


Original Article



# Genetic Study of Hypertrophic Cardiomyopathy in Iranian Patients: Role of A De Novo Variant

Arastoo Kaki<sup>1</sup> , Mohammad Dalili<sup>2</sup> , Nejat Mahdieh<sup>3</sup> , Mehrdad Noruzinia<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## Abstract

### Article History:

**Received:** 03/06/2023

**Revised:** 08/07/2023

**Accepted:** 14/07/2023

**ePublished:** 22/09/2023

**\*Corresponding author:** Mehrdad Noruzinia, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: [noruzinia@modares.ac.ir](mailto:noruzinia@modares.ac.ir)

**Background and Objectives:** Hypertrophic cardiomyopathy is a common cardiac disease diagnosed in young adults and rarely detectable in childhood. Hypertrophic cardiomyopathy exhibits considerable diversity in its clinical and genetic characteristics. To date, mutations in multiple genes associated with HCM have been discovered, with the most common ones being *MYBPC3* and *MYH7* genes. The present study aimed to utilize whole exome sequencing for conducting a genetic analysis of Hypertrophic cardiomyopathy in four children belonging to Iranian families.

**Materials and Methods:** Patients underwent medical evaluation, including clinical assessment, electrocardiography, and echocardiography. Genetic testing was performed after DNA extraction using whole exome sequencing to identify genetic alterations that may be responsible for this disease. In addition, bioinformatic analysis of the genetic changes was carried out using software tools for alignment, variant calling, and interpretation. Finally, the Sanger sequencing method was employed to confirm the genetic variations in the affected individual's family members.

**Results:** The patients were children presenting with initial symptoms, such as syncope and palpitations. They were diagnosed with Hypertrophic cardiomyopathy type 3 and 4 based on the results of electrocardiography and echocardiography. The genetic testing results revealed a pathogenic de novo mutation (c.1208G>A, p.Arg403Gln) in the *MYH7* gene. In addition, another disease-causing homozygous nonsense genetic variation (c.3811C>T, p.Arg1271Ter) was identified in the *MYBPC3* gene, resulting in the production of a premature protein.

**Conclusion:** This study not only expanded the spectrum of genetic variations associated with Hypertrophic cardiomyopathy disease and aided in genetic counseling for families affected by it but also presented the first variations of the sarcomere gene in Iranian children.

**Keywords:** Children; Hypertrophic cardiomyopathy; *MYH7*; *MYBPC3*; Whole exome sequencing

**Please cite this article as follows:** Kaki A, Dalili M, Mahdieh N, Noruzinia M. Genetic Study of Hypertrophic Cardiomyopathy in Iranian Patients: Role of A De Novo Variant. *Pajouhan Scientific Journal*. 2023; 21(3): 204-212. DOI: 10.61186/psj.21.3.204



## Extended Abstract

### Background and Objective

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common inherited human heart disease and heart muscle disease (Myocardia) characterized by left ventricular (LV) hypertrophy. Mutations in genes encoding the sarcomeric proteins are causative factors for HCM, with MYH7 and MYBPC3 gene mutations being the most common genetic causes, accounting for 20% and 25% of cases, respectively. The MYBPC3 gene encodes protein C3, which binds to Myosin. Myosin is connected to the thick and thin filaments of the sarcomere in the heart muscle cells (Myocyte). Mutations in the MYH7 gene, the second most common cause of this disease, are located on human chromosome 14. MYH7 codes for Myosin heavy chains and has 23 kilobases and 41 exons.

In this study, out of 53 patients with hypertrophic cardiomyopathy referred to Shahid Rajaei Heart Hospital, four patients with onset age below 18 years were genetically evaluated. The present study aimed to identify the phenotypic and genotypic characteristics of patients. These findings may be of great importance in determining the molecular pathological features of HCM, leading to better prevention and more accurate treatment of this disease.

### Materials and Methods

In this study, among the 53 HCM patients, only four cases under 18 were evaluated due to low incidence in children. Genomic DNA was extracted from the peripheral blood sample using the salting out method. Whole exome sequencing (WES) was performed with an average coverage depth of 100x on an Illumina Novaseq 6000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Fastqc and Trimmomatic Linux software were used to perform quality control and preprocessing steps on raw reads. Finally, Ensembl's VEP interpreter tool was used to analyze and interpret the final VCF file containing SNVs/INDEL variants. The identified candidate variants were validated and isolated using polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing to evaluate family members (healthy/diseased). After PCR, the obtained results were sequenced using ABI Sequencer 3500XL PE (Applied Biosystems), and the sequences were analyzed using CodonCode aligner software (version 7.1.2) (CodonCode Corp Centerville, MA).

### Results

Through whole-exome sequencing, a homozygous de novo missense mutation was found in the fifth exon of the MYH7 gene in the affected individual of Family 1. This genetic alteration is unique to the individual and is not present in the gnomAD control population or reported in the ExAC or Iranome

databases. Based on the prediction and report of bioinformatics software, this genetic change is probably the cause of the disease in this 14-year-old child. The genetic change found in the affected person of family 2 is the p.Arg homozygous variant of the nonsense type in exon 33 of the MYBPC3 gene. The mentioned genetic change in the homozygous state has not been reported in any of the normal population databases, and the pathogenicity prediction software has identified the genetic change of this variant as the pathogenic factor in this 11-year-old person. In families 3 and 4, a complete exome evaluation found no causative variant.

### Discussion

HCM is a heterogeneous disease with a high locus and allele diversity, of which mutations in the MYH7 and MYBPC3 genes account for about 50% of cases. In terms of inheritance, HCM is primarily inherited in an autosomal dominant manner from parents. The majority of mutations in HCM patients have been reported in sarcomere genes, which lead to changes in the structure and function of related proteins and ultimately the characteristic histological features of HCM. Mutations in the MYH7 gene are relatively uncommon, although MYH7 mutations can be identified as the second most common gene in all cases of hypertrophic cardiomyopathy. So far, four de novo mutations in the MYH7 gene have been reported in cardiomyopathies. However, the present study is the first reported case of a de novo genetic alteration in an Iranian child with HCM; as his parents did not have a similar genetic alteration. MYBPC3 is the most common mutated gene in HCM, with 91% of mutations in MYBPC3 being protein-truncating mutations, leading to a more severe HCM phenotype than missense and frame-shift mutations. Unlike heterozygous disease-causing mutations, homozygous nonsense variants that truncate proteins cause severe neonatal cardiomyopathy; therefore, the identified mutation c.3811C>T, p.Arg1271Ter confirms previous findings that rare homozygous variants may exacerbate clinical severity of HCM. Regarding two exome-negative patients in families 3 and 4 who did not have mutations in genes related to HCM despite clinical diagnosis of the disease, it should be noted that the diagnostic rate for exome sequencing tests is approximately 43%.

### Conclusion

The identification of hypertrophic cardiomyopathy and related mutations in children plays a crucial role in early diagnosis, prevention, and counseling. These mutations expand gene changes related to HCM and aid in counseling and prevention in families with HCM.



## بررسی ژنتیکی کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک در بیماران ایرانی: نقش یک جهش نوپدید

ارسطو کاکای<sup>۱</sup>، محمد دلیلی<sup>۲</sup>، نجات مهدیه<sup>۳</sup>، مهرداد نوروزی نیا<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۲</sup> مرکز آموزشی تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک، مرکز آموزشی تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک قلبی شایعی است. این بیماری در بزرگسالان جوان تشخیص داده می‌شود و به ندرت در دوران کودکی قابل تشخیص است. کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک تنوع درخور توجهی را در ویژگی‌های بالینی و ژنتیکی خود نشان می‌دهد. تاکنون، جهش در ژن‌های متعدد مرتبط با این بیماری کشف شده است که ژن‌های شایع آن *MYH7* و *MYBPC3* هستند. هدف از این مطالعه استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم برای انجام آنالیز ژنتیکی کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک در چهار کودک متعلق به خانواده‌های ایرانی است.

**مواد و روش‌ها:** بیماران ارزیابی پزشکی، از جمله ارزیابی بالینی و اکوکاردیوگرافی شدند و نوار قلب آن‌ها بررسی شد. آزمایش ژنتیکی پس از استخراج DNA با استفاده از توالی‌یابی کل اگزوم برای شناسایی تغییرات ژنتیکی‌ای انجام شد که ممکن است باعث این بیماری شده باشند. علاوه بر این، بررسی بیوانفورماتیکی تغییرات ژنتیکی با نرم‌افزارهای مطابقت‌سازی، فراخوانی‌کننده و تفسیرکننده واریانت صورت پذیرفت و در نهایت، روش توالی‌یابی سنگر برای تأیید تغییر ژنتیکی بر روی افراد خانواده بیمار انجام شد.

**یافته‌ها:** بیماران، کودکانی با علائم اولیه‌ای نظیر سنکوپ و تپش قلب بودند که برای آنها تشخیص کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک نوع ۳ و ۴ براساس نتایج نوار قلب و اکوکاردیوگرافی داده شد. نتایج حاصل از آزمایش ژنتیکی تغییری نوپدید (De novo) و بدمعنی (c.1208G>A, p.Arg403Gln) را در ژن *MYH7* نشان داد. همچنین، تغییر ژنتیکی هموزیگوت بی معنی (c.3811C>T, p.Arg1271Ter) دیگری که ایجادکننده بیماری است، در ژن *MYBPC3* شناسایی شد که باعث تولید یک پروتئین زودرس می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه‌ی حاضر نه تنها طیف تغییرات ژنی مرتبط با بیماری کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک را گسترش می‌دهد و به مشاوره ژنتیکی خانواده‌های مبتلا به این بیماری کمک می‌کند، بلکه اولین گونه‌های ژن سارکومر را در کودکان ایرانی ارائه می‌دهد.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۳/۱۳  
تاریخ داوری مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۱۷  
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۲۳  
تاریخ انتشار مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۳۱

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

\* نویسنده مسئول: مهرداد نوروزی نیا، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ایمیل: noruzinia@modares.ac.ir

**واژگان کلیدی:** هایپر تروفیک کاردیومیوپاتی؛ کودکان؛ توالی‌یابی کل اگزوم؛ *MYH7*؛ *MYBPC3*

**استناد:** کاکای، ارسطو؛ دلیلی، محمد؛ مهدیه، نجات؛ نوروزی نیا، مهرداد. بررسی ژنتیکی کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک در بیماران ایرانی: نقش یک جهش نوپدید. مجله علمی پژوهان، تابستان ۱۴۰۲؛ ۲۱(۳): ۲۱۲-۲۰۴.

### مقدمه

سارکومریک از جمله عوامل مسبب HCM هستند. جهش‌های ژن‌های *MYH7* و *MYBPC3* به ترتیب با احتمال ۲۰ و ۲۵ درصد، علل شایع ژنتیکی HCM هستند [۲]. جهش در این ژن‌ها باعث تولید پروتئین‌های غیرطبیعی می‌شود؛ در نتیجه، دیواره‌های بطن چپ ضخیم‌تر از حد طبیعی می‌شود و ضخیم و سفت شدن دیواره باعث کاهش مقدار خون ورودی و پمپاژ شده به بدن می‌شود. ژن *MYBPC3* پروتئین C3 را که اتصال‌دهنده میوزین (Myosin) است کد می‌کند که با رشته‌های ضخیم و نازک سارکومر

کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک (HCM) شایع‌ترین بیماری ارثی قلب انسان و بیماری عضله‌ی قلب (Myocardia) است که با هایپر تروفی بطن چپ (LV) مشخص می‌شود. شیوع تقریبی این بیماری که اختلال ژنتیکی شایعی در بزرگسالان است، برابر با ۱/۵۰۰ است؛ اما شیوع آن در کودکان نادر است. با وجود این، در کودکان احتمال مرگ ناشی از این بیماری بالا است. در مقایسه با HCM بزرگسالان، HCM کودکان گروه ناهمگن تری از اختلالات است [۱]. جهش‌های ژن‌های مختلف کدکننده پروتئین‌های

خانواده‌ی ۱: پروباند (شکل ۱.۱، II-1)، پسری ۱۴ ساله با علائم تپش قلب و تنگی نفس مبتلا به بیماری HCM بود. اکوکاردیوگرافی پروباند نشان داد که ایشان مبتلا به بیماری HCM نوع سوم (Reverse Curvature type) بود که دارای EF ۵۲ درصد، حجم LA ۵۲٫۶ میلی‌متر مکعب، قطر LA ۴٫۲ میلی‌متر و GLPS منفی ۱۸٫۹ درصد بود. ضخامت میوکاردیال در Lateral، Anteroseptal، Septal و Posterior به ترتیب ۲۱، ۲۲، ۱۵ و ۹ میلی‌متر بود. (شکل ۱.۱)

خانواده‌ی ۲: پروباند (شکل ۲.۱، II-1)، پسری ۱۱ ساله که به دلیل تپش قلب برای اکوکاردیوگرافی ارجاع داده شده بود. یافته‌های اکوکاردیوگرافی نشان داد که ایشان مبتلا به HCM نوع ۴ (Apical) با EF ۶۰ درصد، حجم LA ۴۳٫۵۲ میلی‌متر مکعب، قطر LA ۵٫۳ میلی‌متر و E/e برابر ۱۰ بود. ضخامت میوکاردیال در Lateral و posterior به ترتیب ۲۱ و ۱۳ میلی‌متر بود. (شکل ۲.۱)

خانواده‌ی ۳: پروباند (شکل ۳.۱، II-1)، دختری ۱۳ ساله با شکایت تنگی نفس و تپش قلب برای اکوکاردیوگرافی ارجاع داده شد. اکوکاردیوگرافی ضخامت قابل توجه دیواره، به وسیله‌ی گرادیانت بیش از ۱۰۰ میلی‌متر جیوه را در LVOT در زمان استراحت و ابتلا به HCM نوع سوم (reverse curvature type) را نشان داد. (شکل ۳.۱)

خانواده‌ی ۴: پروباند (شکل ۴.۱، II-1)، پسری ۱۰ ساله مبتلا به HCM با یافته‌های اکوکاردیوگرافی EF ۶۰ درصد، حجم LA ۵۸٫۵ میلی‌متر مکعب و قطر LA ۳٫۸ میلی‌متر بود. گرادیانت LVOT در زمان استراحت ۷۱ میلی‌متر جیوه بود. ضخامت میوکاردیال در بخش Lateral، Anteroseptal، midseptal و posterior به ترتیب ۲۳، ۲۰، ۱۹ و ۹ میلی‌متر بود. (شکل ۴.۱)

### توالی‌یابی کل اگزوم و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

DNA ژنومی از نمونه خون محیطی با استفاده از روش نمک اشباع (Salting out) استخراج شد. به دام‌اندازی اگزوم و غنی‌سازی (Exome Capturing and Enrichment) روی نمونه‌ی پروباند‌ها (شکل ۱.۱) با استفاده از کیت آماده‌سازی کتابخانه Agilent\_V7\_AllExons انجام شد. توالی‌یابی کل اگزوم (WES) با عمق پوشش متوسط ۱۰۰ برابر بر روی دستگاه Illumina Novaseq 6000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) انجام شد.

نرم‌افزارهای لینوکسی Fastqc و Trimmomatic برای انجام مراحل کنترل کیفیت و پیش‌پردازش بر روی خوانش‌های خام (raw reads) استفاده شدند [۹، ۱۰]. خوانش‌های خام فیلتر شده با استفاده از نرم‌افزار BWA برای تولید فایل BAM با مرجع ژنوم انسانی ۳۷ (GRCH37) هم‌تراز (Align) شدند [۱۱]. سپس فایل BAM در طی فرایند فراخوانی با استفاده از ابزار HaplotypeCaller از بسته نرم‌افزار GATK به فایل VCF تبدیل شد [۱۲]. در نهایت، از ابزار تفسیرکننده‌ی VEP Ensembl برای تحلیل و تفسیر فایل VCF نهایی که حاوی واریانت‌های SNVs/INDEL بود، استفاده شد [۱۳].

برای حذف تغییرات چندشکلی (SNPs)، تغییرات با فراوانی آلی

(sarcomere) به سلول‌های عضله‌ی قلبی (Myocyte) مرتبط است. این پروتئین ۱۲۷۴ اسید آمینه و وزن مولکولی ۱۴۰ کیلودالتون دارد. MYBPC3 به MYH7 و اکتین قلبی متصل می‌شود و فعل و انفعالات اکتو میوزین را تنظیم می‌کند [۳]. یکی از ویژگی‌های درخور توجه جهش‌ها در ژن MYBPC3، نمایش بیش‌ازحد جهش‌های کوتاه‌کننده پروتئین، مانند جهش‌های حذف و اضافه‌شدن‌های کوچک، جایگاه پیرایش و بی‌معنی است، به‌گونه‌ای که واریانت‌های کوتاه‌کننده پروتئین حدود ۹۱ درصد از واریانت‌های بیماری‌زای MYBPC3 را تشکیل می‌دهند و بدون توجه به مکان تغییر ژنتیکی در پروتئین، شدت بالینی و نتایج مشابهی را ایجاد می‌کنند که با ازدست‌دادن عملکرد پروتئین، مستقل از مکان جهش، سازگار است [۴]. اکثر جهش‌های MYBPC3 به کدون‌های ختم زودرس (PTCs) منجر می‌شوند که باعث تخریب RNA و کاهش MyBP-C در قلب بیماران HCM می‌شوند [۵].

جهش در ژن سارکومریک MYH7، دومین علت شایعی است که باعث این بیماری می‌شود. این ژن که با طولی معادل ۲۳ کیلوباز و ۴۱ اگزون بر روی کروموزوم ۱۴ انسان قرار گرفته است، زنجیره سنگین میوزین را کد می‌کند [۶]. تا به حال، جهش‌های بیماری‌زا (Pathogenic) و احتمالاً بیماری‌زای (Likely Pathogenic) زیادی در ژن MYH7 گزارش شده است، اکثر آن‌ها جهش‌های بدمعنی (Missense) هستند؛ ولی با این حال، حذف‌ها و کدون‌های خاتمه زودرس (بی‌معنی) نیز شناسایی شده‌اند [۷].

در این مطالعه، از بین ۵۳ بیمار مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک مراجعه‌کننده به بیمارستان قلب شهید رجایی، چهار بیمار با سن بروز زیر ۱۸ سال ارزیابی ژنتیکی شدند. هدف از مطالعه‌ی حاضر شناسایی ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی بیماران است. این یافته‌ها ممکن است در تعیین ویژگی‌های پاتولوژیک مولکولی HCM اهمیت زیادی داشته باشند و می‌توانند به پیشگیری بهتر و درمان دقیق‌تر این بیماری در آینده منجر شوند.

### مواد و روش‌ها

#### سابقه‌ی بیماری و ارزیابی بالینی

بررسی سوابق پزشکی و معاینه‌ی فیزیکی کامل با استفاده از الکتروکاردیوگرام ۱۲ لید (ECG) و اکوکاردیوگرافی ترانس قفسه‌ی سینه (TTE) برای بیماران انجام شد. براساس معیارهای کالج قلب و عروق آمریکا / انجمن قلب آمریکا (AHA/ACC) ۲۰۲۰، تشخیص قطعی HCM داده شد [۸]. علاوه بر این، رضایت آگاهانه از پروباند و بستگان او که در مطالعه شرکت کرده بودند، گرفته شد. خون محیطی از بیمار مبتلا و اعضای خانواده‌ی در دسترس وی جمع‌آوری شد. هیئت بررسی مرکز تحقیقاتی و پزشکی قلب و عروق رجایی این گزارش را تأیید می‌کند.

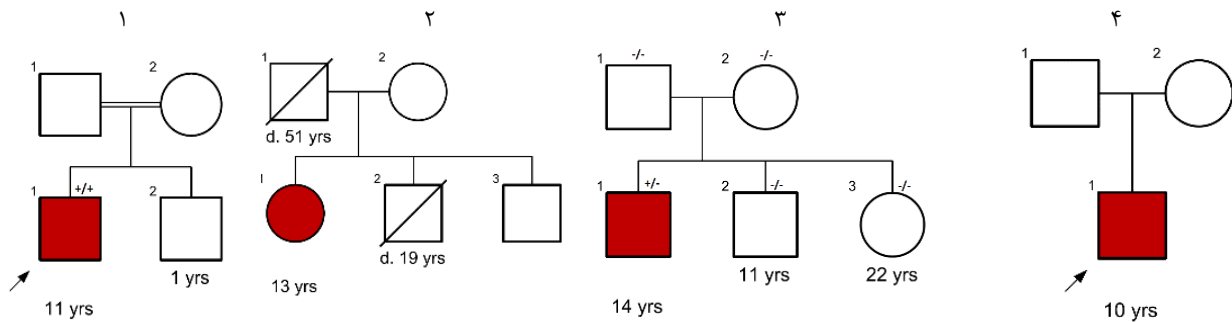
در این مطالعه، از بین ۵۳ بیمار مبتلا به HCM به دلیل فراوانی کم بروز بیماری در کودکان، چهار فرد مبتلا با معیار سنی زیر ۱۸ سال ارزیابی بالینی شدند و رسم شجره‌ی خانوادگی به شرح زیر بود:

تغییرات کمترحفاظت‌شده، مانند انواع مترادف و اینترونیک (synonymous and intronic variants)، با استفاده از نمرات CADD PHRED حذف شدند [۱۴].

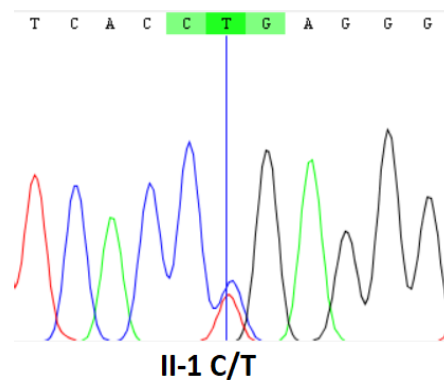
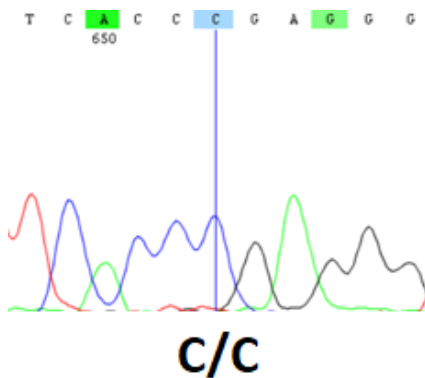
علاوه بر این، تغییرات ژنتیکی که با هر یک از عبارتهای سازمان نگارش توالی (Sequence Ontology) زیر تحلیل و تفسیر شده‌اند، برای بررسی بیشتر انتخاب شدند؛ زیرا به احتمال زیاد دارای تأثیرات عملکردی و ساختاری بیشتری بر روی پروتئین هستند.

(MAF) بیشتر از ۰.۰۱ درصد با استفاده از پایگاه داده‌های کنترل جمعیتی نرمال زیر، حذف و فیلتر شدند.

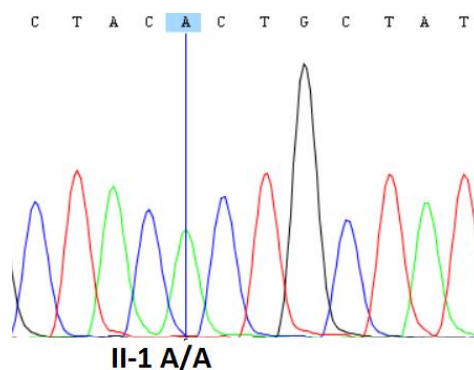
1000 Genomes ([www.internationalgenome.org](http://www.internationalgenome.org)), Exome Variant Server (<http://www.evs.gs.washington.edu/EVS>), dbSNP147 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), Genome Aggregation Database (gnomAD; <https://gnomad.broadinstitute.org/>), Exome Aggregation Consortium version 0.3 database (ExAC; <http://www.exac.broadinstitute.org>), و Iranome (<http://www.iranome.ir/>).



(ب) نتایج توالی‌یابی سنکر ژن *MYH7* در خانواده‌ی ۱



(ج) نتایج توالی‌یابی سنکر ژن *MYBPC3* در خانواده‌ی ۲



(آ) شجره‌نامه‌ی خانواده‌های مبتلا به HCM در اینجا ارائه شده است. دایره‌ها نشان‌دهنده مؤنث بودن و مربع نشانه‌ی مذکر بودن است. نمادهای قرمز پرشده نشان‌دهنده بیماران با تشخیص بالینی HCM و افراد سالم با رنگ سفید نشان داده شده‌اند. +/- نتیجه‌ی آزمایش ژنتیکی مثبت را برای واریانت هتروزیگوت نشان می‌دهد. +/- نشان‌دهنده‌ی مثبت بودن آزمایش ژنتیکی برای گونه‌ی هموزیگوت است و -/- فاقد تغییر ژنتیکی است. بیمار شاخص یا پروباند با یک فلش و موارد فوت‌شده با یک خط مورب مشخص می‌شوند. (ب) نتایج توالی‌یابی Sanger ژن *MYH7* در خانواده‌ی ۱ بیمار و اعضای خانواده‌ی او در اینجا نشان داده شده است. به جز پروباند، باقی اعضای خانواده فاقد تغییر ژنتیکی هستند. (ج) نتایج توالی‌یابی سنکر ژن *MYBPC3* در خانواده‌ی ۲ که پروباند تغییر ژنتیکی را به صورت هموزیگوت نشان می‌دهد.

**شکل ۱:** شجره‌نامه‌ی خانواده‌های مبتلا به HCM. کروماتوگرام‌های توالی نوکلئوتید تغییر یافته در ژن *MYH7* در خانواده‌ی ۱ و *MYBPC3* در خانواده‌ی ۲ (آ) شجره‌نامه‌ی خانواده‌های مبتلا به HCM

PCR با استفاده از SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) با اجزای زیر انجام شد: ۱,۵ mmol/L MgCl<sub>2</sub> و ۱۰ pmol/L پرایمر، ۲۰۰ mmol/L dNTP، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱ میکرولیتر U Taq DNA پلیمراز (Amplicon، UK). واکنش در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تحت انکوباسیون قرار گرفت و سپس سه چرخه تکثیر شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد.

پس از PCR، نتایج به دست آمده با استفاده از ABI Sequencer 3500XL PE (Applied Biosystems) تعیین توالی شدند و توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CodonCode aligner نسخه ۱,۲,۷ (CodonCode Corp Centerville, MA) همان‌طور که در شکل ۱.ب نشان داده شده است، تجزیه و تحلیل شدند.

"transcript\_ablation," "frameshift\_variant," "splice\_acceptor\_variant," "splice\_donor\_variant," "stop\_gained," "stop\_lost," "transcript\_amplification," "initiator\_codon\_variant," "missense\_variant," "inframe\_insertion," and "inframe\_deletion."

هچنین حداقل از سه پایگاه داده آنلاین برای پیش‌بینی اثر تغییرات بر عملکرد پروتئین طبق دستورالعمل‌های سال ۲۰۱۵ کالج آمریکایی ژنتیک پزشکی و ژنومیک (ACMG) استفاده شد [۱۵]. این پایگاه‌های داده عبارتند از: Sift, Polyphen: Mutation Taster [۱۶-۱۸].

### اعتبارسنجی و تجزیه و تحلیل جداسازی تغییرات یافت شده

واریانت‌های کاندید شناسایی شده، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و توالی‌یابی Sanger برای ارزیابی اعضای خانواده (سالم/ بیمار) اعتبارسنجی و جداسازی شدند. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3 plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) طراحی شد. (جدول ۱)

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای دو ژن MYH7 و MYBPC3

ژن	توالی پرایمر	
	رو به جلو (Forward)	رو به عقب (Reverse)
MYH7	GAACCCACAGGGATTAAGGAGA	ACATGTGGTGGTTGAAGAAGCTG
MYBPC3	GCTGATCTGAATCCCTCCATAGTA	CAGGTTATCTTACGAGTGAATGGAG

### یافته‌ها

#### یافته‌های مولکولی

خاتمه‌ی زود هنگام می‌شود. تغییر ژنتیکی مذکور در حالت هموزیگوت در هیچ‌یک از پایگاه‌های نرمال جمعیتی گزارش نشده و براساس دستورالعمل ACMG، با معیارهای PM2، PVS1، و PP5 به‌عنوان یک تغییر ژنتیکی بیماری‌زا و پاتوژن طبقه‌بندی می‌شود. همچنین نرم‌افزارهای پیش‌بینی‌کننده‌ی بیماری‌زایی تغییر ژنتیکی این واریانت را عامل بیماری‌زا در این فرد ۱۱ ساله مشخص کرده‌اند. در پروباند خانواده‌های ۳ و ۴ بعد از ارزیابی کامل آگزم، هیچ واریانت عامل بیماری پیدا نشد و این نمونه‌ها آگزم منفی گزارش شدند.

#### یافته‌های توالی‌یابی سنگر و بررسی بیوانفورماتیکی تغییرات ژنتیکی

تغییر ژنتیکی c.1208G>A در ژن MYH7 دارای امتیاز CADD Phred برابر ۲۶ است. این واریانت در پروباند (شکل ۱.ب، II-1) در حالت هتروزیگوت با PCR و توالی‌یابی Sanger تایید شد؛ اما به‌دلیل نوپدیدبودن (De novo) در خواهر و برادر و والدین فرد مبتلا شناسایی نشد. (شکل ۱.ب)

تغییر ژنتیکی c.3811C>T در ژن MYBPC3 هموزیگوت است که به‌صورت هموزیگوس در پروباند (شکل ۱.ج، II-1) شناسایی شد.

سایر اطلاعات بیوانفورماتیکی، نظیر اطلاعات مربوط به نرم‌افزارهای پیش‌بینی‌کننده‌ی بیماری‌زایی واریانت و فراوانی آللی تغییرات ژنتیکی در جدول ۲ آورده شده‌اند.

در فرد مبتلای خانواده‌ی ۱، نوعی تغییر ژنتیکی هموزیگوت نوپدید (De novo) از نوع بد معنی (chr14-23898487-C-T, p.Arg403Gln) در آگزون پنجم ژن MYH7 از طریق توالی‌یابی کل آگزم شناسایی شد (شکل ۱.آ II-4). این واریانت به جایگزینی آرژنین با کدون اسید آمینه‌ی گلوتامین در جایگاه ۴۰۳ منجر می‌شود. شایان ذکر است که این تغییر ژنتیکی بدون فراوانی آللی در جمعیت کنترل نرمال gnomAD است و در پایگاه داده‌های ExAc یا Iranome گزارش نشده است. طبق دستورالعمل ACMG، تغییر ژنتیکی c.1208G>A واریانتی بیماری‌زا (Pathogenic) براساس معیارهای PP2، PP3، PM1، PM2، PM5، PS4، PS3PP1 و PP5 طبقه‌بندی می‌شود. ابزارهای پیش‌بینی‌کننده‌ی بیماری‌زایی واریانت، مانند SIFT، PolyPhen، و Mutation Taster، واریانت c.1208G>A در ژن MYH7 را به‌ترتیب به‌صورت مخرب (Deleterious) و احتمالاً تخریب‌کننده (Probably damaging) پیش‌بینی کرده‌اند (جدول ۲). براساس پیش‌بینی و گزارش نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، این تغییر ژنتیکی به احتمال بسیار قوی، مسبب بیماری در این کودک ۱۴ ساله است.

تغییر ژنتیکی یافت‌شده در فرد مبتلای خانواده‌ی ۲ واریانت هموزیگوت p.Arg 3811C>T, (chr11-47353626-G-A, 1271Ter) از نوع بی‌معنی (Nonsense) در آگزون ۳۳ ژن MYBPC3 است که باعث جایگزینی آرژنین جایگاه ۱۲۷۱ با یک کدون

جدول ۲: اطلاعات ژنتیکی و بیوانفورماتیکی خانواده‌های ۱ و ۲

خانواده	سن	جنس	ازدواج خودبندواندی	سابقه علامت بالینی	ژنوتیپ	ژن	فراوانی آللی		CADD	بیماری‌زایی			معیار ACMG
							GnomA D	Iranom		Sift	Poly Phen	Mut .Tas	
۱	۱۴	مذکر	خیر	تپش قلب و درد قفسه‌ی سینه	c.1208G>A, p.R403Q	MYH7	گزارش نشده	گزارش نشده	۲۶	D	D	P.D	PS3, PP1, PS4, PM2, PM5, PM1, PP3, PP2, PP5, PVS1, PP5, PM2
۲	۱۱	مذکر	بله	تپش قلب و تنگی نفس	c.3811C>T, p.R1271Ter	MYBPC3	گزارش نشده	گزارش نشده	0.000008	-	-	-	PVS1, PP5, PM2

Abbreviations: D, Deleterious; P.D, probably deleterious; PS3, Pathogenic Strong ; PP, Pathogenic Supporting; PM, Pathogenic Moderate; PVS, Pathogenic Very Strong

با این حال، مطالعه‌ی حاضر، اولین نمونه‌ی گزارش‌شده از یک تغییر ژنتیکی نوپدید در کودک ایرانی مبتلا به HCM است؛ زیرا والدین او تغییر ژنتیکی مشابهی نداشتند. براساس یافته‌های مطالعات قبلی، با جهش نوپدید در ژن *MYH7* و اطلاعات بالینی فرد مبتلای خانواده‌ی ۱ در مطالعه‌ی حاضر، به نظر می‌رسد که بیشتر این جهش‌ها با کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک شدید و خطر بالای مرگ ناگهانی قلبی مرتبط هستند. از طرف دیگر، با توجه به معیارهای ACMG برای طبقه‌بندی بیماری‌زایی جهش‌های ژنتیکی، وقوع جهشی نوپدید با تأیید نبود جهش در پدر و مادر فرد مبتلا (معیار PS2)، دقیقاً به‌اندازه‌ی مطالعات عملکردی *in vitro* یا *in vivo* (معیار PS3) در تأیید بیماری‌زایی جهش باارزش و قوی هستند. از این رو، ارزش مطالعات با جهش نوپدید در تعیین بیماری‌زایی جهش بسیار مهم هستند [۱۵].

*MYBPC3* شایع‌ترین ژن جهش‌یافته در HCM است که به‌همراه ژن *MYH7* حدود ۵۰ درصد از کل جهش‌های HCM را نشان می‌دهد. اکثر جهش‌های HCM مرتبط با *MYBPC3* هتروزیگوت هستند و بیماران اغلب شروع دیررس بیماری را با پیشرفت خوش‌خیم بیماری دارند [۳]. ۹۱ درصد جهش‌ها در *MYBPC3* از انواع جهش‌های کوتاه‌کننده‌ی پروتئین هستند که باعث فنوتیپ HCM شدیدتر از جهش‌های مرتبط با جهش‌های بدمعنی و حذف‌های درون چهارچوب می‌شوند [۱۹]. برخلاف جهش‌های بیماری‌زای هتروزیگوت، واریانتهای *MYBPC3* هموزیگوت بی‌معنی که کوتاه‌کننده‌ی پروتئین هستند باعث کاردیومیوپاتی شدید نوزادی می‌شوند که به نارسایی قلبی و مرگ در سال اول زندگی یا دوران کودکی منجر

## بحث

در مطالعه‌ی حاضر، از بین ۵۳ بیمار مبتلا به کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک مراجعه‌کننده به مرکز قلب شهید رجایی، چهار کودک مبتلا به‌منظور شناسایی عامل ایجادکننده‌ی بیماری، به‌روش توالی‌یابی کل اگزوم ارزیابی ژنتیکی شدند. از این میان، در خانواده‌ی ۱ نوعی تغییر ژنتیکی هموزیگوت نوپدید (*De novo*) از نوع بدمعنی (c.1208G>A, p.Arg403Gln) در اگزوم پنجم ژن *MYH7* و در خانواده‌ی ۲ نیز نوعی واریانت هموزیگوت (c.3811C>T, p.Arg1271Ter) از نوع بی‌معنی (Nonsense) در اگزوم ۳۳ ژن *MYBPC3* شناسایی شد.

HCM یک بیماری هتروژن با تنوع لکوسی و آللی بالاست که از این بین، جهش ژن‌های *MYH7* و *MYBPC3* حدود ۵۰ درصد موارد را به خود اختصاص می‌دهند [۱۹]. از نظر وراثتی، HCM عمدتاً به‌صورت اتوزومال غالب از والدین به ارث می‌رسد و حدود ۶۰ درصد بیماران مبتلا به این بیماری سابقه‌ی خانوادگی ابتلا به بیماری را دارند، در حالی که در ۴۰ درصد موارد، بیماری به‌صورت تک‌گیر ایجاد می‌شود. بیشترین جهش در بیماران HCM عمدتاً در ژن‌های سارکومری گزارش شده است که به تغییر ساختار و عملکرد پروتئین‌های مربوط و نهایتاً ویژگی‌های ریخت‌شناسی معمول در HCM منجر می‌شوند [۲۰].

جهش بدمعنی نوپدید در ژن *MYH7* به‌نسبت غیرمعمول است، اگرچه جهش‌های *MYH7* را می‌توان دومین ژن شایع در تمام موارد کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک تشخیص داد. تا به حال، چهار جهش نوپدید در ژن *MYH7* در کاردیومیوپاتی‌ها گزارش شده است [۲۱].

می‌دهد، بلکه به مشاوره‌ی ژنتیک و پیشگیری بیماری در خانواده‌های مبتلا به HCM کمک می‌کند.

### تشکر و قدردانی

از خانواده‌هایی که در این مطالعه شرکت کردند و همچنین از تمامی کارکنان مرکز تحقیقات کاردیوژنتیک و مرکز آموزشی، درمانی و تحقیقاتی قلب و عروق شهید رجایی تشکر می‌کنیم.

### تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافی بین نویسندگان این مقاله وجود ندارد.

### سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان امور مربوط به مقاله و پیگیری‌های آن را بر عهده داشته‌اند.

### ملاحظات اخلاقی

پروتکل مطالعه به تصویب کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است (شناسه: IR.MODARES.REC.1398.218) و برگه‌های رضایت‌نامه‌ی آگاهانه‌ی مربوط به مصوبات کمیته‌ی اخلاق که مورد تصویب دانشگاه تربیت مدرس است، به رؤیت و امضای اعضای شرکت‌کننده در مطالعه رسید.

### حمایت مالی

حامی مالی این پژوهش گروه ژنتیک پزشکی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است.

می‌شود [۲۲]. بنابراین، جهش یافت‌شده c.3811C>T, (p.Arg1271Ter) در خانواده‌ی ۲ یافته‌های قبلی را تأیید می‌کند مبنی بر اینکه انواع واریانت‌های هموزیگوت نادر ممکن است شدت بالینی HCM را تشدید کنند. بیمار HCM خانواده‌ی ۲ با یک واریانت بد معنی هموزیگوت در MYBPC3 فرم بسیار شدید بیماری را نشان می‌داد که دچار نارسایی قلبی شده بود، این در حالی است که هیچ‌یک از والدین هتروزیگوت فرد مبتلا تاکنون هیچ نشانه‌ای از HCM را نشان نداده‌اند.

درباره‌ی دو بیمار اگزوم منفی در خانواده‌های ۳ و ۴ که با وجود تشخیص بالینی بیماری، جهشی در ژن‌های مربوط به HCM نداشتند، باید اظهار کرد که نرخ تشخیص تست توالی‌یابی اگزوم در حدود ۴۳ درصد است و از آنجایی که این تست قادر به تشخیص تغییرات ژنتیکی در نواحی تنظیمی و اینترونی ژن‌ها نیست، انجام تست توالی‌یابی کل ژنوم (WGS) توصیه می‌شود [۲۳].

### نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع پایین کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک در کودکان، شناسایی این بیماری در کودکان و بررسی ژنتیکی جهش‌های مربوط نقش مهمی در تشخیص، پیشگیری و مشاوره‌ی بیماران در سنین پایین ایفا می‌کند. لذا جهش‌های ژنتیکی یافت‌شده در مطالعه‌ی حاضر، نه تنها طیف تغییرات ژن‌های مرتبط با HCM را گسترش

## REFERENCES

- Maron BJ, Desai MY, Nishimura RA, Spirito P, Rakowski H, Towbin JA, et al. Diagnosis and Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2022;**79**(4):372-89. PMID: 35086660 DOI: 10.1016/j.jacc.2021.12.002
- Melas M, Beltsios ET, Adamou A, Koumarelas K, McBride KL. Molecular diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy (HCM): In the heart of cardiac disease. *J Clin Med*. 2022;**12**(1):225. PMID: 36615026 DOI: 10.3390/cm12010225
- Carrier L, Mearini G, Stathopoulou K, Cuello F. Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene*. PMID: 26358504 DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.008
- Helms AS, Thompson AD, Glazier AA, Hafeez N, Kabani S, Rodriguez J, et al. Spatial and Functional Distribution of MYBPC3 Pathogenic Variants and Clinical Outcomes in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genomic Precis Med*. 2020;**13**(5):396-405. PMID: 32841044 DOI: 10.1161/CIRCGEN.120.002929
- Toepfer CN, Wakimoto H, Garfinkel AC, McDonough B, Liao D, Jiang J, et al. Hypertrophic cardiomyopathy mutations in MYBPC3 dysregulate myosin. *Sci Transl Med*. 2019;**11**(476):eaat1199. PMID: 30674652 DOI: 10.1126/scitranslmed.aat1199
- Qin H, Kemp J, Yip MY, Lam-Po-Tang PRL, Hoh JFY, Morris BJ. Localization of human cardiac  $\beta$ -myosin heavy chain gene (MYH7) to chromosome 14q12 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1990;**54**(1-2):74-6. PMID: 2249479 DOI: 10.1159/000132961
- Liu HT, Ji FF, Wei L, Zuo AJ, Gao YX, Qi L, et al. Screening of MYH7 gene mutation sites in hypertrophic cardiomyopathy and its significance. *Chin Med J (Engl)*. 2019;**132**(23):2835-41. PMID: 31856055 DOI: 10.1097/CM9.0000000000000428
- Ommen SR, Mital S, Burke MA, Day SM, Deswal A, Elliott P, et al. 2020 AHA/ACC guideline for the diagnosis and treatment of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2021;**162**(1).
- Andrews S. Babraham Bioinformatics - FastQC A quality control tool for high throughput sequence data. *Illumina*. 2020;5.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;**30**(15):2114-20. PMID: 24695404 DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;**25**(14):1754-60. PMID: 19451168 DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;**20**(9):1297-303. PMID: 20644199 DOI: 10.1101/gr.107524.110
- McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol*. 2016;**17**(1):122. PMID: 27268795 DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4
- Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;**47**(D1):886-94. PMID: 30371827 DOI: 10.1093/nar/gky1016
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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. PMID: 25741868 DOI: 10.1038/gim.2015.30
- Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012;**40**(W1):452-7. PMID: 22689647 DOI: 10.1093/nar/gks539
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2.

- Curr Protoc Hum Genet.* 2013;**7**. [PMID: 23315928](#) [DOI: 10.1002/0471142905.hg0720s76](#)
18. Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Cooper DN, Schwarz JM, Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;**49**(1):446-51. [PMID: 33893808](#) [DOI: 10.1093/nar/gkab266](#)
  19. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic cardiomyopathy: Genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Circ Res.* 2017;**121**(7):749-70. [PMID: 28912181](#) [DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311059](#)
  20. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: Clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol.* 2012;**60**(8):705-15. [PMID: 22796258](#) [DOI: 10.1016/j.jacc.2012.02.068](#)
  21. Franaszczyk M, Truszkowska G, Chmielewski P, Rydzanicz M, Kosinska J, Rywik T, et al. Analysis of de novo mutations in sporadic cardiomyopathies emphasizes their clinical relevance and points to novel candidate genes. *J Clin Med.* 2020;**9**(2):370. [PMID: 32013205](#) [DOI: 10.3390/jcm9020370](#)
  22. Wessels MW, Herkert JC, Frohn-Mulder IM, Dalinghaus M, Van Den Wijngaard A, De Krijger RR, et al. Compound heterozygous or homozygous truncating MYBPC3 mutations cause lethal cardiomyopathy with features of noncompaction and septal defects. *Eur J Hum Genet.* 2015;**23**(7):922-8. [PMID: 25335496](#) [DOI: 10.1038/ejhg.2014.211](#)
  23. Mak T, Lee YK, Tang CS, Hai J, Ran X, Sham PC, et al. Coverage and diagnostic yield of Whole Exome Sequencing for the Evaluation of Cases with Dilated and Hypertrophic Cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2018;**8**(1). [DOI: 10.1038/s41598-018-29263-3](#)