

Опыт молекулярно-генетической диагностики гипертрофической кардиомиопатии с использованием нанопорового секвенирования ДНК

Салахов Р. Р.¹, Голубенко М. В.¹, Павлюкова Е. Н.², Кучер А. Н.¹, Бабушкина Н. П.¹, Валиахметов Н. Р.¹, Марков А. В.¹, Беляева Е. О.¹, Канев А. Ф.², Назаренко М. С.¹

Цель. Оценить возможность применения технологии секвенирования третьего поколения компании Oxford Nanopore Technologies для диагностики гипертрофической кардиомиопатии.

Материал и методы. Обследованы 12 пациентов с установленным диагнозом "гипертрофическая кардиомиопатия": 9 женщин и 3 мужчин, в возрасте от 18 до 67 лет. ДНК-библиотека для секвенирования была приготовлена на основе продуктов Long-Range ПЦР, охватывающих полную последовательность генов *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* (по протоколу "PCR barcoding amplicons (SQK-LSK109)"). Секвенирование выполнено на платформе MinION компании Oxford Nanopore Technologies (UK). Биоинформатические алгоритмы обработки данных включали "Guppy v.5.0.7", "Nanopolish" и "Clairvoyante". Выявленные генетические варианты были подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. Получены данные о полной последовательности пяти основных генов саркомерных белков гипертрофической кардиомиопатии. Из восьми вариантов в генах *MYH7*, *MYBPC3* и *TNNT2*, выявленных в результате мономолекулярного секвенирования и потенциально являющихся причиной заболевания, были подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру лишь четыре (p.Arg243Cys, p.Tyr609Asn, p.Arg870His в гене *MYH7* и p.Lys985Asn в гене *MYBPC3*). Проведен каскадный скрининг патогенного варианта p.Arg870His в гене *MYH7*. Установлено наличие гетерозиготного носительства у одной из дочерей пробанда.

Заключение. Технология мономолекулярного секвенирования имеет потенциал для диагностики гипертрофической кардиомиопатии при условии повышения точности секвенирования ДНК, а также оптимизации и упрощения биоинформатических алгоритмов идентификации генетических вариантов.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, мономолекулярное секвенирование, Oxford Nanopore Technology, *MYH7*, *MYBPC3*.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1093.2020.7, в рамках научно-го проекта РФФИ № 20-315-90059 и ПНИ № АААА-А20-120041490002-9.

¹НИИ медицинской генетики ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск; ²НИИ кардиоло-

гии ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия.

Салахов Р.Р.* — к.м.н., н.с., лаборатория популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-9789-9555, Голубенко М.В. — к.б.н., с.н.с., лаборатория популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-7692-9954, Павлюкова Е.Н. — д.м.н., профессор, зав. отделением атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, ORCID: 0000-0002-3081-9477, Кучер А.Н. — д.б.н., в.н.с., лаборатория популяционной генетики, ORCID: 0000-0003-3824-3641, Бабушкина Н.П. — к.б.н., н.с., лаборатория популяционной генетики, ORCID: 0000-0001-6133-8986, Валиахметов Н.Р. — аспирант, ORCID: 0000-0001-7969-7020, Марков А.В. — н.с., лаборатория популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-5824-6439, Беляева Е.О. — к.м.н., н.с., лаборатория онтогенетики, ORCID: 0000-0003-4956-5689, Канев А.Ф. — аспирант, ORCID: 0000-0002-7556-9379, Назаренко М.С. — д.м.н., руководитель лаборатории популяционной генетики, ORCID: 0000-0002-0673-4094.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

ramil.salakhov@medgenetics.ru

ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ЛЖ — левый желудочек, *MYH7* — ген тяжелой цепи миозина, *MYBPC3* — ген миозинсвязывающего белка С, *TNNT2* — ген тропонина Т.

Рукопись получена 06.09.2021

Рецензия получена 11.10.2021

Принята к публикации 16.10.2021



Для цитирования: 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;26(10):4673. doi:10.15829/1560-4071-2021-4673

Experience in genetic testing of hypertrophic cardiomyopathy using nanopore DNA sequencing

Salakhov R. R.¹, Golubenko M. V.¹, Pavlyukova E. N.², Kucher A. N.¹, Babushkina N. P.¹, Valiakhmetov N. R.¹, Markov A. V.¹, Belyaeva E. O.¹, Kanev A. F.², Nazarenko M. S.¹

Aim. To investigate the application of the Oxford Nanopore Technologies' third generation sequencing for the genetic testing of hypertrophic cardiomyopathy.

Material and methods. The study involved 12 patients with hypertrophic cardiomyopathy aged 18 to 67 years (women, 9; men, 3). Using the PCR barcoding amplicons (SQK-LSK109) protocol, DNA libraries were created which contained long-range PCR fragments of the *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* and *TPM1* genes. The sequencing was performed using the MinION system by Oxford Nanopore Technologies (UK). Bioinformatic algorithms for data analysis included Guppy v.5.0.7, Nanopolish and Clairvoyante. The identified genetic variants were confirmed by Sanger sequencing.

Results. Data on the complete sequence of the five major sarcomeric genes for hypertrophic cardiomyopathy were obtained. We found eight potentially disease-causing sequence variants in *MYH7*, *MYBPC3* and *TNNT2* genes by monomolecular sequencing. However, only three mutations p.Arg243Cys, p.Tyr609Asn, p.Arg870His in the *MYH7* gene, and one mutation p.Lys985Asn in the *MYBPC3* were confirmed by Sanger sequencing. Cascade screening of pathogenic

variant p.Arg870His in the *MYH7* gene was performed. We found one asymptomatic carrier.

Conclusion. It appears that monomolecular sequencing technology is a feasible approach to identify mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Although improvement in accuracy of DNA sequencing, as well as optimization and simplification of bioinformatic algorithms for identification of the genetic variants are needed.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy, monomolecular sequencing, Oxford Nanopore Technology, *MYH7*, *MYBPC3*.

Relationships and Activities. This work was supported by the grant of the President of the Russian Federation МК-1093.2020.7 within projects № 20-315-90059 and № АААА-А20-120041490002-9.

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk;

²Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia.

Salakhov R. R.* ORCID: 0000-0002-9789-9555, Golubenko M. V. ORCID: 0000-0002-7692-9954, Pavlyukova E. N. ORCID: 0000-0002-3081-9477, Kucher A. N. ORCID: 0000-0003-3824-3641, Babushkina N. P. ORCID: 0000-0001-6133-8986, Valiakhmetov N. R. ORCID: 0000-0001-7969-7020, Markov A. V. ORCID: 0000-0002-5824-6439, Belyaeva E. O. ORCID: 0000-0003-4956-5689, Kanev A. F. ORCID: 0000-0002-7556-9379, Nazarenko M. S. ORCID: 0000-0002-0673-4094.

*Corresponding author: ramil.salakhov@medgenetics.ru

Received: 06.09.2021 Revision Received: 11.10.2021 Accepted: 16.10.2021

For citation: Salakhov R. R., Golubenko M. V., Pavlyukova E. N., Kucher A. N., Babushkina N. P., Valiakhmetov N. R., Markov A. V., Belyaeva E. O., Kanev A. F., Nazarenko M. S. Experience in genetic testing of hypertrophic cardiomyopathy using nanopore DNA sequencing. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(10):4673. doi:10.15829/1560-4071-2021-4673

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — одно из наиболее распространенных наследственных аутосомно-доминантных сердечно-сосудистых заболеваний. ГКМП может протекать как практически бессимптомно, так и с выраженными проявлениями в виде одышки, нарушения ритма сердца, синкопальных проявлений и внезапной сердечной смерти. Оценки распространенности ГКМП в популяции варьируют от 1:500 до 1:200 [1, 2]. Сложность выявления генетической компоненты ГКМП и оценки патогенетической значимости отдельных генетических вариантов обусловлена тем, что для ГКМП характерны неполная возраст-зависимая пенетрантность и вариабельность клинического течения даже у обладателей одного и того же патологического варианта; пенетрантность мутации может различаться в т.ч. и у близнецов [3].

Кроме того, это заболевание характеризуется высокой генетической гетерогенностью: к настоящему времени выявлено уже несколько десятков генов, мутации которых связывают с развитием ГКМП, однако в некоторых из них описаны только единичные мутации. Так, из 33 генов, ассоциированных с ГКМП, только для 8 была подтверждена несомненная связь с заболеванием (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC1*, *MYL2* и *MYL3*), еще для 3 получены “умеренные” доказательства в пользу такой связи (*CSRP3*, *TNNC1* и *JPH2*), а 22 гена могут рассматриваться в качестве причины кардиомиопатии с очень малой вероятностью, в то же время, в базе ClinVar именно около трети всех предположительных мутаций приведены именно для этих генов [4]. При этом наибольший вклад в развитие ГКМП вносят варианты, локализованные в двух генах саркомерных белков — *MYBPC3* и *MYH7* [5].

Развитие современных молекулярно-генетических методов и, в частности, методов секвенирования нового поколения, привело к значительному прогрессу в генодиагностике наследственных заболеваний. Технология массового параллельного секвенирования ДНК (секвенирование второго поколения) обеспечила возможность создания диагностических панелей, включающих десятки генов моногенных заболеваний, в т.ч. и ГКМП. Однако такие панели включают, в основном, только белок-кодирующие регионы генов (экзоны).

Появление технологий секвенирования третьего поколения (мономолекулярное секвенирование)

позволяет оценивать изменчивость протяженных участков генов за счет длинных прочтений. К числу таких технологий относится метод нанопорового секвенирования, который позволяет определять последовательность нуклеотидов по профилю изменения силы электрического тока через нанопору по мере прохождения через нее молекулы ДНК [6]. За счет длинных прочтений появляется возможность изучать варианты в интронах, а также оценивать структуру гаплотипов в изучаемых генах непосредственно, а не с использованием статистических подходов. В настоящее время точность единичных прочтений для этого метода колеблется в пределах 93-98%, что вносит “шум” в получаемые первичные данные, но поскольку ошибки носят случайный характер, большая их часть может быть отсеяна на этапе биоинформатической обработки исходных сигналов. При этом данная технология продолжает развиваться за счет постоянного совершенствования как реагентов, так и алгоритмов обработки данных. Кроме того, преимуществом технологии нанопорового секвенирования является то, что в ходе выполнения секвенирования у исследователя есть возможность остановить эксперимент в любой момент времени, если объем полученных данных достаточен для анализа.

В последнее время технологии мономолекулярного секвенирования находят применение в диагностике наследственных заболеваний: для поиска структурных вариаций, tandemных повторов, анализа эпигенетических вариаций и изоформ РНК [7]. Так, в одной из работ выполнено транскриптомное секвенирование образца миокарда у пациента с ГКМП с вариантом, приводящим к пропуску 20-го экзона в гене *MYBPC3* за счет появления сайта альтернативного сплайсинга, и, как следствие, к появлению укороченной формы белка. Такое состояние приводит к развитию гаплонедостаточности продукта гена, что может способствовать развитию заболевания [8].

В настоящей работе оценена возможность использования технологии секвенирования третьего поколения компании Oxford Nanopore Technologies для диагностики ГКМП.

Материал и методы

В исследование были включены 12 пациентов с диагнозом “гипертрофическая кардиомиопатия” (9 женщин и 3 мужчин, средний возраст пациентов

Таблица 1

Генетические варианты, выявленные с помощью мономолекулярного секвенирования у пациентов с ГКМП

№	Ген	Замена нуклеотида	Замена в белке	Подтверждение варианта			Оценка патогенности
				Алгоритм Nanopolish	Алгоритм Clairvoyante	Секвенирование по Сэнгеру	
1	MYH7	NM_000257.4:c.1623delG	p.Pro541fs	+	-	-	-
2		NM_000257.4:c.3058delG	p.Leu1020X	+	-	-	-
3		NM_000257.4:c.735delC	p.Gly245fs	+	+	-	-
4		NM_000257.4:c.727C>T	p.Arg243Cys	+	+	+	Патогенный
5		NM_000257.4:c.1825T>A	p.Tyr609Asn	+	+	+	Вероятно патогенный
6		NM_000257.4:c.2609G>A	p.Arg870His	+	+	+	Патогенный
7	MYBPC3	NM_000256:c.2955G>T	p.Lys985Asn	+	+	+	Неопределенного значения
8	TNNT2	NM_000364.4:c.97G>A	p.Glu33Lys	+	-	-	-

составил 53 года (18–67 лет)) и пиковым градиентом в выводном отделе левого желудочка (ЛЖ) в покое 50 мм рт.ст. и более. Работа одобрена локальными этическими комитетами. Добровольное информированное согласие получено от всех пациентов.

Для проведения молекулярно-генетического исследования были взяты образцы периферической венозной крови пациентов. Выделение геномной ДНК из лейкоцитов крови выполнено с использованием метода фенол-хлороформной экстракции. Для поиска генетических вариантов, ассоциированных с развитием заболевания, была подобрана панель олигонуклеотидных праймеров для наработки длинных фрагментов ПЦР (Long-Range PCR). Праймеры подобраны таким образом, что они охватывают всю последовательность (включая интроны) генов *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*. Выбор генов обусловлен известными данными о частоте выявленных патогенных/вероятно патогенных вариантов в генах с доказанной связью с заболеванием, ассоциированных с ГКМП: в гене *MYH7* доля таких вариантов составила — 40%, в *MYBPC3* — 29%, в *TPM1* — 8%, в *TNNI3* — 3% и в *TNNT2* — 2% [4, 5, 9]. Варианты в изучаемых генах определяют возникновение заболевания примерно у 50% пациентов [5].

Полученная ДНК-библиотека, содержащая фрагменты ПЦР-продуктов изучаемых генов, была секвенирована на платформе MinION компании Oxford Nanopore Technologies (UK) с помощью протокола “PCR barcoding amplicons (SQK-LSK109)”. Преобразование профиля сигналов тока в нуклеотидную последовательность и демультимплексирование полученных данных проводили с помощью программного обеспечения “Guppy v.5.0.7”. Всего было получено 1143182 прочтения, из которых 994234 (87%) были признаны удовлетворяющими критериям качества. Полученные прочтения содержат в общей сложности 3,54 Gb данных. Средняя длина прочтений составила 3560 оснований.

После выравнивания просеквенированных последовательностей на референсную последовательность

генома сборки GRCh38 поиск генетических вариантов проводили с применением двух различных алгоритмов: “Nanopolish” [10] и “Clairvoyante” [11]. Из выявленных изменений были выбраны варианты, наиболее вероятно связанные с заболеванием (миссенс- и нонсенс-варианты, описанные впервые либо зарегистрированные в популяциях с частотой не >0,01%). Их наличие было проверено секвенированием по Сэнгеру.

Выявленные у индивидов генетические варианты оценены с точки зрения их эффекта на структуру и/или функцию белка, с использованием различных инструментов биоинформатики и баз данных (Annovar, SIFT, Mutation Tester, MutPred; 1000Genomes, Exome Aggregation Consortium, dbSNP, HGMD и др.). Оценку патогенности выявленных вариантов проводили на основании как Российских рекомендаций по интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования [12], так и зарубежных [13], а также рекомендаций, учитывающих интерпретацию данных при кардиомиопатиях [14, 15].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1093.2020.7 (проведение мономолекулярного секвенирования образцов ДНК пациентов с ГКМП, биоинформатическая обработка данных), РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90059 (проведение подтверждающего секвенирования выявленных вариантов у пациентов и членов семьи с помощью секвенирования по Сэнгеру) и ПНИ № АААА-А20-120041490002-9 (медико-генетическое консультирование, подбор праймеров и условий для Long-Range PCR).

Результаты и обсуждение

В результате анализа данных мономолекулярного секвенирования идентифицированы несколько вариантов в генах *MYH7*, *MYBPC3* и *TNNT2*, которые могут иметь отношение к развитию заболевания. Восемь вариантов были выявлены с помощью алгоритма Nanopolish, пять вариантов — с помощью алгоритма Clairvoyante. Секвенирование по Сэнгеру подтвердило наличие у пациентов только четырёх из

пяти вариантов, которые были выявлены обоими алгоритмами (табл. 1). Таким образом, примененные алгоритмы “Nanopolish” и “Clairvoyante” допускают ошибки при выявлении генетических вариантов.

Вариант NM_000257.4:c.727C>T в гене тяжелой цепи бета-миозина (*MYH7*) идентифицирован у пациентки 44 лет с выраженной обструкцией в выходном тракте ЛЖ (градиент давления 122 мм рт.ст.). Данный вариант является патогенным, согласно данным базы ClinVar [16]. Он изменяет консервативную аминокислоту аргинин на цистеин (p.Arg243Cys) в функционально важном домене белка (головка миозина) и является известной мутацией, описанной у значительного количества неродственных пациентов с ГКМП [16].

Вариант NM_000257.4:c.1825T>A (p.Tyr609Asn) в гене тяжелой цепи бета-миозина выявлен у пациентки 42 лет с индексом массы миокарда 104 г/м². Данный вариант не был описан ранее, однако в этой позиции известна клинически значимая мутация NM_000257.4(*MYH7*):c.1826A>G(p.Tyr609Cys) [16]. Кроме того, программы предсказания эффекта (Mutation Tester, MutPred; FATMM и др.) оценивают его как патогенный. С учетом того, что семейный анамнез пациентки неизвестен, этот вариант был охарактеризован как вероятно патогенный.

Вариант NM_000256:c.2955G>T в гене миозинсвязывающего белка С (*MYBPC3*) выявлен у пациентки 46 лет, имевшей асимметричную гипертрофию миокарда (толщина межжелудочковой перегородки 27 мм, толщина задней стенки ЛЖ 17 мм, индекс массы миокарда ЛЖ 268 г/м²). Данный вариант не был описан ранее, оценки его патогенности *in silico* противоречивы. Вариант изменяет положительно заряженную аминокислоту лизин на “нейтральный” аспарагин (p.Lys985Asn). Имеющиеся данные не позволяют однозначно оценить клиническую значимость данного варианта, и, таким образом, он на данный момент обозначен как вариант с неопределенным клиническим значением.

Вариант NM_000257.4:c.2609G>A (p.Arg870His) в тяжелой цепи бета миозина был выявлен у пациентки 58 лет. Обнаруженная мутация расположена в 22-ом экзоне гена, а аминокислота Arg870 входит в домен S2 — так называемую “шейку” молекулы миозина. Несмотря на то, что аминокислоты аргинин и гистидин имеют один и тот же заряд, они отличаются по ряду свойств (гидрофильности, размеру, донорно-акцепторным свойства), которые могут повлиять на структурно-функциональные особенности содержащих их белковых молекул.

Установлено, что замена p.Arg870His приводит к резкому снижению (более чем на порядок) аффинности связывания домена локализации данного варианта с С1-С2 доменами MyBP-C [17], скорости скольжения актиновых и миозиновых филаментов

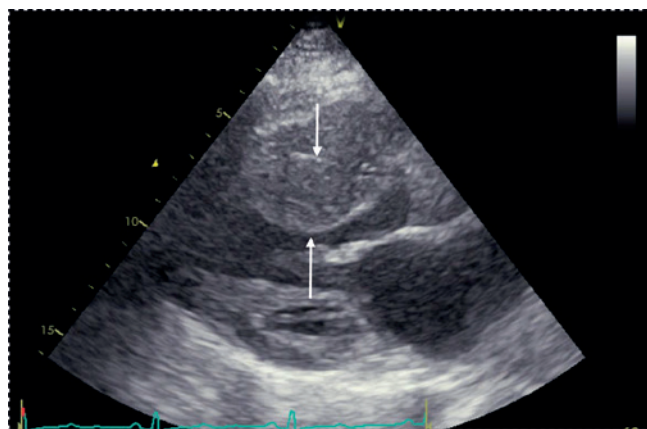


Рис. 1. Эхокардиографическая картина гипертрофии межжелудочковой перегородки миокарда у пробанда (указано белыми стрелками).

относительно друг друга [18]. Исследование трехмерной структуры белка показало, что поскольку “головка” миозина генерирует силу сокращения, то мутации в “шейке” и “хвосте” могут приводить либо к нарушению передачи силы сокращения между структурами толстых филаментов, либо к изменению структуры и стабильности белка [19]. Исследование подвижности молекул миозина, выделенных из скелетных мышц пациентов с семью мутациями *MYH7*, в т.ч. p.Arg870His, показало снижение скорости перемещения миозина относительно актина при наличии мутации, по сравнению с контролем [18].

Замена p.Arg870His крайне редко регистрируется в популяциях (с частотой, соответствующей мутационным событиям — $4 \cdot 10^{-6}$ (согласно базе GnomAD), но выявляется у пациентов с ГКМП из разных этнических групп, как при спорадических, так и при семейных случаях [16]. Таким образом, имеющиеся данные позволяют оценить этот вариант как патогенный.

В случае последнего варианта (p.Arg870His) была возможность молекулярно-генетического обследования родственников пациентки, поэтому нами был проведен более детальный анализ фенотипического проявления данной мутации.

Пациентка Р., 58 лет, с диагнозом ГКМП, обструктивная форма с синкопальными состояниями. В возрасте 45 лет со слов пациентки впервые появились признаки одышки и слабости. Анамнез по ГКМП не отягощен (матери 92 года, отец умер в 62 года от острого нарушения мозгового кровообращения). Ухудшение состояния (усиление одышки, увеличение градиента в выходном тракте ЛЖ) отмечалось в 49 лет, на основании чего была проведена коррекция медикаментозного лечения. Резкое усиление одышки отмечено в возрасте 53 лет.

По данным эхокардиографии была обнаружена картина выраженной асимметричной гипертрофии миокарда: толщина межжелудочковой перегородки 20 мм;

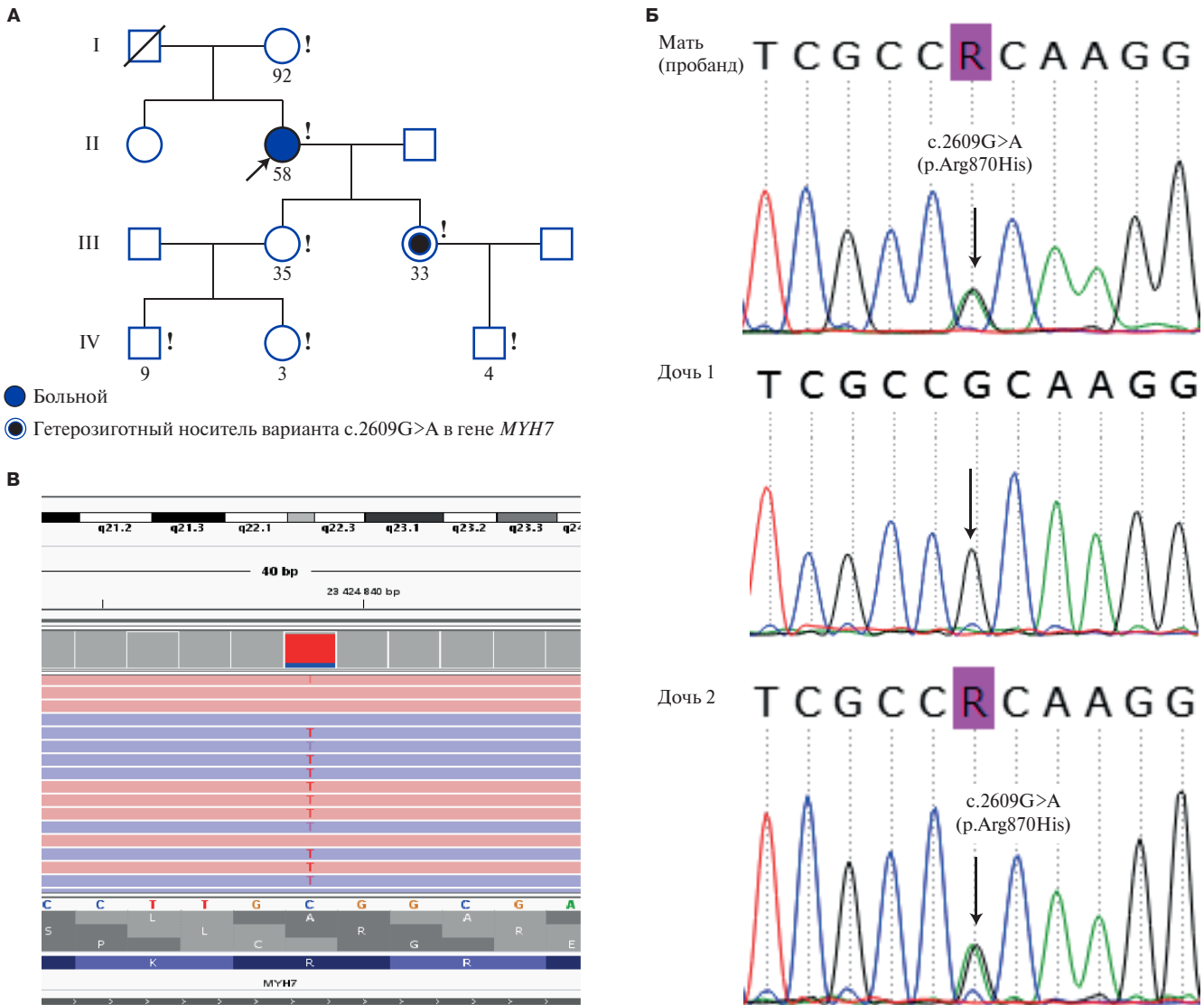


Рис. 2. Диагностика варианта NM_000257.4:c.2609G>A (p.Arg870His) в гене *MYH7* у пациента с ГКМП: **А** — родословная семьи (восклицательным знаком обозначены члены семьи, у которых проведен генетический скрининг, цифрами обозначен возраст обследуемых); **Б** — результат молекулярно-генетического тестирования с помощью нанопорового секвенирования; **В** — подтверждение варианта с помощью секвенирования по Сэнгеру у матери (пробанд) и ее дочери.

толщина задней стенки ЛЖ 9 мм, отношение толщины межжелудочковой перегородки к задней стенке ЛЖ 2,22 (рис. 1). Выявлен пиковый градиент обструкции в выводном отделе ЛЖ 105 мм рт.ст., обуславливающий развитие митральной регургитации 2 степени (с объемом до 25 мл), и аномалия митрального клапана (прикрепление заднемедиальной папиллярной мышцы к передней створке митрального клапана). Фракция выброса ЛЖ составляла 63%. Для коррекции обструкции выводного отдела ЛЖ была проведена расширенная септальная миэктомия с пластикой митрального клапана, резекцией вторичных хорд и аномально прикрепленной папиллярной мышцы к передней створке митрального клапана в условиях искусственного кровообращения. Градиент выводного тракта ЛЖ после оперативного лечения составил 12 мм рт.ст.

После сбора семейного анамнеза (схема родословной приведена на рисунке 2) и проведения каскадного генетического скрининга среди ближайших родственников установлено наличие варианта p.Arg870His у младшей дочери (возраст — 33 года) в гетерозиготном состоянии. При этом жалоб и клинической картины заболевания у дочери на момент молекулярно-генетического обследования не наблюдается. У матери пробанда данный вариант отсутствовал. Отца на момент скрининга уже не было в живых. В результате нам не удалось достоверно установить, унаследован ли данный вариант пробандом, либо возник *de novo*.

В случае носительства мутации p.Arg870His гена *MYH7* описан широкий спектр фенотипических проявлений: от бессимптомного носительства [20,

21] до тяжелой клинической картины ГКМП [22] и случаев внезапной сердечной смерти [23, 24]. В частности, на основании анализа большой родословной [21, 25], отягощенной ГКМП, было установлено, что 75% мужчин и 44% женщин с данным вариантом имели клинические симптомы ГКМП, а пенетрантность варианта в среднем составила 59%. В родословной описано два случая гомозиготности по этой мутации у потомков близкородственных браков: у одного из носителей гомозиготного генотипа по p.Arg870His зарегистрирована внезапная смерть в 36 лет, которая наступила через несколько месяцев после имплантации кардиостимулятора, у другого — уже в 19 лет был поставлен диагноз ГКМП (асимметричная гипертрофия перегородки без обструкции), и на электрокардиограмме регистрировались аномальные зубцы T и Q [21, 25]. Неполная пенетрантность, редкость случаев внезапной смерти и возможность выживания гомозигот до взрослого возраста указывают на преимущественно “незлокачественное” течение заболевания у носителей этой мутации.

Литература/References

- Semsarian C, Ingles J, Maron MS, et al. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(12):1249-54. doi:10.1016/j.jacc.2015.01.019.
- McKenna WJ, Judge DP. Epidemiology of the inherited cardiomyopathies. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(1):22-36. doi:10.1038/s41569-020-0428-2.
- Repetti GG, Kim Y, Pereira AC, et al. Discordant clinical features of identical hypertrophic cardiomyopathy twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(10):e2021717118. doi:10.1073/pnas.2021717118.
- Ingles J, Goldstein J, Thaxton C, et al. Evaluating the Clinical Validity of Hypertrophic Cardiomyopathy Genes. *Circ Genom Precis Med.* 2019;12(2):e002460. doi:10.1161/CIRCGEN.119.002460.
- Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Russian Journal of Cardiology.* 2015;(5):7-57. (In Russ.) Elliott P.M., Anastasakis A.A., Borger M., et al. Рекомендации ESC по диагностике и лечению гипертрофической кардиомиопатии 2014. *Российский кардиологический журнал.* 2015;(5):7-57. doi:10.15829/1560-4071-2015-5-7-57.
- Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 2016;34(5):518-24. doi:10.1038/nbt.3423.
- Ameur A, Kloosterman WP, Hestand MS. Single-Molecule Sequencing: Towards Clinical Applications. *Trends Biotechnol.* 2019;37(1):72-85. doi:10.1016/j.tibtech.2018.07.013.
- Dainis A, Tseng E, Clark TA, et al. Targeted Long-Read RNA Sequencing Demonstrates Transcriptional Diversity Driven by Splice-Site Variation in MYBPC3. *Circ Genom Precis Med.* 2019;12(5):e002464. doi:10.1161/CIRCGEN.119.002464.
- Hathaway J, Heliö K, Saarinen I, et al. Diagnostic yield of genetic testing in a heterogeneous cohort of 1376 HCM patients. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021;21(1):126. doi:10.1186/s12872-021-01927-5.
- Loman NJ, Quick J, Simpson JT. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat Methods.* 2015;12(8):733-5. doi:10.1038/nmeth.3444.
- Luo R, Sedlazeck FJ, Lam TW, Schatz MC. A multi-task convolutional deep neural network for variant calling in single molecule sequencing. *Nat Commun.* 2019;10(1):998. doi:10.1038/s41467-019-09025-z.
- Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Medical genetics* 2019;18(2):3-23. (In Russ.) Рызжова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика.* 2019;18(2):3-23. doi:10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24. doi:10.1038/gim.2015.30.
- Kelly MA, Caleshu C, Morales A, et al. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel. *Genet Med.* 2018;20(3):351-9. doi:10.1038/gim.2017.218.
- Walsh R, Mazarrotto F, Whiffin N, et al. Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases: the case of hypertrophic cardiomyopathy. *Genome Med.* 2019;11(1):5. doi:10.1186/s13073-019-0616-z.
- ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
- Gruen M, Gautel M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C. *J Mol Biol.* 1999;286(3):933-49. doi:10.1006/jmbi.1998.2522.
- Cuda G, Fananapazir L, Epstein ND, et al. The in vitro motility activity of beta-cardiac myosin depends on the nature of the beta-myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997;18(3):275-83. doi:10.1023/a:1018613907574.
- Rayment I, Holden HM, Sellers JR, et al. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(9):3864-8. doi:10.1073/pnas.92.9.3864.
- Nishi H, Kimura A, Harada H, et al. A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 1995;91(12):2911-5. doi:10.1161/01.cir.91.12.2911.
- Tanjore RR, Sikindrapuram AD, Calambur N, et al. Genotype-phenotype correlation of R870H mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet.* 2006;69(5):434-6. doi:10.1111/j.1399-0004.2006.00599.x.
- Capek P, Vondrasek J, Skvor J, et al. Hypertrophic cardiomyopathy: from mutation to functional analysis of defective protein. *Croat Med J.* 2011;52(3):384-91. doi:10.3325/cmj.2011.52.384.
- Laredo R, Monserrat L, Hermida-Prieto M, et al. Beta-myosin heavy-chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol.* 2006;59(10):1008-18. doi:10.1157/13093977.
- Hershkovitz T, Kurolap A, Ruhrman-Shahar N, et al. Clinical diversity of MYH7-related cardiomyopathies: Insights into genotype-phenotype correlations. *Am J Med Genet A.* 2019;179(3):365-72. doi:10.1002/ajmg.a.61017.
- Bashyam MD, Savithri GR, Gopikrishna M, et al. A p.R870H mutation in the beta-cardiac myosin heavy chain 7 gene causes familial hypertrophic cardiomyopathy in several members of an Indian family. *Can J Cardiol.* 2007;23(10):788-90. doi:10.1016/s0828-282x(07)0828-0.

Заключение

Таким образом, наш опыт показывает, что технология мономолекулярного секвенирования может иметь потенциал для диагностики ГКМП, при условии повышения точности секвенирования ДНК, оптимизации и упрощения биоинформатических алгоритмов идентификации генетических вариантов. Проведенный нами анализ доступных данных о фенотипическом проявлении патогенного варианта NM_000257.4:c.2609G>A (p.Arg870His) в гене *MYH7* позволяет сделать вывод о том, что этот вариант в большинстве случаев характеризуется умеренной степенью тяжести течения заболевания и невысоким риском внезапной смерти, что согласуется с клиническими особенностями заболевания в представленном нами случае.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1093.2020.7, в рамках научного проекта РФФИ № 20-315-90059 и ПНИ № АААА-А20-120041490002-9.