ala، Thr495Met، Glu628Gly، Ala119Thr در ژن ACTN2 گزارش شد. در واقع جهش در ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین دیسک Z بطور قابل توجهی نشان داده است که جهش در ACTN2 باعث HCM می‌شود (۲۹).

همچنین پروباند مبتلا به ACM با علائم بالینی تپش قلب و سرگیجه آشکار شد و واریانت c.1418A>G:p.Tyr473Cys در ژن ACTN2 از نوع بدمعنی و بصورت هتروزیگوت در این خانواده شناسایی شد (۳۰). با توجه به این نتایج حاصل و مطالعات انجام شده، در HCM بخشی از طیف فنوتیپی بیماری مربوط به ACTN2 در نظر گرفته می‌شود و همچنین افراد دارای علائم ACM در سنین بالاتر علائم HCM یا DCM بروز می‌دهند (۳۰). البته این نکته حائز اهمیت است که طبق بررسی‌های انجام شده، تأثیرگذاری جهش ژن ACTN2 در حال حاضر قابل اثبات نمی‌باشد، اما به عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در بروز اختلال می‌تواند در نظر گرفته شود.

ژن NRAP واقع در کروموزوم ۱۰q۲۵ و شامل ۴۲ اگزون است. این ژن نقش مهمی در معماری میوکارد و عملکرد سارکومر ایفا می‌کند. ژن NRAP، پروتئین لنگر مرتبط با نبولین را کد می‌کند. این پروتئین در لنگر انداختن رشته‌های اکتین انتهایی به غشاء، انتقال تنش از میوفیبریل‌ها به ماتریکس خارج سلولی و در چرخه‌ی انقباض سارکومریک در قلب بالغ نقش دارد و دومین عضو بزرگ پروتئین‌های اسکلت سلولی متصل شونده به اکتین از خانواده نبولین است (۳۱).

اولین توصیف یک بیمار مبتلا DCM با جهش هموزیگوت در ژنNRAP با علائم بالینی بزرگ شدن دهلیزها گزارش شد. جهش c.4504C > T:p.Arg1502 در پروباند شناسایی شده طبق دستورالعمل ACMG در طبقه‌بندی احتمالاً بیماری‌زا قرار می‌گیرد. در نتیجه، جهش در NRAP می‌تواند به دلیل نفوذ کاهش یافته ریسک خطر بالایی ژنتیکی در DCM ایجاد کند (۳۲).

در یک مطالعه، یک نوزاد دختر ۱۷ ماهه با علائم نارسایی قلبی، مبتلا به DCM تشخیص داده شد. در این بیمار توالی‌یابی کل اگزوم، نوعی هموزیگوت c.400-407del: p.Cys134Serfs که عامل ایجاد کدون توقف زودرس در ژن NRAP می‌باشد، را نشان داد. این گزارش جهش‌های حذف دو آللی در ژن NRAP را نشان می‌دهد که

باعث ایجاد DCM مغلوب اتوزومی با احتمال خطر ژنتیکی همراه با نفوذ کاهش یافته را تأیید می‌کند (۳۴).

در مطالعه‌ی حاضر، جهش بد معنی c.C2218T:p.R740X در ژن NRAP در پروباند خانواده ایرانی مبتلا به HCM شناسایی شد. بر اساس معیارهای ACMG، این واریانت از نوع احتمالاً بیماری‌زا می‌باشد که منجر به ایجاد کدون Stop-gain می‌شود. با توجه به گزارشات قبلی و این گزارش، جهش در NRAP عامل ایجاد DCM مغلوب اتوزومی در سنین مختلف می‌باشد (۳۴). مطالعات ذکر شده، طیف گسترده‌ای از جهش‌های NRAP که در جمعیت‌های فامیلی شایع هستند را برجسته می‌کند. همچنین ارتباط ژن NRAP با بیماری‌های قلبی بخصوص DCM از نوع اتوزومال مغلوب را اثبات می‌کند (۳۴). نتایج این مطالعه با گزارش‌های قبلی مطابقت دا شت، به طوری که در ۵۰ درصد افراد مبتلا به DCM از نوع ژن NRAP، مرگ یا ایست قلبی به وقوع می پیوندد و از سوی دیگر ارتباط معنی‌داری بین ازدواج فامیلی با ابتلا به بیماری‌های قلبی وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه مسیر دقیق مکانیسم‌های کاردیومیوپاتی هنوز مشخص نیست، استفاده از تکنولوژی NGS در شناسایی جهش‌های دخیل در آن به پیش‌گیری از ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی همراه با سابقه‌ی خانوادگی که اکثراً در سنین بالا رخ می‌دهد (۳۵)، کمک می‌کند. همچنین شناسایی واریانت‌های جدید و تعیین عملکرد آن‌ها در هر اگزون، مسیر را برای کشف معمای پیچیده سارکومر هموار خواهد کرد (۳۶). تشخیص زود هنگام و ادامه‌ی تحقیقات ژنتیکی در این زمینه باعث می‌شود که جهش‌ها و مسیرهای مکانیسمی جدید مرتبط با HCM و DCM با کمک WES شناسایی شود و بدین ترتیب می‌توان اقدامات لازم جهت پیشگیری مناسب به سیستم مدیریت درمان ارائه گردد (۳۷). پیش‌بینی می‌شود که WES به طور فزاینده‌ای در مطالعه‌ی صفات چند عاملی ضروری خواهد بود (۳۸). لذا درک بیشتر ناهمگونی ژنتیکی در کاردیومیوپاتی‌ها، امکان تفسیر بهتر انواع نادر، پیش‌آگهی زودرس و مدیریت بهتر بیماری، به ویژه در جمعیت‌های کمتر مطالعه شده (۳۹)، مانند جمعیت ایران را فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد با کد (۲۹۷۷۳۱۰)، مصوب و دفاع شده در مؤسسه‌ی آموزش عالی آل طه می‌باشد. فرایند مطالعه در انستیتو قلب و عروق شهید رجائی، مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک و بخش NGS انجام گرفته است.

References

1. Bozkurt B, Coats AJS, Tsutsui H, Abdelhamid CM, Adamopoulos S, Albert N, et al. Universal definition and classification of heart failure: a report of the heart failure society of America, heart failure association of the European society of cardiology, Japanese heart failure society and writing committee of the universal definition of heart failure. Eur J Heart Fail 2021; 23(3): 352-80.
2. Ciarambino T, Menna G, Sansone G, Giordano M. Cardiomyopathies: an overview. Int J Mol Sci 2021; 22(14): 7722.
3. Limongelli G, Adorisio R, Baggio C, Bauce B, Biagini E, Castelletti S, et al. Diagnosis and management of rare cardiomyopathies in adult and paediatric patients. A position paper of the Italian society of cardiology (SIC) and Italian society of paediatric cardiology (SICP). Int J Cardiol 2022; 357: 55-71.
4. Rosenbaum AN, Agre KE, Pereira NL. Genetics of dilated cardiomyopathy: practical implications for heart failure management. Nature Reviews Cardiology 2020; 17(5): 286-97.
5. Heymans S, Lakdawala NK, Tschöpe C, Klingel K. Dilated cardiomyopathy: causes, mechanisms, and current and future treatment approaches. Lancet 2023; 402(10406): 998-1011.
6. McKenna WJ, Judge DP. Epidemiology of the inherited cardiomyopathies. Nat Rev Cardiol 2021; 18(1): 22-36.
7. Marstrand P, Picard K, Lakdawala NK. Second hits in dilated cardiomyopathy. Curr Cardiol Rep 2020; 22(2): 8.
8. George Jr AL. Use of contemporary genetics in cardiovascular diagnosis. Circulation 2014; 130(22): 1971-80.
9. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, et al. Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. Hum Mutat 2013; 34(7): 1035-42.
10. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. Circulation 2005; 112(12): e154-235.
11. Marian AJ. Molecular genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy. Circulation Research 2021; 128(10): 1533-53.
12. Barefield DY, Alvarez-Arce A, Araujo KN. Mechanisms of sarcomere protein mutation-induced cardiomyopathies. Curr Cardiol Rep 2023; 25(6): 473-84.

13. Liew AC, Vassiliou VS, Cooper R, Raphael CE. Hypertrophic cardiomyopathy—past, present and future. J Clin Med 2017; 6(12): 118.
14. Sabater-Molina M, Saura D, Sáez EG-M, González-Carrillo J, Polo L, Pérez-Sánchez I, et al. Nueva mutación fundadora en MYBPC3: comparación fenotípica Con La mutación de MYBPC3 más frecuente en España. Revista Española de Cardiología 2017; 70(2): 105-14.
15. Colan SD, Lipshultz SE, Lowe AM, Sleeper LA, Messere J, Cox GF, et al. Clinical Perspective. Circulation 2007; 115(6): 773-81.
16. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult—summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). J Am Coll Cardiol 2005; 46(6): e1-82.
17. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, Waghoo S, Zaidi G, Rawool S, et al. Next-generation sequencing technology: current trends and advancements. Biology (Basel) 2023; 12(7): 997.
18. Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, Wilkinson E, Fish M, Ramsuran V, De Oliveira T. Next generation sequencing and bioinformatics analysis of family genetic inheritance. Front Genet 2020; 11: 544162.
19. Dunn P, Albury CL, Maksemous N, Benton MC, Sutherland HG, Smith RA, et al. Next generation sequencing methods for diagnosis of epilepsy syndromes. Front Genet 2018; 9: 20.
20. Simon R, Roychowdhury S. Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. Nat Rev Drug Discov 2013; 12(5): 358-69.
21. Man Y, Yi C, Fan M, Yang T, Liu P, Liu S, Wang G. Identification of a novel missense mutation in the TPM1 gene via exome sequencing in a Chinese family with dilated cardiomyopathy: A case report and literature review. Medicine (Baltimore) 2022; 101(2): e28551.
22. Mango R, Luchetti A, Sangiuolo R, Ferradini V, Briglia N, Giardina E, et al. Next generation sequencing and linkage analysis for the molecular diagnosis of a novel overlapping syndrome characterized by hypertrophic cardiomyopathy and typical electrical instability of Brugada syndrome. Circ J 2016; 80(4): 938-49.
23. Jongbloed RJ, Marcelis CL, Doevendans PA, Schmeitz-Mulkens JM, van Dockum WG, Geraedts JP, Smeets HJ. Variable clinical manifestation of a novel missense mutation in the alpha-tropomyosin (TPM1) gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 2003; 41(6): 981-6.
24. Gerull B, Klaassen S, Brodehl A. The genetic landscape of cardiomyopathies. Berlin, Germany: Springer; 2019. p. 45-91.
25. Bagnall RD, Molloy LK, Kalman JM, Semsarian C. Exome sequencing identifies a mutation in the ACTN2 gene in a family with idiopathic ventricular fibrillation, left ventricular noncompaction, and sudden death. BMC Med Genet 2014; 15(1): 1-9.
26. Murphy AC, Young PW. The actinin family of actin cross-linking proteins–a genetic perspective. Cell Biosci 2015; 5: 49.
27. de Gonzalo-Calvo D, Quezada M, Campuzano O, Perez-Serra A, Broncano J, Ayala R, et al. Familial dilated cardiomyopathy: a multidisciplinary entity, from basic screening to novel circulating biomarkers. Int J Cardiol 2017; 228: 870-80.
28. Haywood NJ, Wolny M, Rogers B, Trinh CH, Shuping Y, Edwards TA, Peckham M. Hypertrophic cardiomyopathy mutations in the calponin-homology domain of ACTN2 affect actin binding and cardiomyocyte Z-disc incorporation. Biochem J 2016; 473(16): 2485-93.
29. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, et al. Mutations in alpha-actinin-2 cause hypertrophic cardiomyopathy: a genome-wide analysis. J Am Coll Cardiol 2010; 55(11): 1127-35.
30. Good J-M, Fellmann F, Bhuiyan ZA, Rotman S, Pruvot E, Schläpfer J. ACTN2 variant associated with a cardiac phenotype suggestive of left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy. HeartRhythm Case Rep 2020; 6(1):15-9.
31. Mohiddin SA, Lu S, Cardoso JP, Carroll S, Jha S, Horowits R, Fananapazir L. Genomic organization, alternative splicing, and expression of human and mouse N-RAP, a nebulin-related LIM protein of striated muscle. Cell Motil Cytoskeleton 2003; 55(3): 200-12.
32. Truszkowska GT, Bilińska ZT, Muchowicz A, Pollak A, Biernacka A, Kozar-Kamińska K, et al. Homozygous truncating mutation in NRAP gene identified by whole exome sequencing in a patient with dilated cardiomyopathy. Sci Rep 2017; 7(1): 3362.
33. Ahmed HA, Al-ghamdi S, Al Mutairi F. Dilated cardiomyopathy in a child with truncating mutation in NRAP gene. JBCGenetics 2019; 1(2): 77-80.
34. Maurer C, Boleti O, Najarzadeh Torbati P, Norouzi F, Fowler ANR, Minaee S, et al. Genetic Insights from Consanguineous Cardiomyopathy Families. Genes (Basel) 2023; 14(1): 182.
35. Girolami F, Frisso G, Benelli M, Crotti L, Iascone M, Mango R, et al. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. J Cardiovasc Med (Hagerstown) 2018; 19(1): 1-11.
36. Martin TG, Kirk JA. Under construction: The dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere. J Mol Cell Cardiol 2020; 148: 89-102.
37. Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. Cardiovasc Res 2015; 105(4): 397-408.
38. Glotov OS, Chernov AN, Glotov AS. Human exome sequencing and prospects for predictive medicine: analysis of international data and own experience. J Pers Med 2023; 13(8): 1236.
39. Aiyer S, Kalutskaya E, Agdamag AC, Tang WHW. Genetic evaluation and screening in cardiomyopathies: opportunities and challenges for personalized medicine. J Pers Med 2023; 13(٦).

DOI: *10.48305/jims.v42.i774.0574*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 42, No. 774, 2nd Week, September 2024**

Received: 14.01.2024 Accepted: 18.08.2024 Published: 05.09.2024

The Use of Exome Sequencing in Identifying Genetic Mutations of Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy

Dinazhara Mokhtari[1], Fatemeh Akbarian[2], Parisa Alidoost Salimi[3], Samira Kalayinia[4]

Original Article

Abstract

Background: Hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy appear with diverse clinical manifestations and genetic history. Exome sequencing provides the possibility of a comprehensive examination of the protein-coding regions of the genome and the identification of rare and potentially pathogenic variants related to these conditions. Facilitates The data obtained from exome sequencing can provide a broader insight into the molecular mechanisms that affect the pathogenesis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy.

Methods: Blood samples were collected from 2 patients and their families with Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy. Their DNA was extracted using the salting out method. Patient samples were sent to South Korea's Macrogen Company for exome sequencing and the raw data was analyzed at the Shahid Rajaei Heart and Vascular Center. Primer and PCR design for candidate variants and trench sequencing were done for patients and their families.

Findings: In this study, two different variants, one in TPM1 gene (c.466G>A:p.E156K) and another in ACTN2 gene (c.2648C>T:p.A883V), both in family A and one variant in NRAP gene (c.2218C>T:p.R740X) was identified in family B. Mutations found in patients were confirmed and segregated in family members.

Conclusion: The results of the present study show that examining TPM1, ACTN2, and NRAP genes in families with people with cardiomyopathy can help diagnose the cause of the disease and identifying people at risk in the family.

Keywords: Cardiomyopathies; Exome sequencing; Mutation; Heart diseases; Iran

Citation: Mokhtari D, Akbarian F, Alidoost Salimi P, Kalayinia S. **The Use of Exome Sequencing in Identifying Genetic Mutations of Hypertrophic Cardiomyopathy and Dilated Cardiomyopathy.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(774): 574-81.

1- MSc, Department of Genetics, School of Basic Sciences, Al Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran

2 -Assistant Professor, Department of Genetics, School of Basic Sciences, Al Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran

3 -PhD Candidate, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Samira Kalainia, Assistant Professor, Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; Email: samira.kalayi@yahoo.com