

SANGEROVA SEKVENAČNÁ ANALÝZA VYBRANÝCH EXÓNOV GÉNOV *NEBL*, *MYBPC3* A *SCN5A* V SPOJITOSTI S HYPERTROFICKOU KARDIOMYOPATIOU U PACIENTOV ZO SLOVENSKA

Soňa Mačeková, Iveta Tóthová, Lucia Gajdošová, Iveta Boroňová, Michaela Zigová, Jarmila Bernasovská, Petra Lamancová

Katedra biológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, Ul. 17. novembra 1, 081 16, Prešov, Slovensko; e-mail: macekovasona@gmail.com

Abstract: *Sanger sequence analysis of selected exons of the NEBL, MYBPC3 and SCN5A genes in association with hypertrophic cardiomyopathy in patients from Slovakia.* Hypertrophic cardiomyopathy is a disorder of left ventricular myocardial structure and function. It is characterized by abnormal left ventricular hypertrophy, dyspnea, chest pain, and arrhythmia. It can lead to heart failure and sudden cardiac death. In the last 10 years, we have seen the greatest progress in clinical, biochemical and genetic studies of hypertrophic cardiomyopathy. The aim of our study was to identify mutations responsible for the development of hypertrophic cardiomyopathy using the Sanger sequencing analysis in 15 probands. We sequenced three genes – *NEBL* (exon 3), *MYBPC3* (exon 12), *SCN5A* (exon 27). A heterozygous mutation in the *NEBL* gene was found in a 60-year-old patient with HCM, and two heterozygous mutations were found in the *MYBPC3* gene in two asymptomatic probands whose mother suffers from this disease. However, we did not find a causal mutation in this gene. For the future, we would recommend a further analysis of the whole exome sequencing of the affected patients and their family members, which could reveal a causal mutations, and greatly accelerate diagnostics of the disease in family members.

Key words: cardiomyopathy, heart disease, genetic testing, Sanger sequencing, pathogenic variants, East Slovakia, Central Europe

Úvod

Kardiomyopatie sú klinicky významnou heterogénnou skupinou kardiovaskulárnych chorôb, ktorých dominantným rysom je postihnutie myokardu so štrukturálnymi a/alebo funkčnými abnormalitami. Kardiomyopatie majú familiárny výskyt a sú charakteristické výraznou genetickou, alelickou a fenotypovou variabilitou. V dôsledku variability sa v rámci kardiomyopatií môžu vyskytovať rozličné formy, s rozličným druhom prenosu a odlišným rizikom pre príbuzných (Perrot, Dietz a Osterziel 2007). Jednou z foriem kardiomyopatií je hypertrofická (HKM), ktorá patrí k najčastejším dedičným srdcovým ochoreniam s celosvetovo uvádzanou prevalenciou 1:500 (Hershberger et al. 2009). Mutácií spôsobujúcich HKM je niekoľko stoviek a nachádzajú sa v desiatkach rôznych génov (Maron a Maron 2013), čo má za následok širokú škálu výsledného kardiálneho postihnutia a klinického obrazu od asymptomatického až po včasný vývoj srdcového zlyhávania alebo vysoké riziko náhlej smrti (Teekakirikul et al. 2013).

Cieľom štúdie bol mutačný skríning troch exónov génov asociovaných s kardiomyopatiami: *NEBL*, *MYBPC3* a *SCN5A*. Gén *NEBL* lokalizovaný na krátkom ramene 10. chromozómu v polohe 12.31 (10p12.31) je exprimovaný do proteínu nebulet, ktorý je súčasťou sarkomér myocytov srdcového svalu. *NEBL* sa podieľa na tvorbe proteínov viažucich aktín a tenké vlákna priečne pruhovaných svalov, kde hrá dôležitú úlohu pri zostavovaní Z-disku (Perrot et al. 2016). Gén *MYBPC3* kóduje kardiálnu izoformu myozín viažuceho proteínu C, exprimovaného v myokarde. Gén je lokalizovaný v chromozómovej oblasti 11p11.2. Viac ako 30 % všetkých mutácií

spôsobujúcich familiárnu HKM je potvrdených práve v tomto géne (Liu et al. 2015). Gén *SCN5A* lokalizovaný na krátkom ramene 3. chromozómu (3p22.2) kóduje α -podjednotku srdcového sodíkového kanála. Mutácie génu *SCN5A* spôsobujú exprimáciu abnormálneho proteínu, ktorý je zodpovedný za inaktiváciu sodíkového kanála a môžu byť príčinou vzniku kardiomyopatií (Swan et al. 2014).

Súbor a metódy

Analyzovaný súbor tvorilo 13 pacientov s diagnostikovanou hypertrofickou kardiomyopatiou (priemerný vek $65,77 \pm 10,31$ rokov; šesť žien a sedem mužov), ktorí boli vybraní v spolupráci s odbornými lekármi Kardiocentra v Prešove. Do štúdie boli zaradené tiež dve pokrvne príbuzné probandky (dcéry jednej z pacientiek s diagnostikovanou HKM: vek 34 a 37 rokov), u ktorých echokardiografické vyšetrenie nepotvrdilo hypertrofiu ľavej komory. Všetci účastníci štúdie boli informovaní o jeho charaktere a význame, a pred odberom vzorky podpísali informovaný súhlas. Genómovú DNA sme izolovali z periférnej krvi podľa štandardného protokolu použitého komerčného extrakčného kitu (NucleoSpin Blood, Germany). Koncentráciu vyizolovanej DNA sme zmerali pomocou spektrofotometra NanoDropTM 2000. Analyzované exóny génov boli vybrané na základe predošlých výsledkov Next Generation Sequencing (NGS) analýzy vzoriek zaradených do projektu: APVV-0644-12: Aplikácie „Next generation sequencing“ technológie na molekulárno-genetické analýzy kardiomyopatií v slovenskej populácii so zameraním na rómske etnikum, prebiehajúceho v rokoch 2013 – 2017 na katedre biológie Prešovskej univerzity v Prešove. V rámci projektu boli anotačné informácie variantov získané pomocou softvéru ANNOVAR a dáta všetkých pacientov sa filtrovali na základe predošlých zverejnených výsledkov génov asociovaných s HKM (Harakalova et al. 2015). Patogénnosť identifikovaných „missense“ (so zmenou zmyslu) variantov bola predikovaná pomocou nasledujúcich bioinformatických nástrojov: HumVar-trained PolyPhen-2 model, SIFT a MutationTaster. Varianty boli tiež anotované s frekvenciami, ako sa uvádza vo veľkých sekvenčných štúdiách, vrátane projektu 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org>), NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>), a Exome Aggregation Consortium (ExAC) data (<http://exac.broadinstitute.org/>). Probandi našej súčasnej štúdie sa podrobili Sangerovej sekvenačnej analýze pomocou genetického analyzátoru ABI 3500 (Life Technologies, USA). Na prípravu sekvenačnej reakcie sme používali BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Life Technologies, USA). Primery boli navrhnuté programom Primer 3 (Whitehead Institute, Cambridge, USA; tab. 1). Vyhodnocovanie výsledkov prebiehalo v programe Sequencher 4.7 demo. Naše sekvencie sme porovnávali s referenčnými sekvenciami z databázy Ensemble Genome Browser (2018).

Tab. 1: Prehľad použitých primerov

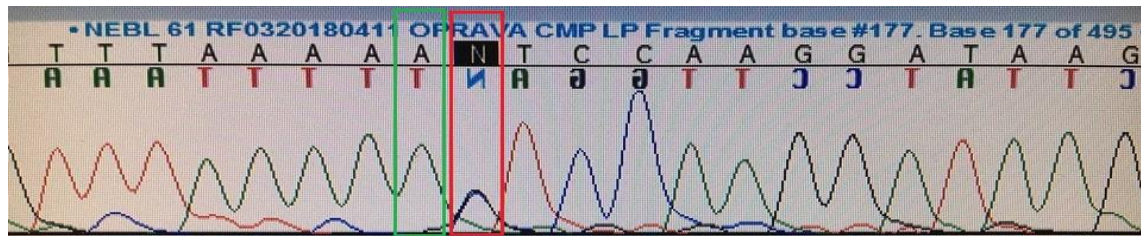
Table 1: Overview of used primers

Gén	Sekvencia primera	Veľkosť produktu
NEBLE3F	aacttgcttgttttgagg	521
NEBLE3R	aagatgcctttcaagaggaa	
MYBPC3e12F	cagaaggggaaggggcaga	520
MYBPC3e12R	gctaacctgggcattcttgg	
SCN5Ae27F	ctagaggtagagtgggagg	531
SCN5Ae27R	tatgtgtgaggggagaaggg	

Výsledky a diskusia

Vyšetrovaný súbor našej štúdie tvorilo 15 probandov z východného Slovenska, z čoho traja probandi boli v pokrvnom príbuzenskom vzťahu (SK1 matka s diagnózou HKM, SK2 zdravá dcéra, SK3 zdravá dcéra). Vzorky DNA všetkých účastníkov výskumu sme analyzovali pomocou Sangerovej sekvenačnej analýzy. Pre sekvenačnú analýzu sa vybrali oblasti troch génov: *NEBL* exón 3, *MYBPC3* exón 12 a *SCN5A* exón 27.

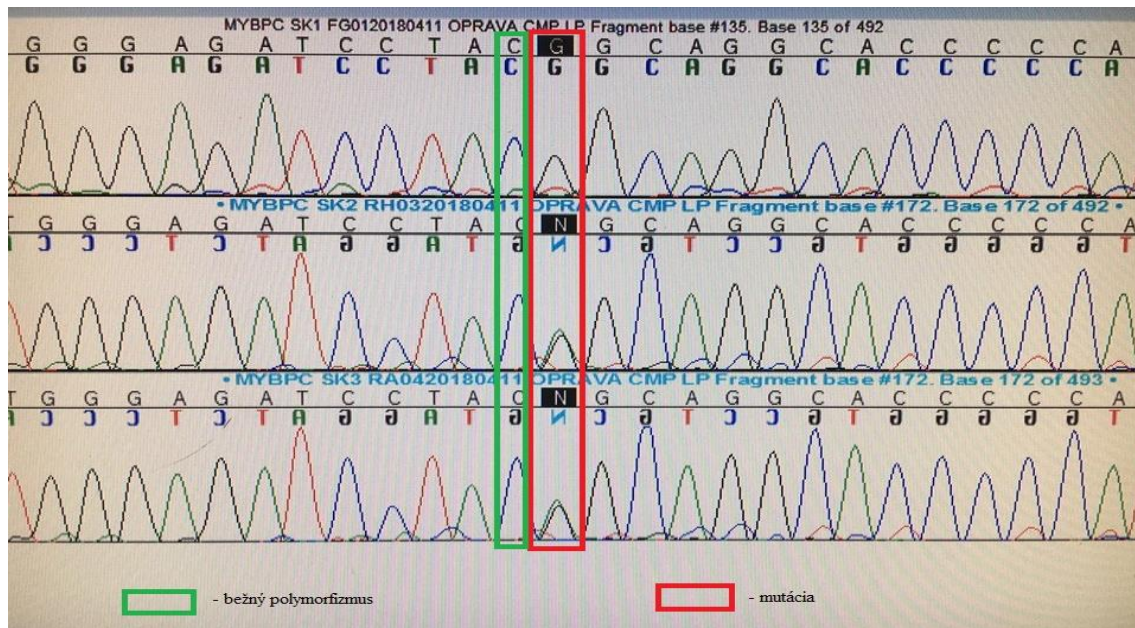
Na základe analýzy výsledkov sekvenovania sme u jedného pacienta s HKM (vzorka č.61) identifikovali heterozygotnú mutáciu c.180G>C, p.K60N v exóne 3 génu *NEBL* (obr. 1). V štúdiu, ktorú publikovali Zigová et al. (2017), sa z 23 vyšetovaných vzoriek nevyskytla táto mutácia ani u jedného probanda. Globálne je výskyt mutácie v tomto géne veľmi málo frekventovaný. Mutácie v géne *NEBL* sa objavujú skôr v asociácii s dilatálnou kardiomyopatiou (DKM) a endokardiálnou fibroelastózou (EFE), ako uvádzajú databázy GeneCard (www.genecard.org/), Ensemble (www.ensembl.org/) a UniProt (www.uniprot.org/). Túto skutočnosť potvrdili vo svojej štúdiu aj Purevjav et al. (2010), kde variant c.180G>C bol jeden zo štyroch najčastejšie sa vyskytujúcich variantov u 260 vyšetovaných pacientov s diagnostikovanou DKM a EFE. Identifikovanú mutáciu c.180G>C v géne *NEBL* v našom vyšetovanom súbore u pacienta s hypertrofickou kardiomyopatiou môžeme pokladať za vzácnu.



Obr. 1: Sekvenčné varianty v exóne 3 v géne *NEBL*

Fig. 1: Sequence variants in exon 3 of the *NEBL* gene

Ďalšou sledovanou oblasťou bol exón 12 génu *MYBPC3*. Sekvenačná analýza v našej štúdiu odhalila u probandiek SK2 a SK3, ktoré sú v pokrvnom príbuzenskom vzťahu (sestry), heterozygotnú zámenu c.977G>A, (p.R326Q). Pri hypertrofických kardiomyopatiách penetrancia stúpa s vekom nositeľov mutácie, zvlášť u žien (Elliot et al. 2008, Gersh et al. 2011). Otec probandiek SK2 a SK3 zomrel pred piatimi rokmi a nemáme informácie o akýchkoľvek jeho srdcových ochoreniach. U probandky SK1, ktorá je ich matkou a má diagnostikovanú HKM, zámena detegovaná nebola (obr. 2). Na základe zisteného môžeme predpokladať, že probandky SK2 a SK3 zdedili mutáciu z otcovej línie, prípadne sú zložením heterozygoti, to znamená, že majú heterozygotnú mutáciu aj na inom géne, rovnakom ako u probandky SK1. Pri genetickom vyšetovaní pacientov s hypertrofickou kardiomyopatiou je do diagnostického panela zaradených deväť sarkomerických génov vrátane exónov génu *MYBPC3* (Richard et al. 2003). Až polovica pacientov z niektorých súborov vyšetrených pre prítomnosť mutácií v sarkomerických génoch má negatívny výsledok genetického vyšetrenia (Mouton et al. 2015). Ak nie je detegovaná mutácia, testovanie by malo pokračovať analýzami ďalších sarkomerických génov. Berúc do úvahy veľkú genetickú variabilitu HKM sa dá predpokladať vplyv ďalších génov. Preto odporúčame u všetkých troch probandiek (SK1, SK2 a SK3) vykonať celoexómovú sekvenačnú analýzu pre presné stanovenie príčinnej mutácie/mutácií.



Obr. 2: Sekvenčné varianty v exóne 12 v géne *MYBPC3*
 Fig. 2: Sequence variants in exon 12 of the *MYBPC3* gene

Posledná analyzovaná záměna c.4557C>G, p.F1519L bola v exóne 27 génu *SCN5A*. V našom vyšetrovanom súbore sme túto záměnu v géne *SCN5A* nepotvrdili ani u jedného z 15 probandov. Ako uvádza vo svojej štúdiu Priganc et al. (2017), prítomnosť mutácie v géne *SCN5A* u pacientov s HKM je vzácna. V štúdiu potvrdili prítomnosť siedmich variácií tohto génu u pacientov z východného Slovenska. Sangerovou sekvenačnou metódou analyzovali 58 nepríbuzných pacientov postihnutých HKM alebo DKM a 26 kontrolných vzoriek. Štyri zo siedmich variácií sa spájali so špecifickými formami kardiomyopatií, ďalšie tri však boli identifikované aj v kontrolných vzorkách, čo vylučuje asociáciu so vznikom HKM. Variant T1247I génu *SCN5A* bol identifikovaný u siedmich probandov postihnutých HKM a v kontrolných vzorkách chýbal. Výsledky štúdií naznačujú, že mutácie v tomto géne by mohli byť príčinnými pre HKM, avšak sú vzácne.

Záver

Hypertrofická kardiomyopatia môže byť spôsobená viac ako 1500 mutáciami v najmenej 20 génoch. Molekulárne mechanizmy, ktoré vedú k progresii tohto ochorenia, nie sú celkom objasnené. Preto cieľom genetického výskumu aj naďalej ostáva mutačný skrining, ktorý by mohol pomôcť pri identifikácii predisponovaných jedincov. Sangerovou sekvenačnou metódou sme v súbore 15 probandov východného Slovenska analyzovali oblasti troch génov – *NEBL* (exón 3), *MYBPC3* (exón 12) a *SCN5A* (exón 27). Výsledkom nášho výskumu bol u jedného pacienta s HKM nález heterozygotnej záměny c.180G>C, p.K60N v exóne 3 génu *NEBL*. Našli sa aj dve heterozygotné mutácie v géne *MYBPC3* u dvoch asymptomatických sestier, ktorých matka trpí HKM. Keďže u matky sa mutácia v tomto géne nezistila, odporučili by sme vykonať v tejto rodine celoexómové sekvenovanie, ktoré by mohlo odhaliť príčinnú mutáciu. Penetrancia ochorenia v rodinách s familiárnym výskytom HKM totiž vykazuje veľkú variabilitu v závislosti od veku, s najčastejším nástupom príznakov ochorenia až v dospelosti.

Podakovanie

Táto štúdia bola podporená z projektu ITMS 26220120041 a APVV-0644-12.

Literatúra

ENSEMBLE GENOME BROWSER, 2018: <http://www.ensembl.org/index.html>. 9.10.2018

ELLIOTT, P., ANDERSSON, B., ARBUSTINI, E., BILINSKA, Z., CECCHI, F., CHARRON, P., DUBOURG, O., KÜHL, U., MAISCH, B., MONSERRAT, L., PANKUWEIT, S., 2008: Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.*, 29:270-276.

GERSH, B. J., MARON, B. J., BONOW, R. O., DEARANI, J. A., FIFER, M. A., LINK, M. S., NAIDU, S. S., NISHIMURA, R. A., UDELSON, J. E., YANCY, C. W., 2011: ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 124(24):783-831.

HERSHBERGER, R. E., COWAN, J., MORALES, A., SIEGFRIED, J. D., 2009: Progress with genetic cardiomyopathies: screening, counseling, and testing in dilated, hypertrophic, and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail.*, 2(3):253-261.

HARAKALOVA, M., KUMMELING, G., SAMMANI, A., LINSCHOTEN, M., BAAS, A. F., VAN DER SMAGT, J., 2015: A systematic analysis of genetic dilated cardiomyopathy reveals numerous ubiquitously expressed and muscle-specific genes. *Eur. J. Heart Fail.*, 17(5): 484-493.

LIU, X., JIANG, T., PIAO, C., LI, X., GUO, J., ZHENG, S., ZHANG, X., CAI, T., DU, J., 2015: Screening Mutations of MYBPC3 in 114 Unrelated Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy by Targeted Capture and Next-generation Sequencing. *Sci Rep.*, 5:11411. Online. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473690/> 9.10.2018

MARON, B. J., MARON, M. S., 2013: Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 381(9862):242-255.

MOUTON, J., LOOS, B., MOOLMAN-SMOOK, J. C., KINNEAR, C. J., 2015: Ascribing novel functions to the sarcomeric protein, myosin binding protein H (MyBPH) in cardiac sarcomere contraction. *Exp. Cell Res.* 331(2):338-351.

PERROT, A., DIETZ, R., OSTERZIEL, K. J., 2007: Is there a common genetic basis for all familial cardiomyopathies? *Eur. J. Heart Fail.* 9(1):4-6.

PERROT, A., TOMASOV, P., VILLARD, E., FALUDI, R., MELACINI, P., LOSSIE, J., RICHARD, P., DE BORTOLI, M., 2016: Mutations in NEBL encoding the cardiac Z-disk protein nebullette are associated with various cardiomyopathies. *Arch. Med. Sci.* 12(2):263-278.

PRIGANC, M., ZIGOVÁ, M., BOROŇOVÁ, I., BERNASOVSKÁ, J., DOJČÁKOVÁ, D., SZABADOSOVÁ, V., TÓTHOVÁ, I., KMEC, J., BERNASOVSKÝ, I., 2017: Analysis of SCN5A Gene Variants in East Slovak Patients with Cardiomyopathy. *J. Clin. Lab. Anal.*, 31(2):22-37.

PUREVJAV, E., VARELA, J., MORGADO, M., KEARNEY, D. L., LI, H., TAYLOR, M. D., ARIMURA, T., MONCMAN, C. L., MCKENNA, W., 2010: Nebulette Mutations are Associated with Dilated Cardiomyopathy and Endocardial Fibroelastosis. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 56(18):1493-1502.

RICHARD, P., CHARRON, P., CARRIER, L., LEDEUIL, C., CHEAV, T., PICHEREAU, C., BENAICHE, A., ISNARD, R., DUBOURG, O., BURBAN, M., 2003: Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*. 107(17):2227-2232.

TEEKAKIRIKUL, P., KELLY, M. A., REHM, H. L., LAKDAWALA, N. K., FUNKE, B. H., 2013: Inherited cardiomyopathies: molecular genetics and clinical genetic testing in the postgenomic era. *J. Mol. Diagn.*, 15(2):158-170.

SWAN, H., AMAROUCHE, M.Y., LEINONEN, J., MARJAMAA, A., KUCERA, J.P., LAITINEN-FORSBLOM, P.J., LAHTINEN, A.M., PALOTIE, A., KONTULA, K., TOIVONEN, L., ABRIEL, H., WIDEN, E., 2014: Gain-of-function mutation of the SCN5A gene causes exercise-induced polymorphic ventricular arrhythmias. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7(6):771-781.

ZIGOVÁ, M., BERNASOVSKA, J., BORONOVA, I., MYDLAROVA BLASCAKOVA, M., KMEC, J., 2017: Finding the candidate sequence variants for diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in East Slovak patients. *J. Clin. Lab. Anal.*, 32(3):1-6.