

На правах рукописи



ВАЛИАХМЕТОВ НАИЛЬ РАУШАНОВИЧ

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ САРКОМЕРНЫХ БЕЛКОВ
ПРИ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА**

1.5.7 – Генетика

Автореферат на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
Назаренко Мария Сергеевна

Официальные оппоненты:

Уразова Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий (г. Томск)

Чурносов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», медицинский институт, кафедра медико-биологических дисциплин, заведующий (г. Белгород)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «___» _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, Московский тр., 3, НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Хитринская И.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – одно из наиболее частых наследственных заболеваний, её распространенность у взрослых составляет от 1:500 до 1:200 [Massera D. et al., 2023]. Принято считать, что ГКМП обусловлена, главным образом (40–50% случаев), мутациями в генах белков, образующих саркомер [Thakkar K. et al., 2023]. Среди них наиболее частыми причинами заболевания являются патогенные варианты в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* [Hathaway J. et al., 2021]. Однако в 40–70% случаев ГКМП выявить мутацию не удастся [Muresan I.D., Agoston-Coldea L., 2021]. Кроме того, патогенность некоторых ранее описанных генетических вариантов ставится под сомнение [Andreasen C. et al., 2013; Walsh R. et al., 2017], а число вариантов «неопределенного значения» у пациентов значительно превышает их долю в популяциях [Walsh R. et al., 2017]. Также следует заметить, что для ГКМП характерен клинический полиморфизм [Butt A.K. et al., 2023], и описаны случаи, когда пациенты имели более одного патогенного варианта и соответственно более тяжелое течение заболевания [Maron B.J., Maron M.S., 2013]

Кроме однозначной патогенности и однозначной нейтральности генетических вариантов существуют многочисленные градации между этими крайними значениями величины эффекта. В зависимости от эффекта генетический вариант может не только быть ключевым фактором для запуска заболевания, но и служить дополнительным фактором-модификатором фенотипа при уже развившемся заболевании. Например, исследование ассоциаций генетических вариантов с кардиомиопатией и эхокардиографическими показателями в когортах Framingham Heart Study и Jackson Heart Study показало, что 11,2% индивидов имели редкие несинонимичные варианты в генах ГКМП, при этом у них наблюдалось статистически значимое увеличение толщины стенки левого желудочка (ЛЖ) и диастолического диаметра левого предсердия. Индивиды с редкими вариантами в генах также характеризовались более высоким риском стенокардии, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности. Распространенность «патогенных» вариантов в популяции была оценена в 0,6% [Bick A.G. et al., 2012]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что генетическая основа ГКМП (и предрасположенности к гипертрофии миокарда в целом) является комплексной.

Большинство работ в области генодиагностики ГКМП сфокусированы на выявлении патогенных вариантов в экзонах генов саркомерных белков [Christian S. et al., 2022]. Изменчивость в интронах данных генов и ее возможная функциональная значимость при ГКМП анализируются существенно реже [Cirino A.L. et al., 2017; Mendes de Almeida R. et al., 2017; Bagnall R.D. et al., 2018; Gomes A.C. et al., 2020]. При этом вариабельность в интронах генов саркомерных белков показала связь с QRS-комплексом и массой миокарда ЛЖ в GWAS [van der Harst P. et al., 2016]. Не исключено, что «дополнительная» изменчивость в генах ГКМП может оказывать модифицирующий эффект на фенотип этого заболевания, равно как и вносить вклад в формирование многофакторного заболевания – гипертрофии миокарда при артериальной гипертензии (АГ).

Гипертрофия миокарда, как фенотип, который наблюдается и при моногенном/олигогенном и многофакторном заболевании, может служить моделью для выявления таких вариантов с промежуточным эффектом и проверки гипотезы «менделевского кода» многофакторных заболеваний, риск которого определяется в том

числе и генами, вызывающими ассоциированное с ним менделевское заболевание [Blair D.R. et al., 2013]. С другой стороны, усовершенствование алгоритма молекулярно-генетической диагностики ГКМП и его активное применение в клинической практике повысит эффективность и точность ранней диагностики менделевских кардиомиопатий, позволит выявить носителей и провести диспансеризацию индивида и/или его членов семьи, что повышает качество оказания медико-генетического консультирования семье.

Степень разработанности темы исследования.

Генетические аспекты кардиомиопатий, включая ГКМП, рассматриваются в целом ряде работ [Zou Y. et al., 2013; Sedaghat-Hamedani F. et al., 2018; Hershkovitz T. et al., 2019; Ниязова С.С. и др., 2019; Chung H. et al., 2020; McKenna W.J., Judge D.P., 2021; Maron B.J. et al., 2022]. В РФ данное научное направление выполняется коллективами исследователей из НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ [Голубенко М.В. и др., 2002; Puzyrev K.V. et al., 2002; Пузырев В.П. и др., 2003; Salakhov R.R. et al., 2022; Кучер А.Н., и др., 2023], Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В. Петровского [Заклязьминская Е.В. с соавт., 2005; Дземешкевич С.Л. с соавт., 2019; Blagova O. et al., 2020; Шестак А.Г., с соавт., 2000, 2022], Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова [Костарева А.А. с соавт., 2003; Шляхто Е.В., и др., 2005; Стрельцова А.А., и др., 2019; Вахрушев Ю.А. и др., 2022], Национального медицинского исследовательского центра кардиологии им. акад. Е.И. Чазова [Затейщиков Д.А. и др., 2022; Chumakova O.S., Baulina N.M., 2023], Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины - филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН и Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого [Никулина С.Ю. и др., 2021; Иванова А.А. и др., 2022].

Однако эффект не отдельных редких клинически значимых вариантов, а их комбинаций, в том числе комбинаций с распространенными полиморфизмами, остаётся неизвестным. Решение данной задачи становится возможным с появлением новых технологий и подходов. Более того, с учетом небольшого числа пациентов, обладающих одной и той же мутацией, по-прежнему остается нерешенным ряд вопросов не только о патогенности некоторых вариантов в отношении развития ГКМП, но и условий, способствующих развитию патологического фенотипа и определяющих клиническое течение болезни.

В настоящее время при генодиагностике наследственных заболеваний (в т. ч. ГКМП) преобладающим методом является массовое параллельное секвенирование коротких фрагментов [Wood K.A. et al., 2021]. Однако в последние годы стало доступным секвенирование длинных последовательностей ДНК в режиме реального времени, в связи с чем проводится разработка и валидация диагностических протоколов для целого ряда наследственных заболеваний с использованием технологии мономолекулярного секвенирования Oxford Nanopore Technologies (Великобритания) [Minervini C.F. et al., 2020; Gorzynski J.E. et al., 2022; Stevanovski I. et al., 2022], но для ГКМП такие исследования пока не проводились.

Следует отметить, что в работах лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ активно изучается концепция заболеваний сердечно-сосудистого континуума, объединенных схожим патогенезом с вовлечением единой группы генов [Пузырев В.П. и др., 2003; Пузырев В.П., 2015; Брагина Е.Ю.,

Пузырев В.П., 2023]. В результате был охарактеризован спектр мутаций в генах саркомерных белков у пациентов с ГКМП [Голубенко М.В. и др., 2002; Puzyrev K.V. et al., 2002]. Кроме того, с использованием кандидатного подхода показана ассоциация полиморфизма генов саркомерных белков с ремоделированием сердца у пациентов, имеющих артериальную гипертензию [Макеева О.А. и др., 2004]. Однако не был выполнен детальный анализ вариабельности полной нуклеотидной последовательности генов саркомерных белков при обоих фенотипах.

Цель исследования: идентификация вариантов в генах саркомерных белков, определяющих формирование фенотипа гипертрофии миокарда различного генеза.

Задачи исследования:

1. Исследовать нуклеотидную изменчивость полной последовательности генов *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с компенсаторной гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии с помощью массового параллельного и нанопорового секвенирования; классифицировать выявленные генетические варианты по степени патогенности.
2. Описать вариабельность интронных последовательностей изучаемых генов с целью выявления потенциально неблагоприятных вариантов, локализованных в функционально значимых регионах.
3. У индивидов, имеющих более чем один неблагоприятный вариант в одном гене, определить гаплотипы (цис/транс положение этих вариантов) с помощью прямого секвенирования длинных фрагментов ДНК.
4. Охарактеризовать связь нуклеотидной изменчивости изучаемых генов с эхокардиографическими параметрами миокарда пациентов.

Научная новизна исследования. Впервые исследована полная нуклеотидная последовательность генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*), включая интроны, с помощью технологий массового параллельного и мономолекулярного секвенирования. Впервые с помощью методов секвенирования третьего поколения проведено прямое определение гаплотипов исследуемых генов саркомерных белков при ГКМП и гипертрофии миокарда ЛЖ при АГ. Проверена гипотеза о вкладе вариантов генов менделевских заболеваний в развитие многофакторной патологии на примере группы пациентов с компенсаторной гипертрофией миокарда в результате АГ. Впервые установлена применимость использования технологии секвенирования третьего поколения Oxford Nanopore Technologies в практических целях генодиагностики ГКМП. Выявлены ассоциации частых вариантов генов саркомерных белков с вариабельностью количественных характеристик гипертрофии миокарда у пациентов с ГКМП. В качестве нового подхода в дизайне диагностической панели «частых» генов ГКМП (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) была использована ПЦР длинных фрагментов с амплификацией полной последовательности генов, включая интроны, позволяющая выявлять в т. ч. криптические сайты сплайсинга, что может увеличить долю пациентов с установленной генетической причиной ГКМП.

Теоретическая и практическая значимость. Охарактеризован спектр мутаций в генах саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) у пациентов с ГКМП,

проживающих в Сибирском федеральном округе. Генетическая причина заболевания установлена у 26% пациентов с ГКМП в изучаемой выборке. Разработана панель праймеров, использованная для амплификации полной последовательности генов, и подана заявка на патент. Выявлены генотипы, имеющие рисковый или протективный эффект в отношении развития гипертрофии миокарда у пациентов с ГКМП, а также ассоциированные с эхокардиографическими параметрами и характеристиками механики ЛЖ. Комплексный анализ данных на основе подробного эхокардиографического изучения и описания строения ЛЖ, механики его работы и изменений, происходящих при изучаемой патологии, наряду с данными об изменчивости генов, отвечающих за наследственную компоненту, позволил оценить степень патогенности определенных мутаций в генах саркомерных белков. Полученные результаты имеют ценность для развития подходов к молекулярно-генетической диагностике одного из наиболее частых наследственных заболеваний – ГКМП, в том числе с использованием нанопорового секвенирования. Полученные данные о полиморфизме генов могут быть использованы для исследования дополнительных генетических факторов, влияющих на тяжесть течения ГКМП и гипертрофии миокарда ЛЖ при АГ, что важно учитывать в персонифицированном подходе определения прогноза и формирования групп риска данной патологии.

Методология и методы исследования. В работе использованы современные методы клинического и параклинического обследования пациентов с ГКМП и гипертрофией миокарда ЛЖ при АГ, а также молекулярно-генетического, биоинформатического и статистического анализа.

Молекулярно-генетические методы включали ПЦР длинных фрагментов, массовое параллельное секвенирование, нанопоровое мономолекулярное секвенирование, секвенирование по Сэнгеру. Оценка патогенности выявленных генетических вариантов охарактеризована с учетом стандартов и критериев по интерпретации вариантов секвенирования Американской Коллегии Медицинской Генетики/Ассоциации Молекулярной Патологии (ACMG/AMP) [Richards S. et al., 2015], руководства по интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования [Рыжкова О.П. и др., 2019], онлайн-калькуляторов, созданных в Медико-генетическом научном центре РАН [<http://calc.generesearch.ru/>] и реализованного на сайте VarSome [Koranos C. et al., 2019; <https://varsome.com/>], а также специализированных для кардиомиопатий рекомендаций [Elliott P.M. et al., 2014; Ommen S.R. et al., 2020].

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Перед началом исследования было получено разрешение комитетов по биомедицинской этике НИИ кардиологии (протокол №151 от 22.12.2016 г.) и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол №4 от 25.11.2019 г.).

Положения, выносимые на защиту:

1. Технология мономолекулярного секвенирования имеет потенциал для диагностики гипертрофической кардиомиопатии, особенно в случае фазирования кандидатных вариантов.

2. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и гипертрофией миокарда левого желудочка при артериальной гипертензии гены *TPM1* и *TNNT2* характеризуются наличием гаплотипов, образованных несколькими потенциально функциональными некодирующими вариантами, которые находятся в сильном неравновесии по сцеплению.
3. Варианты пяти генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) – синонимичные и варианты в некодирующих областях, а также образованные ими гаплотипы, ассоциированы с изменчивостью эхокардиографических параметров у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных и адекватных методов клинического и параклинического обследования, современными молекулярно-генетическими технологиями, привлечением внешних данных из открытых источников и баз (ClinVar, Varsome, HMDD, NCBI и др.), валидацией результатов секвенирования с помощью альтернативных методов (секвенирование по Сэнгеру), а также использованием релевантных методов математической статистики и биоинформатики.

Апробация материалов диссертации. Результаты работы были представлены на 5 конференциях: научно-практической конференции «Редкие болезни в практике врачей разных специальностей» (2021 г.), Втором всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (2021 г.), Российском национальном конгрессе кардиологов (2022 г.), конференции Европейского общества генетики человека (Conference European Society of Human Genetics, 2022 г.), XIII научной конференции «Генетика человека и патология», посвященной 40-летию НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (2022 г.).

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 6 публикациях, из которых 4 статьи в журналах Перечня ВАК РФ, в том числе 3 из них реферируются в базах Web of Science/Scopus. По одной публикации – статья в сборнике методических рекомендаций и тезисы конференции.

Личный вклад автора. Работа выполнена в лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики, Томского НИМЦ. Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно. Изучение литературы по теме диссертации, анализ и статистическая обработка собственных результатов, а также написание диссертации выполнено лично диссертантом. Автор участвовал во всех этапах обсуждения полученных результатов и их опубликования.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, заключения и пяти приложений. Работа состоит из введения, трех глав, заключения и пяти приложений. Полный объем диссертации составляет 201 страницу, включая 35 рисунков и 13 таблиц. Список литературы содержит 315 источников из них 25 источников отечественной и 267 источников зарубежной литературы, а также 23 интернет-ресурса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования представлен на Рисунке 1. В работу включены пациенты с гипертрофией миокарда, выявленной по результатам клинического, параклинического и инструментального обследования. От всех пациентов получено добровольное письменное

информированное согласие на участие в исследовании и дальнейшее использование полученных данных в научных целях.

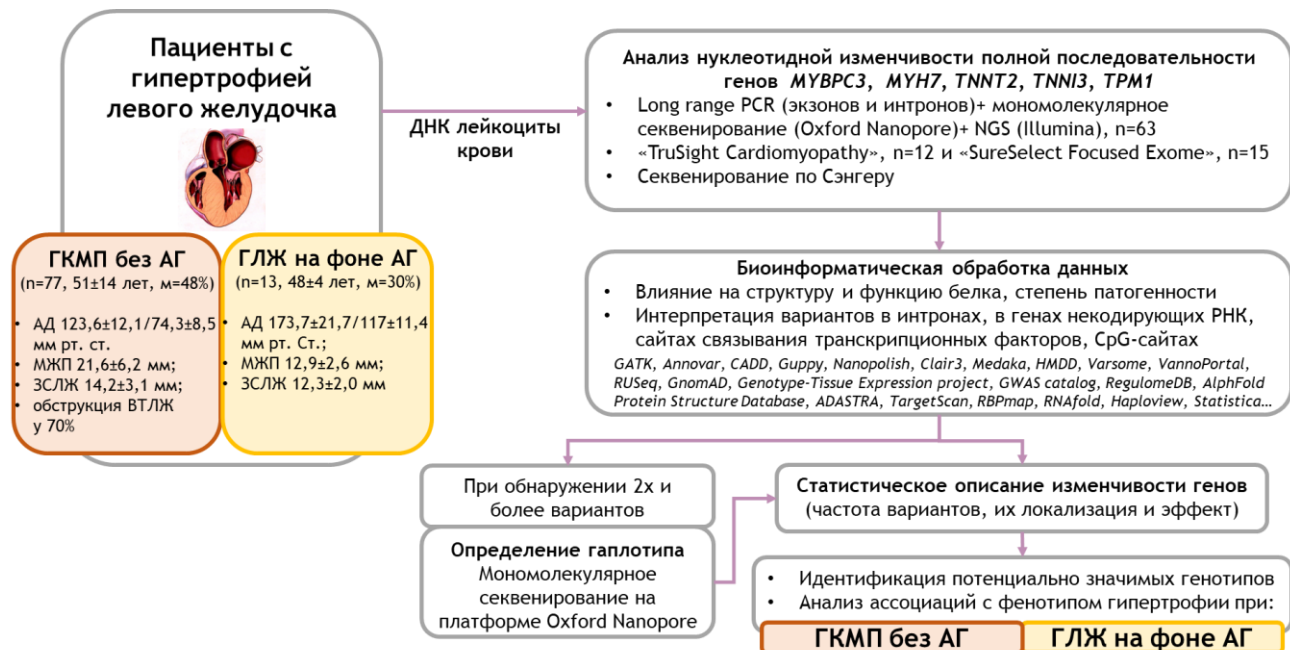


Рисунок 1. Дизайн исследования. Примечание: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, АГ – артериальная гипертензия, ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка, АД – артериальное давление, МЖП – межжелудочковая перегородка, ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ВТЛЖ – выходной тракт левого желудочка.

Выборки пациентов с гипертрофией миокарда различного генеза сформированы на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ (отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, заведующий отделением – д.м.н., профессор Павлюкова Е.Н.) и с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии». Индивиды включались в группу ГКМП или в выборку гипертрофия левого желудочка (ГЛЖ) при АГ. Всего в группе пациентов с ГКМП было 77 человек (средний возраст 51±14 лет, мужчин – 48%), в группу ГЛЖ при АГ вошло 13 пациентов (средний возраст 48±4 лет; мужчин – 30%). От всех пациентов получены образцы периферической венозной крови.

Выделение тотальной ДНК из лейкоцитов крови пациентов проведено методом фенол-хлороформной экстракции. Образцы ДНК использовали для амплификации полной последовательности генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* с помощью ПЦР длинных фрагментов, приготовления ДНК-библиотек и анализа нуклеотидной изменчивости с помощью массового параллельного секвенирования NGS (Illumina, США) или мономолекулярного нанопорового секвенирования (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Массовое параллельное секвенирование и подготовка ДНК-библиотек для 12 пациентов с ГКМП проведены в сотрудничестве с коллегами из Санкт-Петербурга (СПБ ГБУЗ Городская Больница №40 - руководитель сектора клинико-генетических исследований, д.б.н., О.С. Готов), для 15 пациентов с ГКМП – с лабораторией эпигенетики развития ФИЦ ИЦиГ СО РАН (заведующий – д.б.н., профессор Закиян С.М.). Анализ цис-/транс-положения двух вариантов в гене *MYH7* проведен с использованием образца ДНК пациента с ГКМП, полученного из лаборатории медицинской генетики ГНЦ

РФ ФГБНУ “РНЦХ имени академика Б.В. Петровского” (руководитель лаборатории – д.м.н. Заклязьминская Е.В.).

Биоинформатическая и статистическая обработка данных с целью идентификации потенциально значимых генотипов и анализа их ассоциации с фенотипом гипертрофии миокарда различного генеза осуществлена с помощью различных инструментов, в том числе GATK, Annovar, CADD, Guppy, Nanopolish, Clair3, Medaka, HMDD, Varsome, VannoPortal, RUSseq, GnomAD, Genotype-Tissue Expression project, GWAS catalog, RegulomeDB, AlphFold Protein Structure Database, ADAstra, TargetScan, RBPmap, RNAfold, Haploview, Statistica. Валидация идентифицированных клинически значимых генетических вариантов осуществлена прямым двунаправленным секвенированием по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, США). Анализ ассоциаций генотипов с количественными признаками проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Все экспериментальные работы были проведены на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ нуклеотидной изменчивости в экзонах генов саркомерных белков у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Среди пациентов с ГКМП (n=77) у 20 человек выявлено 16 вариантов в гетерозиготном состоянии, которые можно рассматривать как клинически значимые (патогенные, вероятно патогенные и VUS; Таблица 1). В том числе в гене *MYBPC3* обнаружено 4 миссенс-варианта (1 вероятно патогенный, 3 VUS), патогенный нонсенс-вариант (p.Gln1233Ter), зарегистрированный у четырех неродственных пациентов, вероятно патогенная делеция одной аминокислоты (p.515_515del) и патогенный вариант со сдвигом рамки считывания (p.Ser424ArgfsTer21). В генах *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* выявлены миссенс-замены.

В то же время, у пациентов с ГЛЖ при АГ (n=13) клинически значимых вариантов в генах саркомерных белков зарегистрировано не было.

Анализ интронной изменчивости генов саркомерных белков у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Для оценки патогенности идентифицированных генетических вариантов в генах саркомерных белков был применен онлайн-инструмент CADD v. 1.6 [Rentzsch P. et al., 2021]. Анализ проведен для двух выборок пациентов: 36 человек с диагнозом «ГКМП» и 13 человек с гипертрофией левого желудочка и диагнозом «артериальная гипертензия» (ГЛЖ при АГ).

В анализируемых генах выявлено 26 вариантов со значением показателя PHRED>10, расположенных в интронах, 4 варианта в промоторах и 3'-UTR. Примененные алгоритмы анализа результатов нанопорового секвенирования позволили определить гаплотипы, то есть цис- или транс-положение вариантов относительно друг друга на хромосомах. Варианты, имеющие вероятность функциональной значимости по CADD, были использованы для анализа структуры и частоты встречаемости образуемых ими гаплотипов в исследованных выборках.

Таблица 1. Клинически значимые варианты, выявленные в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* у пациентов с ГКМП

Замена в кДНК (rs)	Замена в белке	Технология/ алгоритм поиска вариантов	Оценка патогенности по ACMG	Количество пациентов с ГКМП	Описана впервые (V)
Ген MYBPC3					
c.C3697T (rs397516037)	p.Gln1233Ter	ONT, NGS/Medaka, Clair, Annovar	P	4	-
c.1543_1545del (rs730880643)	p.515_515del	NGS/Annovar	LP	1	-
c.1271dup	p.Ser424ArgfsTer21	ONT/Nanopolish, Clair	P	1	V
c.C1433G (rs730880540)	p.Ser478Trp	NGS/Annovar	LP	1	V
c.G223A (rs375471260)	p.Asp75Asn	ONT/Nanopolish, Clair	VUS	1	-
c.G2955T	p.Lys985Asn	ONT/Nanopolish, Clair	VUS	1	V
c.2320G>A (rs368104687)	p.Ala774Thr	ONT/Medaka, Clair	VUS	1	-
Ген MYH7					
c.G2609A (rs36211715)	p.Arg870His	ONT, NGS/Nanopolish, Clair, Annovar	P	2	-
c.C727T (rs397516265)	p.Arg243Cys	ONT/Nanopolish, Clair	P	1	-
c.G2156A (rs121913641)	p.Arg719Gln	ONT/Nanopolish, Clair	P	1	-
c.G1977A (rs1241603111)	p.Met659Ile	NGS/Annovar	LP	1	-
c.T2141G	p.Leu714Arg	ONT/Nanopolish, Clair	LP	1	V
c.T1825A	p.Tyr609Asn	ONT/Nanopolish, Clair	LP	1	V
Ген TNNT2					
c.C862T (rs121964857)	p.Arg288Cys	NGS/Annovar	LP	1	-
Ген TNNI3					
c.A401G (rs727503505)	p.Asp134Gly	ONT/Medaka, Clair	LP	1	-
Ген TPM1					
c.A305G	p.Glu102Gly	ONT/Medaka, Clair	LP	1	-

Примечание. P – патогенный вариант, LP – вероятно патогенный вариант, VUS – вариант «неизвестного значения».

В гене *MYBPC3* не было выявлено гаплотипов, образованных потенциально значимыми вариантами. Всего алгоритм CADD выделил три варианта в этом гене: мутацию стоп-кодона (p.Gln1233Ter) и две миссенс-замены (p.Arg326Gln и p.Ser236Gly). К сожалению, нам не удалось подтвердить сцепление варианта p.Gln1233Ter и p.Arg326Gln, которое мы предполагали исходя из публикаций об их совместной встречаемости у пациентов [Chakova N.N. и др., 2018]. Границы гаплотипов, в которые входят эти варианты, не перекрываются. По-видимому, это связано с тем, что в области перекрывания двух ПЦР-продуктов для гена *MYBPC3* у данного индивида не было гетерозиготных вариантов.

В гене *MYH7* в качестве потенциально значимых для его функции обозначено 4 варианта. Вариант rs7159367 расположен в области точки ветвления сплайсинга, а также может играть регуляторную роль в экспрессии *MIR208B*. Этот вариант сцеплен с другим, более редким, также значимым (по данным CADD) вариантом rs41285540, создающим консенсусный сайт точки ветвления сплайсинга. Кроме того, rs41285540 является генетическим вариантом, ассоциированным с изменением сплайсинга гена (sQTL) *NGDN*, белковый продукт которого участвует в биогенезе рибосом. У одного пациента с ГЛЖ при АГ, в дополнение к этим двум вариантам (и гомозиготного по rs7159367), на том же гаплотипе находится замена chr14:23423053 T>G – этот вариант отсутствует в базах данных. Наконец, самым высоким значением PHRED (20,2) обладал rs112635270, расположенный в консервативной части промотора.

В гене *TNNI3* выявлено два потенциально значимых однонуклеотидных полиморфизма (SNP). Вариант rs3729711 (p.Arg68Arg), с частотой минорного аллеля в разных популяциях около 4%, идентифицирован у 3 пациентов с ГКМП и одного пациента с ГЛЖ при АГ. Вариант rs11671293, который приводит к появлению нового CpG-сайта, зарегистрирован в гетерозиготном состоянии у 5 пациентов с ГЛЖ при АГ и у 14 пациентов с ГКМП, из которых 3 были гомозиготны по этому варианту. В базе GTEx имеются данные о его роли в качестве генетического варианта, ассоциированного с изменением экспрессии гена (eQTL) длинной некодирующей РНК *CTD-2587H24.5* и *TNNI3* в ЛЖ сердца и в скелетных мышцах.

В гене *TNNT2* с помощью инструментов CADD выявлено 10 вариантов с возможным функциональным эффектом. Из них 6 SNP были локализованы в интронах, 2 – в экзонах (p.Lys263Arg и p.Ile116Ile) и 2 – в промоторе гена.

В результате анализа гаплотипов гена *TNNT2*, определенных с помощью длинных прочтений, как у пациентов с ГКМП, так и у пациентов с ГЛЖ при АГ выявлен гаплотип №1, образованный альтернативными аллелями семи вариантов rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739 и rs947485, которые могут иметь функциональную значимость. Частота этого гаплотипа в исследованных нами выборках составляет около 56%. Данный гаплотип преобладает не только в выборках пациентов, но и, по-видимому, в популяции, если исходить из частот этих полиморфизмов в базах данных GnomAD и RUSeq. Вторым по распространенности является гаплотип №2 (26%), образованный референсными аллелями указанных полиморфизмов. Переходные варианты между ними редки. Этот факт требует дальнейших исследований на популяционных выборках для подтверждения или исключения действия фактора отбора на формирование гаплотипов в данном гене.

В результате анализа гаплотипов с помощью программы Haploview [Barret J.C. et al., 2005] было показано, что устойчивое сочетание семи частых полиморфизмов в цис-

положении, обнаруженное нами в результате анализа данных нанопорового секвенирования, также выявляется по результатам расчетов неравновесия по сцеплению (высокие значения D' для пар SNP 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 на рисунке 2А,Б).

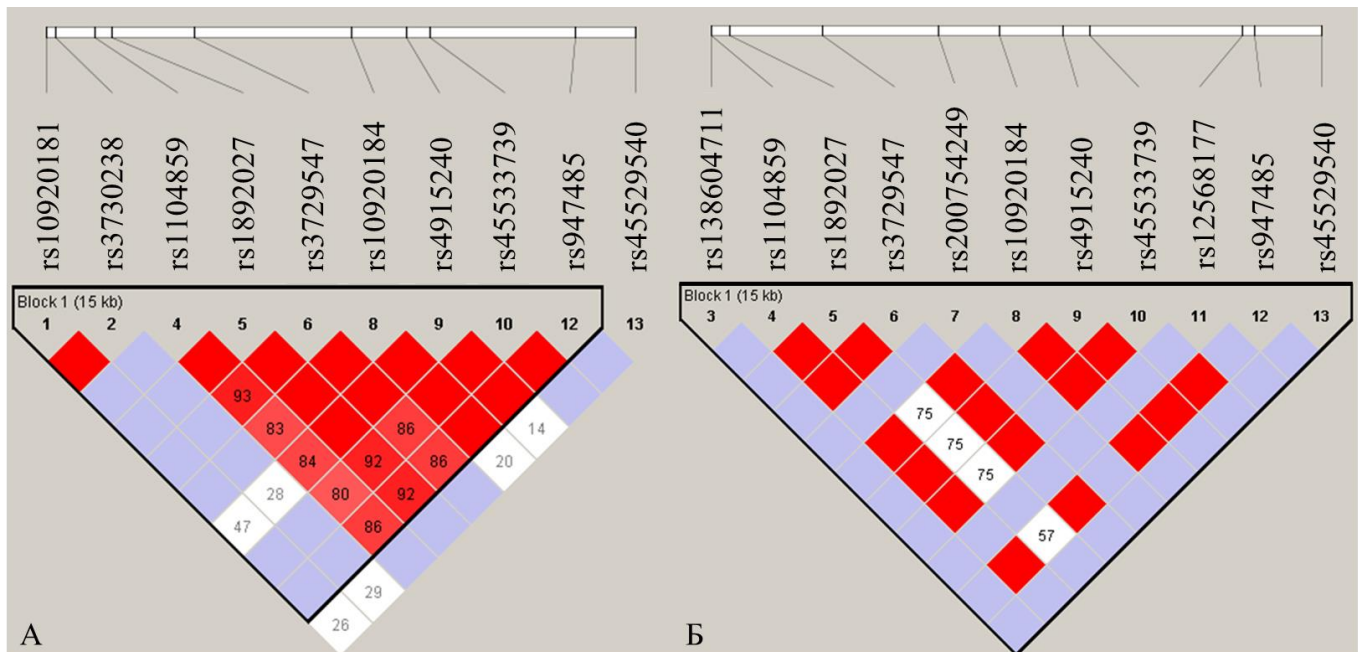


Рисунок 2. Неравновесие по сцеплению между вариантами в гене *TNNT2* в группах пациентов с ГКМП (А), ГЛЖ при АГ (Б). В неподписанных квадратах $D'=1$ (100%). Сиреневым цветом обозначены пары генетических вариантов с $D'=1$ и низким значением r^2 . Анализ проведен для вариантов с частотой в группе более 2%.

Шесть вариантов, которые входят в состав гаплотипов №1 и №2, расположены в интронах гена и являются eQTL для *PKP1* в скелетных мышцах и sQTL для *TNNT2* в ушке правого предсердия [<https://gtexportal.org/>], а один – в экзоне 10, представляет собой частый синонимичный вариант p.Ile116Ile (rs3729547), который ранее был ассоциирован с риском развития дилатационной кардиомиопатии в популяциях Китая (хань) и казахов [Li X. et al., 2013].

Три интронных варианта - rs10920184 (интрон 5), rs1892027 и rs1104859 (оба интрон 12), входящих в состав двух распространенных у пациентов гаплотипов, ранее были ассоциированы в отдельных работах GWAS с Корнельским вольтажным индексом – показателем, который рассчитывается на основе ЭКГ и используется для диагностики ГЛЖ, с морфологией трабекул сердца, аномалии которых часто выявляются при кардиомиопатиях, а также с параметрами ЭКГ [van der Harst P. et al., 2016; Meyer H.V. et al., 2020; Verweij N. et al., 2020; Young W.J. et al., 2023].

В этом же гаплотипе лежит делеция пяти нуклеотидов в полипиримидиновом тракте точки ветвления в интроне 3 (rs45533739), которая может приводить к пропуску экзона 4 в процессе сплайсинга и соответственно к увеличению в миокарде доли изоформы сTnT2 тропонина Т, которая, по некоторым данным, может быть связана с предрасположенностью к развитию гипертрофии миокарда в результате гемодинамического стресса [Komamura K. et al., 2004]. Следует отметить, что частота этой делеции в нашей выборке пациентов с ГКМП составила 65%, а в группе пациентов с ГЛЖ при АГ – 77%.

В гене *TPM1* выявлено 24 значимых генетических варианта, которые образуют в общей сложности 50 гаплотипов: 43 различных гаплотипа выявлены у 36 пациентов с ГКМП, и 15 гаплотипов – у 13 пациентов с ГЛЖ при АГ. Среди них, для варианта rs6738 известна ассоциация с дилатационной кардиомиопатией и с уровнем miR-21 в плазме крови пациентов (гомозиготы СС имели более низкий уровень данной микроРНК) [Yao Q. et al., 2019].

Согласно базе данных GTEx, три полиморфизма 3'-UTR гена *TPM1* (rs1071646, rs6738 и rs8519), входящие в самый частый гаплотип №1 (12,5% у пациентов с ГКМП и 30,8% у пациентов с ГЛЖ при АГ), являются eQTL для генов *TPM1* и *LACTB* в тканях сердца, скелетных мышцах и сосудах. Более того, rs8519 расположен близко к консервативным сайтам «сидового» региона miR-183-5p.2, miR-96-5p и miR-1271-5p, а полиморфизм rs707602 – miR-29-3p, тем самым данные варианты могут регулировать экспрессию гена *TPM1* в кардиомиоцитах опосредованно через широкий спектр микроРНК. Замена rs8519 А>G может изменять вторичную структуру мРНК TPM1, а также влиять на стабильность мРНК, по-видимому, контролируя этот процесс опосредованно через РНК-связывающие белки, согласно предикции *in silico* [RBPmap, RNAfold, RNAsnp Web Server].

Анализ структуры гаплотипов *TPM1* у пациентов позволил выявить другие блоки сцепленных друг с другом частых (более 10%) SNP. Первый состоит из 5 полиморфизмов (rs8026502, rs57645645, rs73431508, rs4075047 и rs111470259). Все они располагаются в области, кодирующей антисмысловую РНК *asTPM1* во втором интроне гена. В этой области находится альтернативный промотор *TPM1*, CpG-островок, энхансерные последовательности.

Самая высокая значимость по CADD показана для полиморфизмов rs35829897 (промотор) и rs62013181 (интрон 1). Первый из них был отмечен у одного пациента с ГЛЖ при АГ, а также у двух пациентов с ГКМП, на разных гаплотипах. Второй был выявлен только у пациентов с ГКМП на одном гаплотипе. Обе этих замены ведут к появлению новых CpG-сайтов, которые могут участвовать в эпигенетической регуляции экспрессии гена *TPM1*.

Анализ неравновесия по сцеплению для полиморфизмов в гене *TPM1* с помощью программы Haploview выявил четыре блока сцепления у пациентов с ГКМП (рисунок 3А). Первый включает два полиморфизма с самым высоким значением RHRED, в промоторе (rs35829897) и в первом интроне (rs62013181), и фактически не сцеплен с полиморфизмами в остальной части гена. Более того, редкие аллели этих двух SNP также не сцеплены друг с другом, что совпадает с результатами прямого определения гаплотипов с помощью нанопорового секвенирования (редкие аллели rs35829897 и rs62013181 находятся на разных гаплотипах).

Второй блок сцепления включает SNP во втором интроне гена (*TPM1-AS* РНК) с высокими показателями D', что также было установлено с помощью нанопорового секвенирования (см. выше). Третий блок содержит три SNP, и четвертый – 8 SNP в последних экзонах гена и в 3'-нетранслируемой области, в том числе rs8519 (16) и rs6738 (18; рисунок 3А).

У пациентов с сочетанием ГЛЖ при АГ с помощью программы Haploview выявлено два блока сцепления полиморфизмов в гене *TPM1* (рисунок 3Б). Варианты в гене антисмысловой РНК (3–7) и в 3'-нетранслируемом регионе (15–19) также расположены в разных гапблоках, как и у пациентов с ГКМП (рисунок 3А).

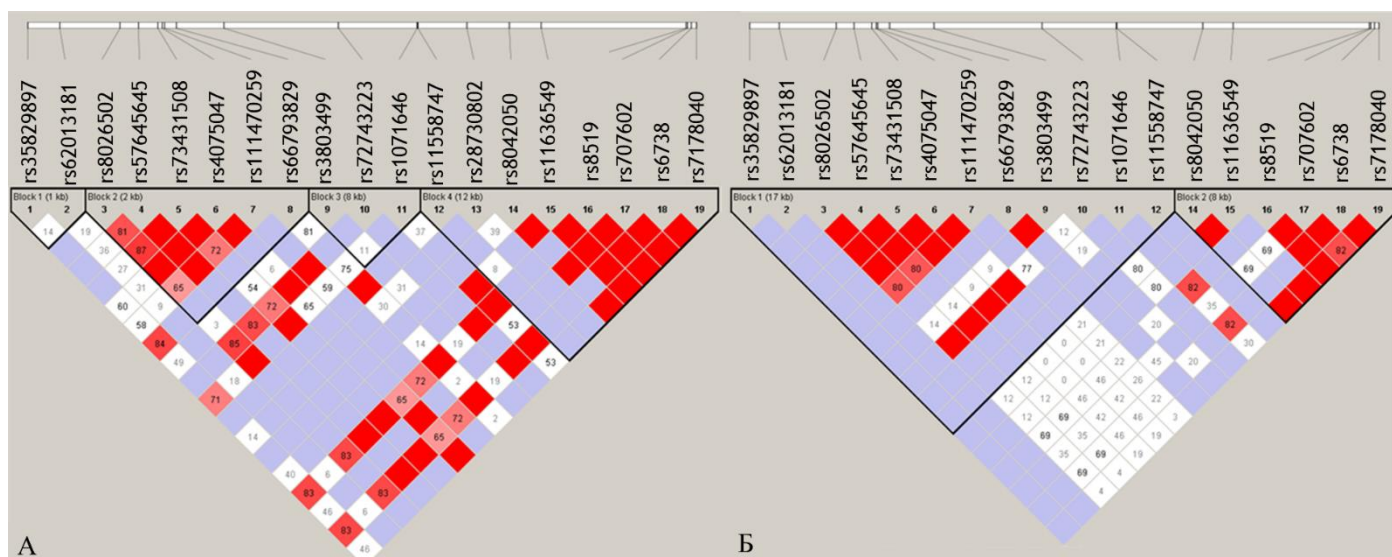


Рисунок 3. Неравновесие по сцеплению между SNP в гене *TPM1* в выборке пациентов с ГКМП (А), ГЛЖ при АГ (Б). В неподписанных квадратах $D'=1$ (100%). Сиреневым цветом обозначены пары генетических вариантов с $D'=1$ и низким значением r^2 . Анализ проведен для вариантов с частотой в группе более 2%.

Таким образом, анализ структуры неравновесия по сцеплению и частоты встречаемости гаплотипов в гене *TPM1* у пациентов с ГКМП, а также сочетанием ГЛЖ при АГ, показывает, что в регуляторных участках гена, в том числе в гене антисмысловой РНК и в 3'-нетранслируемом регионе, существуют устойчивые гаплотипы, образованные аллелями нескольких SNP с вероятным функциональным значением.

Сравнение технологий прямого мономолекулярного секвенирования (Oxford Nanopore Technologies) и массового параллельного секвенирования (Illumina) генов саркомерных белков с использованием образцов ДНК пациентов с гипертрофической кардиомиопатией

В результате сравнения показателей качества секвенирования четырех образцов ДНК пациентов с ГКМП для двух методов обнаружено, что для прямого мономолекулярного секвенирования характерна более высокая частота ошибок секвенирования (6,86–6,92%), чем для технологии Illumina (1,14–1,35%).

Секвенирование Oxford Nanopore Technologies выявило гораздо большее количество коротких делеций и инсерций по сравнению с секвенированием Illumina. Среди 85,5% прочтений, полученных при секвенировании Oxford Nanopore Technologies, обнаружена, как минимум, одна инсерция (аналогично 85% прочтений имеют, как минимум, одну делецию). Аналогичные показатели для метода Illumina составили 0,7% и 1,4% соответственно.

Средняя оценка качества выравнивания прочтений была одинакова для обоих методов (Oxford Nanopore Technologies: 59,73–59,81 и Illumina: 58,83–59,03). При секвенировании

Oxford Nanopore Technologies в среднем длина прочтения составила 3560 п.о., а глубина – 3900х. Глубина прочтения при секвенировании Illumina была в среднем 300х.

В большинстве случаев однонуклеотидные варианты (SNV), идентифицированные в результате прямого мономолекулярного секвенирования, совпадали с таковыми, выявленными технологией Illumina. Тем не менее, имели место некоторые несоответствия генотипов, и наибольшее число различий обнаружено среди гомополимерных последовательностей и областей, содержащих tandemные повторы.

Следует заметить, что необходимо проявлять осторожность при идентификации генотипов в случае использования технологии мономолекулярного секвенирования Oxford Nanopore Technologies. Поскольку выявленный вариант с.3697C>T (p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3*, исходя из данных Oxford Nanopore Technologies, был идентифицирован как гомозиготный, тогда как Illumina идентифицировала его как гетерозиготный. При этом число прочтений, содержащих альтернативный аллель, составило 80% для технологии Oxford Nanopore Technologies, а для Illumina – 87%. Секвенирование по Сэнгеру подтвердило гетерозиготное носительство варианта.

Различие между методами Oxford Nanopore Technologies и Illumina в количестве идентифицированных однонуклеотидных замен может быть связано с пока еще несовершенными алгоритмами биоинформатической обработки данных мономолекулярного секвенирования.

Определение цис-положения кандидатных вариантов в гене *MYH7*

В наше исследование вошел пациент с семейной формой ГКМП, осложненной нарушениями ритма сердца. В ФГБНУ «РНЦХ им. академика Б.В. Петровского» в результате молекулярно-генетической диагностики ГКМП в гене *MYH7* было выявлено два генетических варианта: вероятно патогенный (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и VUS с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys). Проведенное нами нанопоровое секвенирование длинных фрагментов ДНК позволило напрямую определить цис-положение данных вариантов, то есть на одной хромосоме (рисунок 4).

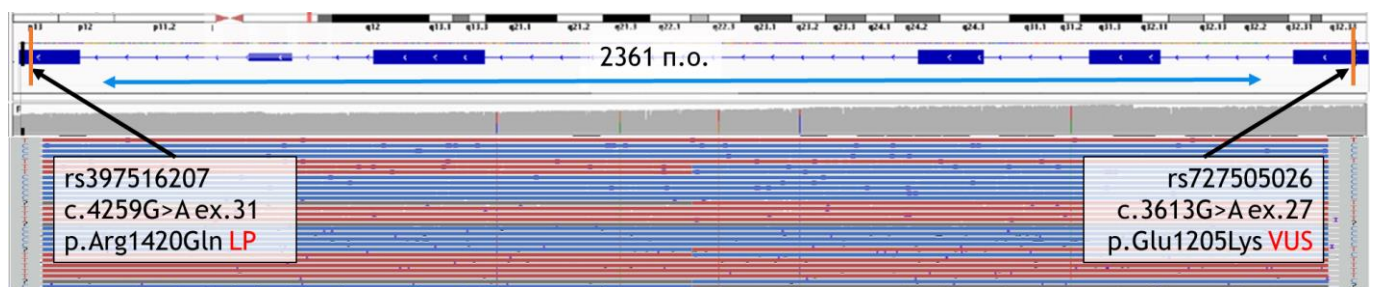


Рисунок 4. Фазирование двух вариантов (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys)) в гене *MYH7* у пациента с семейной формой ГКМП с помощью мономолекулярного секвенирования.

Этот результат важен для молекулярно-генетической диагностики и прогноза течения заболевания, а также медико-генетического консультирования – планирования беременности и проведения пренатальной диагностики, так как полученные данные говорят о том, что пациентки есть «здоровая» копия гена.

Описание отдельных случаев семей с редкими патогенными вариантами в генах *MYBPC3* и *MYH7*

Патогенный нонсенс-вариант p.Gln1233Ter в гене *MYBPC3* был выявлен у четырех пациентов с ГКМП в гетерозиготном состоянии. У всех пациентов наблюдалась выраженная клиническая картина ГКМП. Проведенный нами анализ публикаций показал значительную клиническую вариабельность у пациентов с p.Gln1233Ter. Несколько пациентов с симптоматической и тяжелой ГКМП имеют аритмию, а сочетание мутации в гене *MYBPC3* и в других генах саркомерных белков является причиной более тяжелого клинического фенотипа. Тяжелая степень ГКМП с обструкцией выходного тракта левого желудочка была обнаружена у пациентов с p.Gln1233Ter и p.Arg326Gln в компаунд-гетерозиготном состоянии в гене *MYBPC3*.

Патогенный миссенс-вариант в гене *MYH7* c.G2609A (rs36211715, p.Arg870His) выявлен у пациентов с выраженной ГКМП. У одного из пациентов отмечена тяжелая форма ГКМП, потребовавшая повторного хирургического вмешательства в связи с рецидивом гипертрофических изменений. Проведенный нами анализ литературы показал, что у носителей p.Arg870His отмечается широкий спектр фенотипических проявлений (от бессимптомных форм до тяжелых случаев с внезапной сердечной смертью). При этом в большинстве случаев регистрируется умеренная степень тяжести течения заболевания и невысокий риск внезапной смерти, что согласуется с клиническими особенностями заболевания в представленных нами двух случаях.

Ассоциации полиморфизма генов саркомерных белков с выраженностью гипертрофии миокарда у пациентов с ГКМП

Для анализа ассоциаций выявленного полиморфизма пяти генов саркомерных белков с эхокардиографическими признаками гипертрофии миокарда были выбраны 17 SNP (с популяционной частотой $\geq 15\%$) с возможной функциональной значимостью по данным CADD. В связи с малой численностью пациентов с ГЛЖ при АГ, анализ проводили только для пациентов с ГКМП. Основным методом сравнения групп был критерий Манна-Уитни.

Кроме сравнения отдельных генотипов, в некоторых случаях объединяли гетерозигот с гомозиготами по редкому аллелю. Выделены подгруппы пациентов в зависимости от наличия вариантов III–V классов патогенности, а также в зависимости от возраста начала заболевания (старше 30 лет). Ассоциации отдельных SNP с эхокардиографическими параметрами миокарда пациентов представлены в Таблице 2.

Результаты анализа показывают, что полиморфизм генов саркомерных белков вносит вклад в формирование фенотипа заболевания – главным образом, в отношении степени гипертрофии миокарда (толщина межжелудочковой перегородки (МЖП), толщина задней стенки левого желудочка (ЗСЛЖ) масса и индекс массы миокарда левого желудочка (ММЛЖ и ИММЛЖ соответственно)) и характеристики сократительной функции сердца (фракция выброса (ФВ) левого желудочка). Кроме того, для варианта rs11671293 гена *TNNI3* выявлена ассоциация с возрастом манифестации заболевания в подгруппе пациентов с поздним началом болезни (после 30 лет).

Таблица 2. Ассоциации отдельных SNP с вариабельностью количественных признаков у пациентов с ГКМП

Ген	Вариант	Аллель (генотип)	Эффект	p	Примечание
<i>TNNT2</i>	rs45533739 (I>D)	D (DD)	↑ Масса и индекс массы миокарда	0,02	ИММЛЖ <300
<i>TPM1</i>	rs8519 (A>G)	G (GG)	↑ Толщина межжелудочковой перегородки	0,03	-
			↑ Масса и индекс массы миокарда	0,02	-
	rs1071646 (C>A)	A (AA)	↑ Толщина межжелудочковой перегородки	0,03	-
			↑ Масса и индекс массы миокарда	0,02	-
	rs66793829 (G>C)	G (GG)	↑ Индекс массы миокарда	0,04	-
	rs3803499 (T>C)	C (TC+CC)	↓ Фракция выброса левого желудочка	0,01	-
<i>MYBPC3</i>	rs2269434 (T>C)	T (TT)	↑ Толщина задней стенки левого желудочка	0,02	-
<i>MYH7</i>	rs2069542 (G>A)	A (GA)	↑ Градиент давления левого желудочка	0,01	Без мутаций
	rs7159367 (T>C)	T (TT)	↓ Фракция выброса левого желудочка	0,04	-
			↓ Фракция выброса левого желудочка	0,02	Без мутаций
			↑ Толщина межжелудочковой перегородки	0,03	-
			↑ Индекс массы миокарда	0,04	-
			↑ МЖП/ЗСЛЖ	0,04	-
			↑ Масса миокарда левого желудочка	0,04	-
<i>TNNI3</i>	rs7157716 (A>G)	G (AG)	↑ МЖП/ЗСЛЖ	0,05	>30 лет
			↓ Фракция выброса левого желудочка	0,02	Без мутаций
			↓ Возраст	0,03	С мутациями
	rs11671293 (T>C)	C (CC+TC)	↓ Возраст	0,02	>30 лет

Примечание. rs – идентификатор варианта в базе данных NCBI dbSNP; ↑ и ↓ – значения признака выше и ниже; «с мутациями» – подгруппа пациентов с выявленными вариантами III–V классов патогенности; «без мутаций» – подгруппа пациентов без таких вариантов; >30 лет – подгруппа пациентов старше 30 лет; ИММЛЖ <300 – подгруппа пациентов без экстремально высоких значений индекса массы миокарда левого желудочка.

Анализ ассоциаций гаплотипов генов *TNNT2* и *TPM1* с выраженностью гипертрофии миокарда у пациентов с ГКМП

Для выявления сочетанного эффекта вариантов в генах *TNNT2* и *TPM1* были проанализированы гаплотипы, образованные наиболее частыми сцепленными друг с другом вариантами. В гене *TNNT2* у гомозигот по гаплотипу №1, образованному альтернативными аллелями rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739 и rs947485, обнаружены более низкие значения ФВ ЛЖ по сравнению с гетерозиготами (второй аллель относился либо к гаплотипу №2, либо к другим вариантам; 62 [59-64]% vs. 72,5 [71-81]%, p=0,02).

В гене *TPM1* в 3'-UTR было выделено три гаплотипа: первый характеризовался альтернативными аллелями rs8519 и rs6738, второй – альтернативными аллелями rs707602 и rs7178040, третий – референсными аллелями по всем четырем полиморфизмам.

Сравнение подгрупп пациентов, имеющих и не имеющих эти гаплотипы, выявило ассоциацию гаплотипа №1 с более высокими значениями МЖП ($p=0,02$), ММЛЖ ($p=0,01$), ИММЛЖ ($p=0,005$; рисунок 5А, Б и В), а также ассоциацию гаплотипа №3 с относительно низкими значениями МЖП ($p=0,001$), МЖП/ЗСЛЖ ($p=0,02$), ММЛЖ ($p=0,004$), ИММЛЖ ($p=0,01$; рисунок 5 Г, Д, Е и Ж). Для гаплотипа №2 не было показано статистически значимых ассоциаций.

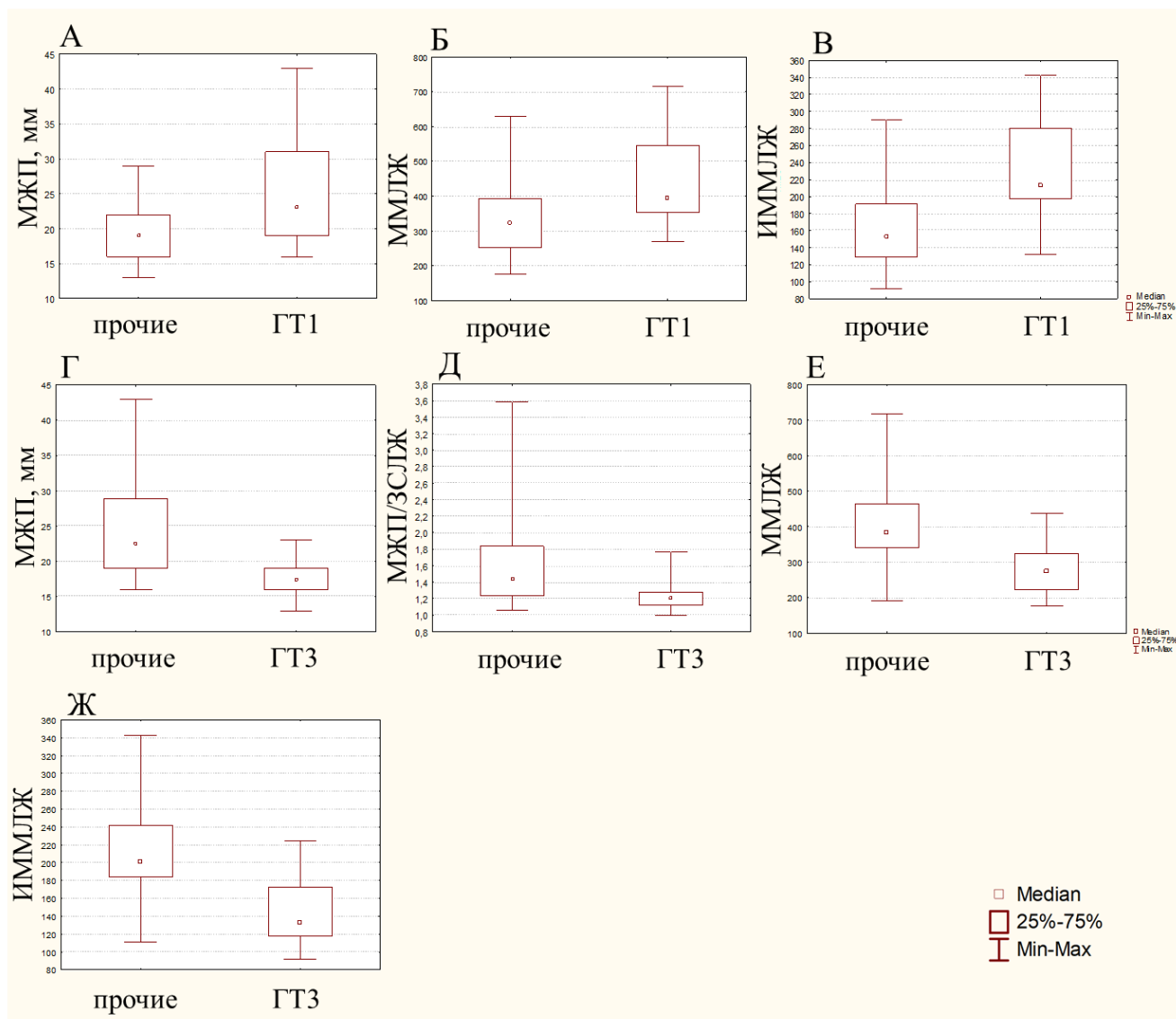


Рисунок 5. Анализ ассоциаций гаплотипов в 3'-UTR гена *TPM1*. А – гаплотипа 1 с толщиной межжелудочковой перегородки (МЖП); Б – гаплотипа 1 с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ); В – гаплотипа 1 с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ); Г – гаплотипа 3 с толщиной МЖП; Д – гаплотипа 3 с отношением толщины межжелудочковой перегородки к толщине задней стенки левого желудочка (МЖП/ЗСЛЖ); Е – гаплотипа 3 с ММЛЖ; Ж – гаплотипа 3 с ИММЛЖ.

В области гена антисмысловой РНК (*TPM1-AS*), было выделено два гаплотипа, образованных двумя полиморфизмами: объединенный гаплотип №1' образован референсными аллелями для обоих SNP, гаплотип №2' - альтернативными аллелями для обоих SNP, гаплотип №3' - референсным аллелем rs66793829 и альтернативным аллелем rs3803499. Согласно полученным результатам, присутствие в генотипе пациента с ГКМП

гаплотипа №2' ассоциировано с более низкими показателями ММЛЖ (медианное значение ММЛЖ у пациентов с гаплотипом №2' = 290,52 г, с прочими гаплотипами = 376,3 г; $p=0,01$) и ИММЛЖ (медианное значение ИММЛЖ у пациентов с гаплотипом №2' = 198,65 г/м², с прочими гаплотипами = 132,2 г/м²; $p=0,02$) по сравнению с остальными генотипами.

Гаплотип №3', наоборот, ассоциирован с более высокими показателями ММЛЖ (медианное значение ММЛЖ у пациентов с гаплотипом №3' = 446,5 г, с прочими гаплотипами = 329,5 г; $p=0,01$) и ИММЛЖ (медианное значение ИММЛЖ у пациентов с гаплотипом №3' = 242,0 г/м², с прочими гаплотипами = 184,5 г/м²; $p=0,004$), а также с меньшими значениями ФВ (медианное значение ФВ у пациентов с гаплотипом №3' = 61,5%, с прочими гаплотипами 72,4% $p=0,03$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования оценена нуклеотидная изменчивость полной последовательности генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) у пациентов с ГКМП и с компенсаторной гипертрофией миокарда при АГ. Особенность нашего подхода – включение в секвенирование некодирующей части генов путем амплификации перекрывающихся длинных продуктов ПЦР (длина до 9 тысяч п.н.). Применялись методы массового параллельного секвенирования и нанопорового (мономолекулярного) секвенирования, с подтверждением выявленных генетических вариантов секвенированием по Сэнгеру.

Идентифицированные генетические варианты были классифицированы по степени патогенности с учетом критериев ACMG [Richards S. et al., 2015; Рыжкова О.П. и др., 2019; www.calc.generesearch.ru/; www.varsome.com/] и специализированных для кардиомиопатий рекомендаций [Elliott P.M. et al., 2014; Ommen S.R. et al., 2020]. В результате у 26% (20 из 77) пациентов с ГКМП были обнаружены клинически значимые варианты III–V класса патогенности (патогенные, вероятно патогенные и с неопределенным значением). В отличие от них, у пациентов с компенсаторной гипертрофией миокарда при АГ ($n=13$) не выявлено клинически значимых генетических вариантов, и обнаружены только редкие (с частотой в популяциях менее 1%) варианты I–II класса патогенности (доброкачественные и вероятно доброкачественные).

Наибольшее количество клинически значимых вариантов было локализовано в генах *MYBPC3* и *MYH7* (44% и 38% соответственно), а в генах *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* обнаружено по одному вероятно патогенному варианту. По типу 81% идентифицированных генетических вариантов представляли собой миссенс-замены, в то же время нонсенс мутации, делеция одной аминокислоты и сдвиг рамки считывания встречались реже. Все варианты, обнаруженные у пациентов с ГКМП, являлись уникальными, за исключением с.С3697Т (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* и с.С2609А (rs36211715, p.Arg870His) в гене *MYH7*, выявленных у четырех и двух пациентов соответственно. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией в генах *MYBPC3* и *MYH7* идентифицированы пять клинически значимых генетических вариантов, которые ранее не были описаны в литературе.

Проведено сравнение качества секвенирования одних и тех же продуктов ПЦР пяти генов саркомерных белков, полученных от 4 пациентов с ГКМП, с помощью Oxford Nanopore Technologies и Illumina. В результате обнаружено, что для прямого

мономолекулярного секвенирования характерна более высокая частота ошибок секвенирования (6,86–6,92%), чем для технологии Illumina (1,14–1,35%). Секвенирование Oxford Nanopore Technologies выявило гораздо большее количество коротких делеций и инсерций. Наибольшее число различий для однонуклеотидных вариантов обнаружено среди гомополимерных последовательностей и областей, содержащих tandemные повторы. Кроме того, отмечены ошибки при определении генотипов отдельных генетических вариантов: алгоритмы Oxford Nanopore Technologies определяли гетерозигот как гомозигот. Однако в настоящее время увеличивается точность нанопорового секвенирования и оптимизируются алгоритмы биоинформатического анализа.

С помощью прямого нанопорового секвенирования длинных фрагментов ДНК были проанализированы два клинически значимых варианта (с.3613G>A (p.Glu1205Lys) и с.4259G>A (p.Arg1420Gln)) в гене *MYH7* у пациента с семейной формой гипертрофической кардиомиопатии. Было установлено, что данные варианты находятся в цис-положении (на одном аллеле), что может иметь значение для медико-генетического консультирования. Таким образом, технология мономолекулярного секвенирования имеет потенциал для диагностики ГКМП, особенно в случае выявления двух и более потенциально патогенных вариантов в одном из анализируемых генов саркомерных белков для прямого определения гаплотипов (определение цис- или транс-положения вариантов).

Были получены результаты по структуре гаплотипов, образованных выявленными вариантами в генах саркомерных белков. Показано, что для генов *TNNT2* и *TPM1* характерно наличие гаплотипов, в которые входят несколько сцепленных между собой потенциально функциональных некодирующих вариантов. В гене *TNNT2* выявлен частый гаплотип, образованный семью вариантами, которые могут влиять на сплайсинг данного гена в миокарде. Причем три интронных варианта ранее были ассоциированы с морфологическими и функциональными параметрами сердца в работах GWAS [van der Harst P. et al., 2016; Meyer H.V. et al., 2020; Verweij N. et al., 2020; Young W.J. et al., 2023]. Анализ структуры неравновесия по сцеплению и частоты встречаемости гаплотипов в гене *TPM1* показывает устойчивые гаплотипы, образованные аллелями нескольких частых SNP с вероятным функциональным значением. Существование таких «устойчивых» гаплотипов в генах *TNNT2* и *TPM1* у пациентов ГКМП и с гипертрофией ЛЖ при АГ, может свидетельствовать о действии отбора в отношении определенных сочетаний вариантов, что может быть обусловлено внутригенными эпистатическими эффектами.

На примере вариантов с.С3697Т (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* и с.С2609А (rs36211715, p.Arg870His) в гене *MYH7* был выполнен анализ изменчивости клинических показателей у их носителей, как в нашей выборке, так и в имеющихся публикациях. Показано, что у носителей одного и того же патогенного варианта может регистрироваться широкий диапазон клинических симптомов гипертрофической кардиомиопатии, а также другие формы кардиомиопатии (некомпактный миокард, аритмогенная кардиомиопатия). Это подчеркивает важность идентификации и изучения дополнительных факторов, как генетических, так и эпигенетических, которые, наряду с факторами внешней среды, могут выступать в качестве модификаторов клинического фенотипа у носителей патогенных вариантов при наследственных кардиомиопатиях.

Был проведен анализ ассоциаций частых генетических вариантов и образованных ими гаплотипов с клинически значимыми количественными признаками у пациентов с ГКМП. Результаты анализа показывают, что полиморфизм генов саркомерных белков вносит вклад

в формирование фенотипа заболевания – главным образом, в отношении степени гипертрофии миокарда и фракции выброса левого желудочка, а также возраста манифестации заболевания.

Выполнение анализа ассоциаций для гаплотипов, объединяющих частые варианты, генов *TNNT2* и *TPM1* показало, что в некоторых случаях эффект обусловлен взаимодействием сцепленных между собой вариантов. Так, наиболее частый гаплотип *TNNT2* ассоциирован с фракцией выброса левого желудочка, хотя ни один из отдельных вариантов, образующих этот гаплотип, не показал такой связи.

Принципиально новым в данной работе является исследование модифицирующего эффекта гаплотипов в генах саркомерных белков, в том числе образованных вариантами в не кодирующих регионах с функциональным потенциалом. Выявленные ассоциации позволяют утверждать, что такой эффект есть, однако с учетом небольшого объема выборки данный вопрос требует дальнейших исследований.

Таким образом, в диссертационной работе получены данные о том, что изменчивость в генах саркомерных белков может оказывать эффект на фенотип гипертрофии миокарда различного генеза – гипертрофической кардиомиопатии и гипертрофии при артериальной гипертензии. Данный пример представляет собой частный случай феномена коморбидности между моногенными и многофакторными заболеваниями или «менделевского кода», который связывает каждое многофакторное заболевание с уникальной совокупностью менделевских локусов. Наш опыт свидетельствует о том, что технология секвенирования третьего поколения представляет значительный интерес с точки зрения разработки панелей целевых генов для диагностики наследственных заболеваний. Возможность прямого определения протяженных гаплотипов, а также быстрое развитие инструментов анализа данных делают эту технологию перспективной для применения в диагностике наследственных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. У 26% пациентов с гипертрофической кардиомиопатией выявлены клинически значимые (патогенные, вероятно патогенные и варианты неясного значения) генетические варианты, из которых большинство являлось миссенс-заменами (81%) и было локализовано в генах *MYBPC3* и *MYH7* (44% и 38% соответственно). В то же время, у пациентов с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, не обнаружено клинически значимых генетических вариантов.

2. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, идентифицирован протяженный гаплотип в гене *TNNT2*, образованный потенциально функционально значимыми вариантами (rs1104859, rs3729547, rs4915240 и rs947485), и сцепленный с SNP (rs1104859, rs1892027, rs10920184), ранее ассоциированными с аномалиями трабекул и ЭКГ-показателями гипертрофии миокарда по результатам GWAS.

3. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, выявлены гаплотипы в гене *TPM1*, включающие потенциально значимые варианты. Гаплотип, образованный альтернативными аллелями rs8026502, rs73431508, rs4075047, rs57645645 и rs111470259, расположен в области интрона 2, обогащенной регуляторными элементами. В регионе 3'-UTR в транс-положении по отношению друг к другу локализованы два гаплотипа,

составленные из потенциально функционально значимых вариантов rs8519 и rs6738, а также rs11636549, rs707602 и rs7178040.

4. У пациента с семейной формой гипертрофической кардиомиопатии установлено цис-положение клинически значимых генетических вариантов (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys)), расположенных на расстоянии 2,4 Кб друг от друга, в гене *MYH7* с помощью мономолекулярного секвенирования.

5. Обнаружена связь вариантов в некодирующих участках исследованных генов с изменчивостью клинически значимых показателей при гипертрофической кардиомиопатии. В частности, аллель «Т» (генотип TT) rs7159367 в интроне 29 *MYH7*, аллель «D» (генотип DD) rs45533739 в интроне 3 *TNNT2*, аллель «G» (генотип GG) rs8519 в 3'-UTR и аллель «G» (генотип GG) rs66793829 в интроне 2 *TPM1* ассоциированы с большей выраженностью гипертрофии миокарда. Аллель «С» (генотип TC+CC) rs3803499 в интроне 2 *TPM1*, аллель «Т» (генотип TT) rs7159367 в интроне 29 *MYH7* и аллель «С» (генотип CC+TC) rs11671293 в интроне 1 *TNNI3* ассоциированы с меньшими значениями фракции выброса левого желудочка. Аллель «С» (генотип CC+TC) rs11671293 в интроне 1 *TNNI3* также связан с более ранним возрастом начала заболевания в группе пациентов старше 30 лет.

6. Выявлены ассоциации гаплотипов, образованных изученными вариантами генов *TNNT2* и *TPM1* с изменчивостью эхокардиографических показателей у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией. В частности, гомозиготность по наиболее частому гаплотипу *TNNT2* (rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739, rs947485) ассоциирована с меньшими значениями фракции выброса левого желудочка; гаплотип, образованный «альтернативными» аллелями rs8519 и rs6738 в 3'-UTR *TPM1*, а также сцепленный с ним гаплотип в интроне 2 *TPM1* (rs66793829, rs9803499) ассоциированы с более высокими значениями массы миокарда и индекса массы миокарда левого желудочка.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Salakhov R.R., Golubenko M.V., **Valiakhmetov N.R.**, Pavlyukova E.N., Zarubin A.A., Babushkina N.P., Kucher A.N., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S. Application of Long-Read Nanopore Sequencing to the Search for Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – № 24. – P. 15845.
2. Кучер А.Н., Салахов Р.Р., Голубенко М.В., Павлюкова Е.Н., **Валиахметов Н.Р.**, Назаренко М.С. Фенотипическая вариабельность гипертрофической кардиомиопатии у носителей патогенного варианта p.Arg870His гена *MYH7* // Вестник сибирской медицины. – 2022. – Т. 21. – № 3. – С. 205-216.
3. Салахов Р.Р., Голубенко М.В., Павлюкова Е.Н., Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., **Валиахметов Н.Р.**, Марков А.В., Беляева Е.О., Канев А.Ф., Назаренко М.С. Опыт молекулярно-генетической диагностики гипертрофической кардиомиопатии с использованием нанопорового секвенирования ДНК // Российский кардиологический журнал. – 2021. – Т. 26. – № 10. – С. 4673.
4. Салахов Р.Р., Голубенко М.В., Павлюкова Е.Н., Марков А.В., Бабушкина Н.П., Канев А.Ф., **Валиахметов Н.Р.**, Назаренко М.С. Применение технологии

мономолекулярного секвенирования для ДНК-диагностики гипертрофической кардиомиопатии // Медицинская генетика. – 2020. – № 5(214). – С. 9-10.

Статьи в сборниках и материалах конференций:

5. Голубенко М.В., Салахов Р.Р., **Валиахметов Н.Р.**, Бабушкина Н.П., Зарубин А.А., Кучер А.Н., Назаренко М.С. Молекулярно-генетическая диагностика гипертрофической кардиомиопатии с использованием метода высокопроизводительного секвенирования // В сборнике: Методические рекомендации по медицинским технологиям молекулярной диагностики хромосомных и наследственных болезней. Методические рекомендации. Новосибирск, 2022. – С. 145-168.
6. Salakhov R.R., Golubenko M.V., Zarubin A.A., Pavlyukova E.N., Kanev A. F., Glotov O.S., Alaverdian D.A., Tsay V.V., **Valiakhmetov N.R.**, Nazarenko M.S. Sequencing of cardiomyopathy genes in patients with hypertrophic cardiomyopathy reveals enrichment for rare variants in the genes for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy // Abstracts from the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference. European Journal of Human Genetics. – 2022. – V. 30. – № S1. – P. 1-2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия

ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка

ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка

ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка

ЛЖ – левый желудочек

МЖП – межжелудочковая перегородка

ММЛЖ – масса миокарда левого желудочка

ФВ – фракция выброса

ACMG – (от англ. American College of Medical Genetics) - Американская Коллегия Медицинской Генетики

eQTL – (от англ. expression quantitative trait loci) – генетические варианты, ассоциированные с изменением экспрессии гена

GWAS – (от англ. Genome-wide association studies) – полногеномное ассоциативное исследование

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

sQTL – (от англ. Splicing Quantitative Trait Loci) – генетические варианты, ассоциированные с изменением сплайсинга гена

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03

к.б.н. Хитринской И.Ю.

e-mail: i.khitrinskaya@medgenetics.ru