

PKP2 un DSG2 gēnu ģenētisko variāciju patogenitātes izvērtēšana

Luīze Bidiņa¹, Kaspars Kupics², Emma Sokolova²,
Mihails Pavlovičs³, Zane Dobeļe⁴,
Linda Piekuse⁴, Oskars Kalējs²

luizebidina@gmail.com

¹ Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

² Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

³ Latvijas Universitāte

⁴ Rīgas Stradiņa universitāte, Molekulārās ģenētikas
zinātniskā laboratorija, Latvija

Kopsavilkums

Ievads. Aritmogēna labā kambara displāzija / kardiomiopātija (ALKD/C) ir reta kardiomiopātija, saistīta ar paaugstinātu risku pēkšņai kardiālai nāvei (PKN). Molekulāri ģenētiskie izmeklējumi dod iespēju apstiprināt pacientiem izvirzīto diagnozi. Tiek atklātas aizvien vairāk jaunas ģenētiskās variācijas, kuru iespējamās patogenitātes izvērtēšana ir liels izaicinājums.

Darba mērķis. Veikt PKP2 un DSG2 gēnu ģenētisko variāciju analīzi Latvijas ALKD/C reģistra pacientiem un noskaidrot iepriekš neregistrēto variāciju patogenitāti.

Materiāls un metodes. Reģistrā iekļauti 20 pacienti, kuriem tika veikta elektrokardiogrāfija (EKG), transtorakālā ehokardiogrāfija (TTE), Holtera pieraksts un sirds magnētiskā rezonanse. Pacientiem tika veikta PKP2 un DSG2 gēna analīze ar tiešās sekvencēšanas metodi un analizēta atklāto variāciju patogenitāte ALKD/C un ClinVar datubāzēs un vairākās skaitļošanas programmās, piemēram, SIFT, PolyPhen, PredictSNP, MAPP, PhD-SNP, SNAP. Ģenētisko variāciju biežums reģistra pacientiem tika salīdzināts ar 50 veseliem Latvijas populācijas iedzīvotājiem (PKP2 gēnam) un Eiropas iedzīvotāju populāciju (gan PKP2, gan DSG2 gēnam), izmantojot datus no 1000 genomu projekta pārlūka.

Rezultāti. ALKD/C reģistrā ir 20 pacienti, kuru vidējais vecums ir $43 \pm 14,3$ gadi. Augsts pēkšņas kardiālas nāves risks ir četriem (20 %) pacientiem. ALKD/C raksturīga atrade EKG ir 10 (50 %) pacientiem, 24 stundu Holtera pierakstā – 19 (95 %), sirds magnētiskajā rezonansē – sešiem (30 %), TTE – visiem pacientiem.

Secinājumi. PKP2 un DSG2 gēnos kopā atklātas astoņas jaunas, līdz šim neregistrētas ģenētiskās variācijas – PKP2 gēnā: c.2489+131G>A; c.2489+72insA; c.1035-5T>C un DSG2 gēnā: c.828+13C>A, c.1107G>A, c.1326T>A, c.379-15A>G, c.404G>A – visticamāk, bez patogēnas ietekmes, un divas variācijas DSG2 gēnā ar neskaidru klīnisko nozīmi – c.430G>A, c.1174G>A. Visas variācijas tiks iesniegtas reģistrēšanai ALKD/C datubāzē un ClinVar datubāzē, lai papildinātu ģenētisko variāciju reģistru un vērtētu variāciju patogenitāti.

Atslēgvārdi: aritmogēna labā kambara displāzija, PKP2, DSG2.

levads

Aritmogēna labā kambara displāzija / kardiomiopātija (ALKD/C) ir reta kardiomiopātija (ALKD/C prevalence ir 1 : 1000 - 1 : 5000), saistīta ar ventrikulārām aritmijām, un rada paaugstinātu risku pēkšņai kardiālai nāvei (PKN) (*Corrado et al., 2015*). Ģenētisku mutāciju dēļ miokardā rodas patoloģiskas pārmaiņas desmosomu uzbūvē - normālu miokardu aizstāj fibrotiski taukaudi, rezultātā attīstās aritmijas. Tas ir viens no biežākajiem pēkšņas kardiālas nāves (PKN) cēloņiem sportistiem (*Paul et al., 2012; Corrado et al., 2015*). Agrīna (preklīniska) atlētu, kuriem ir ALKD/C risks (tai skaitā ģenētiski noteikts), identifikācija un izslēgšana no sacensību sporta veidiem var būt dzīvību glābjoša (*Corrado et al., 2011*), jo bieža fiziskā slodze ar laiku palielina slimības klīnisko manifestāciju, paaugstina ventrikulāro tahikardiju, fibrilāciju un sirds mazspējas attīstības risku (*James et al., 2013, Saberniak et al., 2014*).

Ģenētiskās variācijas ALKD/C pacientiem visbiežāk tiek konstatētas *PKP2* gēnā (11-51% gadījumu), kas kodē miokarda desmosomu adhēzijas proteīnu plakofilīnu. Otrs biežāk skartais gēns ir *DSG2* (10-40% gadījumu), kas kodē miokarda desmosomu sastāvā ietilpstošu transmembrānas glikoproteīnu desmogleīnu-2 (*Corrado and Thiene, 2006*). Ir zināmi arī citi gēni, piemēram, *TGFB3, RYR2, TMEM43, DSP, DSC2* un *JUP*, kuru ģenētiskās variācijas tiek saistītas ar ALKD/C fenotipu, tomēr tās tiek konstatētas retāk (mazāk nekā 10% gadījumu) kā *PKP2* un *DSG2* gēnā. ALKD/C galvenokārt tiek pārmantota autosomāli dominantā veidā ar nepilnīgu penetranci un variablu ekspresiju. Retos gadījumos aprakstīts arī autosomāli recesīvs pārmantošanas veids pie atsevišķiem sindromiem, piemēram, Naksas (*Naxos*) slimība (*Corrado and Thiene, 2006*).

Stingru pierādījumu par ALKD/C klīnisko attīstību, fenotipa saistību ar noteiktu genotipu un terapijas izvēli vēl joprojām pietrūkst, jo netiek veikti plaši prospektīvi randomizēti pētījumi. Rekomendācijas ALKD/C pacientu ārstēšanai galvenokārt tiek balstītas uz datiem no slimību reģistriem un ekspertu viedokļiem (*Corrado et al., 2015*). Līdz ar laiku, kad tika atklāts, ka ALKD/C patoģenēzes pamatā ir ģenētiskas mutācijas, molekulārās ģenētiskas diagnostikas iespējas un lietojums strauji auga klīniskajā praksē, tomēr pašas slimības pirmreizēja diagnostika ir sarežģīta tās plašās fenotipiskās manifestācijas un nespecifiskās gaitas dēļ (*Corrado and Thiene, 2006*). Diagnostika tiek balstīta uz pārskatītiem slimības diagnostiskajiem kritērijiem (angļu val. *Revised Task Force Criteria 2010*) (*Marcus et al., 2010*). Molekulāri ģenētiskie izmeklējumi dod iespēju apstiprināt pacientiem izvirzīto diagnozi, ja pēc diagnostiskajiem kritērijiem tā atbilst robeždiagnozei, vai presimptomātiskā periodā, kas ir īpaši būtiski ģimenes locekļu konsultācijās. Tā palīdz novērtēt PKN riska pakāpi, konsultēt pacientus un to ģimenes locekļus par fizisko aktivitāšu ierobežošanu, ģimenes plānošanu un citiem jautājumiem. Ģenētiskā testēšana pirmās pakāpes radniekiem ļautu saprast, kuriem radniekiem ir potenciāls ALKD/C risks. Šiem indivīdiem turpmāk vajadzētu veikt regulārus (reizi divos līdz trijos gados) izmeklējumus (EKG, TTE), lai varētu noteikt preklīnisko diagnozi, PKN risku, atsevišķos gadījumos arī uzsākt terapiju un profilaksi.

Atsevišķos pētījumos mirstības rādītāji šādu pacientu vidū mazinājušies, pateicoties agrīnai diagnostikai (*Nava et al., 2000*). Ja mutācijas tiek atrastas vairākos ar ALKD/C attīstību saistītos gēnos vai vienā gēnā atrastas vairākas mutācijas, tas saistās ar straujāku slimības attīstību, agrāku kreisā kambara iesaisti, augstāku risku ventrikulāru aritmiju epizodēm (*Rigato et al., 2013*). Tiek uzskatīts, ka nākotnē, lai izvērtētu nepieciešamību pēc implantējamā kardiovertera-defibrilatora (IKD) implantēšanas, viens no kritērijiem būs ģenētisko analīžu rezultāts (*Wichter, 2005*). ALKD/C un citu kardiomiopātiju gadījumā ir izstrādātas vadlīnijas arī ģenētiskajiem izmeklējumiem (*Hershberger et al., 2009; Ackerman et al., 2011*). Tomēr laikā, kad ģenētiskās analīzes tiek veiktas arvien biežāk, tiek veikta pilna eksoma vai genoma sekvenčēšana, tiek atklātas aizvien vairāk jaunas, līdz šim neregistrētas ģenētiskās variācijas, kuru iespējamās patoģenēzes izvērtēšana ir liels izaicinājums (*Caleshu and Ashley, 2016*). Tas ir izaicinājums, lai gan aizvien tiek izstrādātas jaunas programmas, kas pēc dažādiem algoritmiem nosaka variāciju patoģenitāti, un slimību specifiskas datubāzes, kas palīdz izvērtēt ģenētisko variāciju iespējamo saistību ar slimības attīstību (ALKD gadījumā: www.arvddatabase.info) (*Van der Zwaag*

et al., 2009; Lazzarini et al., 2015). Liela daļa no šīm jaunatklātajām ģenētiskajām variācijām tā arī netiek klasificētas kā labvēlīgas vai patoloģiskas, bet tiek klasificētas kā variācijas ar neskaidru nozīmi, kas apgrūtina molekulārā rezultāta izskaidrošanu pacientam. Tādēļ ir svarīgi ziņot par šīm jaunatklātajām ģenētiskajām variācijām, lai pilnveidotu zināšanas par iespējamo genotipa un fenotipa korelāciju (Fogel, 2011).

Darba mērķis

Veikt *PKP2* un *DSG2* gēna ģenētisko variāciju analīzi pacientiem, kas iekļauti Latvijas aritmogēna labā kambara displāzijas / kardiomiopātijas reģistrā, un noskaidrot iepriekš neregistrēto variāciju patogenitāti.

Materiāls un metodes

Šis ir prospektīvs, kvalitatīvs pētījums, kas tiek veikts Rīgas Stradiņa universitātes doktorantūras nodaļas programmas "Medicīna" doktorantes Luīzes Bidiņas zinātniskā darba "Latvijas populācijas ALKD/C pacientu genotipisko un fenotipisko pazīmju korelācija un to informatīvā vērtība" ietvaros. No 38 pacientiem, kuriem bijušas aizdomas par ALKD/C tai raksturīgo simptomu dēļ, tika atlasīti 20. Pacientiem tika izvērtēta slimības anamnēze, PKN risks, veikta elektrokardiogrāfija (EKG), TTE, 24 stundu Holtera pie raksts, sirds magnētiskā rezonanse. Diagnoze tika pierādīta, izvērtējot visus izmeklējumu rezultātus, vadoties pēc ALKD/C diagnostikas kritērijiem (angļu val. *Revised Task Force Criteria 2010*) (Marcus et al., 2010), kas arī bija šo 20 iepriekš minēto pacientu atlasē kritēriji.

Lai noteiktu neregistrētu variāciju biežumu vispārējā iedzīvotāju populācijā, tika nejaušināti atlasīti 50 indivīdi no vispārējās Latvijas iedzīvotāju populācijas. Indivīdi netika pielīdzināti pēc vecuma un dzimuma, jo nebija pieejami funkcionālo izmeklējumu dati, kas ļautu izslēgt ALKD/C, tāpēc kontroles iedzīvotāju populācija tika izmantota, lai raksturotu Latvijas iedzīvotāju populācijas ģenētisko struktūru.

Dezoksiribonukleīnskābe (DNS) tika izdalīta no pacientu un kontroles grupas indivīdu venozajām asinīm, kas ievāktas ar *EDTA* (angļu val. *Ethylenediaminetetraacetic acid*) antikoagulantu, izmantojot standarta fenola hloroforma metodi) (Sambrook, 2006).

Visiem pacientiem tika veikta tiešā sekvencēšana *PKP2* gēna (*Gene Bank Accession no*: NC 000012) un *DSG2* gēna (*Gene Bank Accession no*: NC_000018) kodējošai daļai jeb eksoniem. Latvijas kontroles iedzīvotāju populācijai tika veikta tiešā sekvencēšana tiem *PKP2* gēna eksoniem, kuros pacientiem tika atklātas līdz šim neregistrētas ģenētiskās variācijas. Tehnisku ierobežojumu dēļ *DSG2* gēna ģenētisko variāciju pārbaude Latvijas kontroles iedzīvotāju populācijai vēl ir darba procesā. Gēnu sekvencēšana tika veikta atbilstoši ražotāja protokolam, izmantojot praimeru sekvenču (*Gerull et al., 2004*). Visas iegūtās DNS sekvenču tika pārbaudītas, izmantojot *BLAST* datubāzi (angļu val. *Basic Local Alignment Search Tool*) (*Camacho et al., 2009*) un salīdzinot ar references secībām *PKP2* (NM_004572.3 un NG_009000.1) un *DSG2* gēnam (NM_001943 un NG_007072). Tā kā viens no kritērijiem patogenitātes izvērtēšanai neregistrētām variācijām ir to sastopamības biežums pacientu un veselu indivīdu populācijās, izmantojot *Fisher* testu vai hī kvadrāta (χ^2) testu, tika pārbaudīts retākās alēles biežums (*MAF*, angļu val. *minor allele frequency*) pacientu vidū un salīdzināts ar Eiropas iedzīvotāju populāciju, izmantojot datus no 1000 genomu projekta pārlūka (<http://browser.1000genomes.org>) (*Van der Zwaag et al., 2009*). Ģenētisko variāciju patogenitāte tika analizēta, izmantojot vairākas ģenētisko variāciju efekta modelēšanas programmas, piemēram, *SIFT*, *PolyPhen*, *PredictSNP*, *MAPP*, *PhD-SNP*, *SNAP*, kas modelē iespējamo ģenētiskās variācijas patogenitāti. Visas atrastās ģenētiskās variācijas tika pārbaudītas ALKD/C datubāzē (*van der Zwaag et al., 2009*) un *ClinVar* arhīvā (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), lai pārbaudītu to saistību ar ALKD/C un variāciju iespējamo patogenitāti.

Pētījums tika veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un apstiprināts Latvijas Republikas Centrālajā medicīnas ētikas komitejā.

Rezultāti

Šobrīd Latvijas ALKD/C reģistrā ir 20 pacienti – 12 (60 %) sievietes un astoņi (40 %) vīrieši. Vidējais pacientu vecums – $43 \pm 14,3$ gadi. Augsts PKN risks ir četriem (20 %) pacientiem, kuriem bijusi ilgstoša ventrikulāra tahikardija. Vidēji augsts PKN risks ir 12 (65 %), bet zems risks – trīs (15 %) pacientiem. ALKD/C raksturīga atrade EKG ir 10 (50 %) pacientiem, 24 stundu Holtera pierakstā – 19 (95 %), TTE – visiem pacientiem. Strukturālas pārmaiņas sirds magnētiskajā rezonansē konstatētas sešiem (30 %) pacientiem. Ārstēšanā beta blokatori lietoti deviņiem (45 %) pacientiem, radiofrekvences katetrablācija – septiņiem (35 %) un IKD – trīs (15 %) pacientiem.

Veicot ģenētiskās analīzes *PKP2* un *DSG2* gēniem, tika atrastas vairākas iepriekš aprakstītas ģenētiskās variācijas, kuru interpretēšana tika veikta, balstoties uz pieejamo literatūru. Tika atklātas arī vairākas jaunas, līdz šim neregistrētas ģenētiskās variācijas *PKP2* un *DSG2* gēnā (nebija informācijas *NCBI SNP* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) vai *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/>) datubāzē publikācijas sagatavošanas laikā). Daļa no variācijām atrodas gēna nekodējošā daļā un neietekmē gēna splaišingu, tāpēc tika vērtētas kā nepatogēnas (sk. 1. tab.). Papildus *PKP2* gēna variācijas tika pārbaudītas arī kontroles grupai, bet to biežums statistiski ticami neatšķīrās no pacientu grupas, tādā veidā apstiprinot, ka tās visticamāk neizraisa ALKD/C.

Nesinonīmās jeb aminoskābju nomainas variācijas, kas iepriekš nav aprakstītas / reģistrētas, tika analizētas vairākās programmās un pārbaudītas *ClinVar* datubāzē (sk. 2. tab.).

Šo variāciju iespējamā patogenitātes analīzē, izmantojot vairākus patogenitātes modelēšanas rīkus, tika noskaidrots, ka tās ir ar neskaidru klīnisko nozīmi vai to nozīme nav zināma (sk. 3. tab.).

Neviena no šīm variācijām līdz šim nav aprakstīta Eiropas iedzīvotāju populācijā. Divas no variācijām, c.430G>A un c.1174G>A, ir aprakstītas citās pasaules valstīs, piemēram, Nigērijā, Kenijā, Meksikā un Peru (*Ng et al.*, 2013; *Amendola et al.*, 2015).

1. tabula. Neregistrētas ģenētiskās variācijas *PKP2* un *DSG2* gēnā bez aminoskābju maiņas

Unregistered genetic variations in the genes *PKP2* and *DSG2* that is not causing aminoacid change

Gēns	Ģenētiskā variācija	MAF pacientiem (pacientu skaits)	MAF kontroles grupai	p vērtība	Pacienti ar augstu PKN risku, n
<i>PKP2</i> gēns (references secības NM_004572.3, NG_009000.1)	c.2489+131G>A	0,14 (4)	0,19	0,8	4
	c.2489+72delA	0,25 (4)	0,12	0,13	1
	c.1035-5T>C	0,50 (20)	0,5	1	4
<i>DSG2</i> gēns (references secības NM_001943, NG_007072)	c.828+13C>A	0,04 (1)	–	–	0
	c.1326T>A	0,50 (20)	–	–	4
	c.1107G>A	0,04 (1)	–	–	0
	c.379-15A>G	0,04 (1)	–	–	1

MAF – retākās alēles biežums (angļu val. *minor allele frequency*), PKN – pēkšņa kardiāla nāve.

2. tabula. Gēna *DSG2* neregistrētās ģenētiskās variācijas ar aminoskābju maiņu

Unregistered genetic variations in the gene *DSG2* with aminoacid change

Ģenētiskā variācija	Proteīna maiņa	MAF pacientiem (pacientu skaits)	MAF Eiropas populācijā	p vērtība	Klīniskā nozīme pēc <i>ClinVar</i> datiem
c.430G>A	Glu144Lys	0,04 (1)*	0	0,0385	Neskaidra
c.404G>A	Arg135Lys	0,04 (1)	0	0,0385	Nav zināma (neregistrēta)
c.1174G>A	Val392Ile	0,04 (1)*	0	0,0385	Neskaidra / iespējams, nepatogēna

MAF – retākās alēles biežums (angļu val. *minor allele frequency*).

* Pacienti ar augstu pēkšņas kardiālas nāves risku.

3. tabula. *DSG2* gēna iespējami patogēnu variāciju patogenitātes noteikšana, izmantojot dažādus prognostikas rīkus, %

Pathogenicity prediction for possibly pathogenic variations in the gene *DSG2* using several computational tools, %

Variācija	<i>PredictSNP</i>	<i>MAPP</i>	<i>PhD-SNP</i>	<i>PolyPhen-1</i>	<i>PolyPhen-2</i>	<i>SIFT</i>	<i>SNAP</i>
c.430G>A	83	64	66	67	71	66	58
c.404G>A	83	64	51	67	87	82	67
c.1174G>A	74	75	78	67	73	47	67

Diskusija

Latvijas ALKD/C reģistrs ir pirmais šāda veida reģistrs Baltijā, un tas ir nozīmīgs rīks, ar kura palīdzību apzināt ALKD/C pacientus Latvijā, izvērtēt to klīniskos simptomus, terapiju un ilgtermiņa iznākumu, jo pacientu novērošana tiek veikta vienu reizi gadā, nozīmējot tādas izmeklējumus kā EKG, TTE un 24 stundu Holtera monitoringu.

Latvijas ALKD/C reģistrā šobrīd ir 20 pacienti, kas ir 2–5 % no tā, cik vidēji Latvijā būtu jābūt ALKD/C pacientiem, ņemot vērā, ka vidējā šīs saslimšanas prevalence pasaulē ir no 1 : 1000 līdz 1 : 5000 (*Peters, Trümmel, and Meyners, 2004*). Tas liecina par to, ka ievērojami jāuzlabo šīs slimības atpazīstamība un diagnostika, sadarbojoties TTE speciālistiem, kardiologiem, aritmologiem, radiologiem un ģenētiķiem, jo īpaši tādēļ, ka slimības pirmais simptoms var būt pēkšņa kardiāla nāve, ko var veicināt nodarbošanās ar sacensību sporta veidiem (*Paul et al., 2012; James et al., 2013; Saberniak et al., 2014; Corrado et al., 2015*).

Pasaulē šobrīd norit vairāki projekti, kuru mērķis ir veikt pilna genoma vai eksoma sekvenēšanu, nosakot kādu noteiktu slimību iespējamību. Pacientu potenciālais ieguvums no šādu analīžu veikšanas ir tieši atkarīgs no iegūto rezultātu interpretēšanas (*Caleshu and Ashley, 2016*). Jaunas un retas variācijas cilvēka genomā tiek atklātas daudz vairāk, nekā sākotnēji varētu šķist, tādēļ to interpretācija ir liels izaicinājums. Ja variācija tiek interpretēta kā patogēna vai ar lielāko varbūtību patogēna, tas ir papildu diagnostikas kritērijs, un var tikt veikts riska aprēķins pacienta radniekiem saslimt ar šo slimību. Jāatzīmē, ka variāciju interpretācija starp laboratorijām atšķiras. Piemēram, par šajā pētījumā atrasto variāciju c.1174G>A līdz šim bijuši pieci ziņojumi *ClinVar* datubāzē (*Ng et al., 2013; Amendola et al., 2015*). Trijos no tiem variācija tikusi vērtēta kā iespējami labvēlīga, bet divos – ar neskaidru klīnisko nozīmi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/36009/>). Dati starp laboratorijām atšķiras, jo laboratorijas lieto atšķirīgu terminoloģiju, metodiku un atšķirīgu *ACMG-AMP* (angļu val. *American College of Medical Genetics – Association for Molecular Pathology*) izstrādāto kritēriju interpretāciju un to lietojumu (*Caleshu and Ashley, 2016*).

Iespējamu uzlabojumu ģenētisko variāciju interpretācijā var iegūt, veicinot jaunu datu publicēšanu, sadarbojoties starptautiskā līmenī ar šīs jomas speciālistiem un radot specifiskas vadlīnijas konkrētai slimībai un tās ģenētiskajiem faktoriem. ALKD/C ir sava ģenētisko variāciju datubāze, tomēr tajā dati netiek atjaunoti pietiekoši bieži. Pēdējais atjauninājums tajā veikts 2015. gada februārī. Jaunatklātās ģenētiskās variācijas būtu jāiesniedz arī tādos projektos kā, piemēram, *ExAC* (angļu val. *Exome Aggregation Consortium*) un *ClinVar* datubāzē, kurās dati tiek regulāri atjaunoti un interpretēti pēc vienotām vadlīnijām. Nozīmīgi būtu pārskatīt primāros datus no publikācijām, analizēt klīniskos gadījumus un izdarīt personalizētus secinājumus (*Caleshu and Ashley, 2016*).

Pacientiem, kas iekļauti ALKD/C reģistrā, tika atklātas vairākas sinonīmas ģenētiskās variācijas, kuras, neskatoties uz nukleotīdu maiņu, neizraisa aminoskābes maiņu olbaltumvielā. Šīs variācijas gandrīz vienmēr tiek automātiski klasificētas kā nepatogēnas, tomēr tās ne vienmēr ir absolūti “nevainīgas” (*Sauna and Kimchi-Sarfaty, 2011*). Sinonīmās variācijas var ietekmēt tādus procesus kā transkripcija (tai skaitā splaisinga procesu), translācija un olbaltumvielu sekundāro un tālāko struktūru veidošanos (*Supek et al., 2014*).

Pētījums tiks turpināts, un tiks sekvencēti arī citi ar ALKD/C saistīti gēni. ALKD/C fenotipu var izraisīt arī lielas duplikācijas un delēcijas gēnos, kuras nevar noteikt ar tiešās sekvencēšanas metodi. Lai tās pierādītu, jāveic analīze ar *MLPA* (angļu val. *multiplex ligation-dependent probe amplification*), kas ir plānota zinātniskā darba ietvaros (*Li Mura et al.*, 2013). Nosakot ALKD/C izraisošo mutāciju spektru Latvijas iedzīvotāju populācijā, ir plānots izveidot molekulārās diagnostikas algoritmu, kas būtu piemērots Latvijas iedzīvotājiem.

Secinājumi

Šobrīd Latvijas Aritmogēnas labā kambara displāzijas / kardiomiopātijas reģistrā ir 20 pacienti. Klīniskajos izmeklējumos pacientiem dominē pārmaiņas TTE un 24 stundu Holtera pierakstā. Augsts pēkšņas nāves risks konstatēts četriem (20%) pacientiem. *PKP2* un *DSG2* gēnā kopā atklātas astoņas jaunas, līdz šim neregistrētas ģenētiskās variācijas, visticamāk, bez patogēnas ietekmes, un divas variācijas ar neskaidru klīnisko nozīmi. Visas variācijas tiks iesniegtas Aritmogēna labā kambara displāzijas / kardiomiopātijas un *ClinVar* datubāzēs, lai papildinātu Aritmogēna labā kambara displāzijas / kardiomiopātijas ģenētisko variāciju reģistru un vērtētu variāciju patogenitāti.

Pateicība

Pateicamies Rīgas Stradiņa universitātei par pētījuma finansiālo atbalstu, Paula Stradiņa Klīniskajai universitātes slimnīcai par sadarbību un pacientiem par piekrišanu piedalīties pētījumā.



Evaluation of *PKP2* and *DSG2* Genetic Variation Pathogenicity

Abstract

Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy (ARVD/C) is the leading cause of sudden death among young athletes. Genetic testing helps confirm ARVD diagnosis, but in times, when new, unknown genetic variations are found every day, it is challenging to analyse possible pathogenicity of these variations.

The aim of this research was to analyse founded genetic variations of genes *PKP2* and *DSG2* in Latvian ARVD/C registry patients and to predict pathogenicity of unregistered variations.

Registry consisted of 20 ARVD/C patients, in whom electrocardiography (ECG), transthoracic echocardiogram (TTE), cardiac magnetic resonance (CMR), Holter monitoring and sudden cardiac risk stratification (SCD) were done. *PKP2* and *DSG2* gene analysis were done using direct sequencing method. Genetic variations were verified in ARVD/C and *ClinVar* database, and their mean allele frequency (MAF) compared with 50 unaffected Latvian individuals and data about European population (1000 Genome Project Browser). Possible pathogenicity was analysed using multiple computational tools, like PolyPhen, SIFT and others.

Twenty ARVD/C patients were enrolled – 12 females and 8 males, with a mean age of 43 ± 14.3 years. High risk of SCD was identified in four patients. Abnormalities in ECG were found in 10 (50%) patients, Holter monitoring in 19 (95%), CMR in 6 (30%), TTE in all patients. In genes *PKP2* and *DSG2*, eight new, until this moment unregistered variations were found – in gene *PKP2*: c.2489+131G>A; c.2489+72insA; c.1035-5T>C and in *DSG2*: c.828+13C>A; c.1107G>A; c.1326T>A; c.379-15A>G; c.404G>A – more likely benign, and two variations with unknown significance – c.430G>A; c.1174G>A. All variations will be submitted in ARVD and *ClinVar* databases to enrich the registry of genetic variations and to evaluate the pathogenicity of variations.

Keywords: ARVD/C, *PKP2*, *DSG2*.

Literatūra

1. Ackerman, M. J., Priori, S. G., Willems, S., et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies. This document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*. 2011, 8(8), 1308–1339.
2. Amendola, L. M., Dorschner, M. O., Robertson, P. D., et al. Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: challenges of variant classification. *Genome Res*. 2015, 25(3), 305–315.
3. Caleshu, C. and Ashley E. A. Taming the genome: towards better genetic test interpretation. *Genome Med*. 2016, 8(1), 70.
4. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009, 10, 421.
5. Corrado, D. and Thiene, G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. Clinical impact of molecular genetic studies. *American Heart Association*. 2006, 113, 1634–1637.
6. Corrado, D., Schmied, C., Basso, C., et al. Risk of sports: do we need a pre-participation screening for competitive and leisure athletes? *Eur Heart J*. 2011, 32(8), 934–944.
7. Corrado, D., Wichter, T., Link, M. S., et al. Treatment of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: An International Task Force Consensus Statement. *Circulation*. 2015, 132(5), 441–453.
8. Fogel, B. L. Interpretation of genetic testing: variants of unknown significance. *Continuum (Minneapolis)*, 2011; 17 (2 Neurogenetics), 347–352.
9. Gerull, B., Heuser, A., Wichter, T., et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2004, 36(11), 1162–1164.
10. Hershberger, R. E., Lindenfeld, J., Mestroni, L., et al. Genetic evaluation of cardiomyopathy – a Heart Failure Society of America Practice Guideline. *J Card Fail*. 2009, 15 (2), 83–97.
11. James, C. A., Bhonsale, A., Tichnell, C., et al. Exercise increases age-related penetrance and arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 62(14), 1290–1297.
12. Lazzarini, E., Jongbloed, J. D., Pilichou, K., et al. The ARVD/C genetic variants database: 2014 update. *Hum Mutat*. 2015, 36(4), 403–410.
13. Li Mura, I. E., Bauce, B., Nava, A., et al. Identification of a PKP2 gene deletion in a family with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet*. 2013, 21(11), 1226–1231.
14. Marcus, F. I., McKenna, W. J., Sherrill, D., et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J*. 2010, 31(7), 806–814.
15. Nava, A., Bauce, B., Basso, C., et al. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2000, 36(7), 2226–2233.
16. Ng, D., Johnston, J. J., Teer, J. K., et al. Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013, 6(4), 337–346.
17. Ng, D., Johnston, J. J., Teer, J. K., Singh, L. N., Pelle, L. C., Wynter, J. S. Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013, 337–346.
18. Paul, M., Wichter, T., Fabritz, L., et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update on pathophysiology, genetics, diagnosis, and risk stratification. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*. 2012, 23(3), 186–195.
19. Peters, S., Trummel, M., and Meyners, W. Prevalence of right ventricular dysplasia-cardiomyopathy in a non-referral hospital. *Int J Cardiol*. 2004, 97(3), 499–501.
20. Rigato, I., Bauce, B., Rampazzo, A., et al. Compound and digenic heterozygosity predicts lifetime arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013, 6(6), 533–542.
21. Saberniak, J., Hasselberg, N. E., Borgquist, R., et al. Vigorous physical activity impairs myocardial function in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and in mutation positive family members. *Eur J Heart Fail*. 2014, 16(12), 1337–1344.
22. Sambrook, J. and Russell, D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc*. 2006.
23. Sauna, Z. E. and Kimchi-Sarfaty, C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011, 12(10), 683–691.
24. Supek, F., Minana, B., Valcarcel, J., et al. Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human. *Cell*. 2014, 156(6), 1324–1335.
25. Wichter, T., Breithardt, G. Implantable cardioverter-defibrillator therapy in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a role for genotyping in decision-making? *J Am Coll Cardiol*. 2005, 45(3), 409–411.
26. Zwaag, P. A., van der, Jongbloed, J. D., and Berg, M. P., van den, et al. A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Hum Mutat*. 2009, 30(9), 1278–1283.