

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНА ТИТИНА У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ И НЕКОМПАКТНОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

© 2023 г. Н. Н. Чакова¹*, Р. С. Шулинский¹, С. М. Комиссарова², Т. В. Долматович¹,
С. С. Ниязова¹, О. Ч. Мазур¹, А. С. Иванова¹, О. Д. Левданский¹

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр “Кардиология”, Минск, 220036 Республика Беларусь

*e-mail: n.chakova@igc.by

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 09.02.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

С использованием NGS секвенирована кодирующая последовательность гена *TTN* у пациентов с некомпактным миокардом левого желудочка (НКМ, 44 человека) и гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП, 74 человека), а также в контрольной группе (194 человека) и выявлено девять нуклеотидных вариантов, приводящих к укороченному титину (*TTNtv*), и 372 миссенс-варианта. Проведен сравнительный анализ генетической изменчивости титина между группами пациентов с НКМ и ГКМП и контрольной выборкой по типу мутаций и их локализации в экзонах гена, а также в саркомерных и функциональных доменах белка. Подтверждена роль *TTNtv* в развитии НКМ, а также показана значимость дополнительных вариантов в этом же гене или в других генах, ассоциированных с различными кардиомиопатиями, для фенотипической реализации *TTNtv*. У 75% пациентов с *TTNtv* наблюдался дилатационный фенотип НКМ. Миссенс-замены в гене *TTN* обнаружены как среди пациентов с НКМ и ГКМП, так и у людей в контрольной выборке, что косвенно подтверждает доброкачественность большинства миссенс-вариантов в этом гене. В работе определены и перечислены экзоны гена *TTN* с нуклеотидными заменами и без них, а также представлен перечень миссенс-вариантов с возможной клинической значимостью в отношении структурной патологии миокарда, включая новые. Показано, что большинство патогенных и потенциально значимых вариантов находились в А-зоне саркомера. Во всех группах выявлено порядка 30–50% новых, ранее не описанных вариантов. Вероятно, многие из них являются нейтральными и представляют исключительно популяционный интерес.

Ключевые слова: ген *TTN*, укорачивающие титин мутации, миссенс-мутации, патогенная значимость нуклеотидных вариантов, гипертрофическая кардиомиопатия, некомпактная кардиомиопатия левого желудочка.

DOI: 10.31857/S0016675823070032, EDN: QJIMJH

Ген *TTN* кодирует титин — самый большой белок человека, третий по распространенности мышечный протеин после миозина и актина. Титин содержится в сердечной и скелетной мышцах и играет ключевую роль в организации и структурной целостности саркомеров, а также участвует в формировании пассивной жесткости миокарда и в передаче внутриклеточных сигналов, инициируемых стрессом [1].

Ген *TTN* расположен на хромосоме 2q31 и содержит 363 экзона, кодирующих 38 138 аминокислотных остатков. Титин имеет многодоменную структуру и включает протеин-киназный домен, 152 повторяющихся иммуноглобулин-подобных домена (Ig), 132 фибронектин III-подобных домена (FnIII), 31 домен PEVK, 7 Z-повторов и 33 неидентифицированных домена (по базе UniProt).

Одна молекула титина охватывает половину длины саркомера и простирается от Z-диска (N-конец) до M-диска (C-конец). Z1/Z2, самые N-концевые домены области связывания Z-диска титина, действуют как механосенсоры. Растяжимая область I-зоны титина в некоторых участках взаимодействует с актиновыми (тонкими) нитями и имеет функцию молекулярной пружины [2]. Область A-зоны титина связана с миозином (толстые нити) через домены FnIII и функционально нерастяжима. M-диск титина содержит множественные структурные и сигнальные комплексы [1, 3–5].

В области, соответствующей I-зоне белка, происходят дифференциальные события сплайсинга мРНК, что приводит к возникновению шести различных изоформ титина у взрослого чело-

века. Изоформа N2A (3.7 МДа) присутствует в скелетных мышцах, ее I-область различается по размеру в разных типах мышц. Наиболее представленными изоформами кардиального титина у взрослых являются N2BA (3.3 МДа) и N2B (2.97 МДа) [2, 6, 7]. N2B известна как более жесткая изоформа титина, поскольку она короче и для ее растяжения требуется больше силы [8]. У взрослого здорового человека соотношение экспрессии N2BA : N2B составляет примерно 40 : 60 [9]. У пациентов с ишемической и дилатационной кардиомиопатиями соотношение меняется в пользу N2BA. Это, по всей вероятности, приводит к снижению жесткости и пассивного напряжения миокарда и тем самым выступает в качестве механизма, компенсирующего повышение пассивной жесткости вследствие фиброза [9, 10].

Полная (каноническая) последовательность гена *TTN* человека содержит также три изоформ-специфичных взаимоисключающих экзона, называемых новыми экзонами (povex), кодирующих последовательность I-зоны, названную povex-1 (экзон 45), povex-2 (экзон 46) и povex-3 (экзон отсутствует в метатранскрипте [11]). Транскрипты, содержащие эти экзоны, кодируют три минорные изоформы титина povex-1 (Nvx-1), povex-2 (Nvx-2) и povex-3 (Nvx-3). Изоформа Nvx-3 регулирует кальциевые миофибриллярные сигнальные пути и вовлечена в инициированную стрессом реструктуризацию саркомеров.

В гене *TTN* насчитывается несколько десятков тысяч редких миссенс-вариантов и более 1000 мутаций, преимущественно нонсенс, приводящих к укороченной форме титина. На данный момент можно считать доказанным, что укорачивающие титин мутации (*TTNtv*) являются наиболее распространенной генетической причиной как дилатационной (ДКМП), так и некомпактной кардиомиопатий (НКМ), поскольку они встречаются у 15–25% пациентов с данными патологиями. При этом при гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП) или в популяционных выборках этот показатель составляет 1–2% [12]. Что касается миссенс-вариантов гена *TTN*, то их роль в развитии кардиомиопатий трудно выяснить из-за неполной пенетрантности и наличия фоновых вариаций в этом гене в количестве 2–3% практически у каждого индивида [11]. Предполагается, что большинство выявляемых миссенс-вариантов могут быть либо доброкачественными, либо недостаточными, чтобы вызывать заболевание без дополнительных факторов, поскольку их доля в популяционных исследованиях превышает распространенность наследственных типов кардиомиопатий [13]. Дополнительные доказательства модифицирующей роли миссенс-мутаций в гене *TTN* получены R. Roncarati с соавт. [14]: родственники с мутацией в гене *LMNA* и дополнительным вариантом в гене *TTN* демонстрировали

более тяжелый фенотип дилатационной кардиомиопатии с ранней манифестацией заболевания по сравнению с носителями только одного варианта в гене *LMNA*.

В связи с вышесказанным целью исследования было изучение спектра и распространенности нуклеотидных вариантов в гене *TTN* у пациентов с некомпактной и гипертрофической кардиомиопатиями и индивидуумов контрольной выборки, принадлежащих к одной и той же популяции, для выявления потенциально патогенных генетических изменений в отношении структурной патологии миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 118 неродственных пациентов: 44 — с некомпактной кардиомиопатией левого желудочка (54.5% мужчин; средний возраст 43.07 ± 12.52 лет) и 74 — с гипертрофической кардиомиопатией (66.2% мужчин; средний возраст 39.3 ± 12.9 лет), обследованных и наблюдаемых в РНПЦ “Кардиология” в течение длительного времени. Диагноз ГКМП ставился в соответствии с рекомендациями Международного комитета экспертов по ГКМП (ESC 2014). Диагноз НКМ устанавливали на основании: 1) ЭхоКГ-критериев R. Jenni [15]; 2) МРТ-критериев S. Petersen и A. Jacquier [16, 17]. Группу сравнения в виде популяционной выборки составили 194 человека (57.2% мужчин; средний возраст 16.6 ± 15.9 лет) без структурных заболеваний миокарда (далее по тексту обозначена как “контрольная группа”). Все участники подписали информированное согласие на использование соответствующих биоматериалов для научных исследований.

Выделение тотальной ДНК из замороженной цельной крови выполняли фенол-хлороформным методом. Определение однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* проводили методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на генетических анализаторах MiSeq или NextSeq 550 (Illumina). Пробоподготовку образцов в группе пациентов осуществляли с использованием набора TruSight Cardio Sequencing Kit (Illumina), в контрольной выборке — TruSight One Sequencing и TruSight One Expanded Panels (Illumina). Все перечисленные наборы включали панели, содержащие зонды для гибридизации к экзонам, как минимум, 174 генов, ассоциированных с наследственными заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Вывравнивание прочтений проводилось на сборку генома человека GRCh37. Индексация файлов, а также работа с форматами нуклеотидных данных проводились в программе samtools. Определение однонуклеотидных вариантов (SNP-calling) осуществлялось с использованием пакета про-

грамм GATK в режиме GVCF (программы AddOrReplaceReadGroups, HaplotypeCaller, CombineGVCFs, GenotypeGVCFs). Фильтрация SNP в файле gVCF по покрытию ($DP > 10$) и качеству ($QUAL > 20$) выполнялась с использованием VCFtools. Для оценки ассоциаций выявленных вариантов с исследуемыми патологиями использовали программу plink. Полученный vcf файл конвертировали в .bed.bim.fam формат с последующим добавлением информации о фенотипической принадлежности и родственных связях. Далее варианты фильтровали по следующим параметрам: полиморфный сайт генотипирован не менее чем в 98% образцов; соответствие закону равновесия Харди–Вайнберга ($p < 0.0000001$). Также оценивали популяционную стратификацию с использованием данных генотипирования проекта “1000 Genomes” для добавления значений главных компонент в анализ в качестве ковариат и статистической коррекции возможной неоднородности популяционной структуры выборки.

Эффект и классификацию вариантов рассчитывали с использованием программы Variant Effect Predictor, используя транскрипты, которые приведены в https://www.cardiodb.org/titin/titin_transcripts.php [11]. С этого же ресурса использовалась информация о локализации функциональных доменов (FnIII, Ig и др.) и бэндов саркомера (A-, I-, Z-, M- и др.). Варианты последовательности в *TTN* описаны в соответствии с эталонной последовательностью, кодирующей ДНК (метатранскрипт). Визуализацию полученных результатов, а также работу с матрицами данных проводили с использованием интерпретируемых языков программирования Python (библиотеки pandas, numpy, seaborn, matplotlib, itertools, venn) и bash. Разработанные скрипты находятся в репозитории github по ссылке: https://github.com/IGC-bioinf/TTN_scripts.

Аннотирование нуклеотидных вариантов проводили с помощью специального программного обеспечения ANNOVAR rev. 527 [18]. Для определения диагностической значимости выявленных генетических вариантов проводилось сравнение их частоты встречаемости между группами пациентов (НКМ и ГКМП) и контрольной выборкой. Оценку патогенности нуклеотидных вариантов проводили в соответствии с критериями Американского колледжа медицинской генетики (ACMG, 2015) [19]. К потенциально патогенным относили нуклеотидные варианты, которые не встречались в контрольной группе или статистически значительно чаще обнаруживались в группах пациентов, чем в контроле, а значение MAF (minor allele frequency) для них не превышало 0.00001. Рассчитанные значения p -уровня значимости при сравнении с контрольной группой были скорректированы с помощью поправки Бонферрони для множественного тестирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У 118 неродственных пациентов с кардиомиопатиями (44 пробандам с НКМ, 74 – с ГКМП) и у 194 человек из контрольной группы с помощью NGS проводили секвенирование 364 экзонов гена *TTN*, кодирующего сердечные изоформы титина (N2B, N2BA, Nvx-1, -2, -3) и мышечную изоформу N2A. Всего в трех группах выявлено 372 миссенс-варианта и девять укорачивающих титин вариантов (*TTNtv*).

Спектр и распространенность TTNtv у пациентов с кардиомиопатиями (НКМ и ГКМП)

В результате генотипирования 44 пациентов с НКМ у восьми (18.2%: 6 мужчин/2 женщины) выявлены нуклеотидные варианты в гене *TTN*, приводящие к возникновению преждевременного стоп-кодона: семь нонсенс-мутаций (p.Glu4095*, p.Gln4566*, p.Gly15531*, p.Arg16766*, p.Gly17830*, p.Trp24578*, p.Tyr25971*) и одна делеция, вызывающая сдвиг рамки считывания p.Arg19172fs (табл. 1). Три нонсенс-мутации p.Gln4566* (rs775072385), p.Arg16766* (rs754866489), p.Gly17830* (rs759231562) описаны ранее у пациентов с ГКМП [11, 12, 20], остальные варианты обнаружены впервые. *TTNtv* находились в 48-м (два пациента), 250-, 267-, 278-, 294-, 326-м (два пациента) экзонах метатранскрипта и присутствовали во всех изоформах сердечного титина, кроме Nvx-3.

Пять (62.5%) из восьми вариантов приводили к преждевременной остановке синтеза титина в области А-зоны саркомера, остальные затрагивали I-зону.

У шести (№ 548, 557, 570, 579, 583 и 690) из восьми пациентов нонсенс-мутация в гене *TTN* сочеталась с одним или несколькими дополнительными вариантами неопределенного значения (VUS) в этом же гене или других генах, ассоциированных с различными кардиомиопатиями: *MYBPC3*, *TMPO*, *DSP*, *LDB3*, *RBM20*, *JPH2* и *RYR2*.

У шести (75.0%) из восьми пациентов с *TTNtv* диагностирован дилатационный фенотип НКМ, у остальных (№ 557 и 593) наблюдалась изолированная форма НКМ с признаками дилатации ЛЖ.

В контрольной группе у двух (1.0%) из 194 человек выявлен новый вариант c.10927C>A (p.Glu3643*) в 46-м экзоне метатранскрипта, который приводит к преждевременному стоп-кодону только в 44-м экзоне Nvx-2 (табл. 2). Все остальные изоформы титина (N2BA, N2B, Nvx-1, -3) не включают данную замену и, следовательно, полностью сохраняют свои функции.

Ни один из 74 пробандов с ГКМП не имел укорачивающих титин вариантов.

Таблица 1. Характеристика *TTN* в группе пациентов с НКМ и контрольной выборке

Код	Пол, возраст ^a	Замена в ДНК (экзон в метатранскрипте)	Замена в белке, гс	Область/домен	MAF (gnomAD)	Варианты в других генах (класс ACMG)	Фенотип
Пациенты с НКМ							
548	м, 62	c.12283G>T (48)	p.Glu4095*	I-band/Ig-like 21	0	TMPO (III), DSP (III), RYR2 (III)	Дилатационный
570	ж, 45	c.13696C>T (48)	p.Gln4566*, rs775072385	I-band/Ig-like 23	0.000036	RBM20 (III), RYR2 (III)	»
583	ж, 52	c.46591G>T (250)	p.Gly15531*	I-band /—	0	MYBPC3 (IV)	»
557	м, 40	c.50296C>T (267)	p.Arg16766*, rs754866489	A-band/Fn type-III 10	0.000004	MYBPC3 (IV)	Изолированный
593	м, 51	c.53488G>T (278)	p.Gly17830*, rs759231562	A-band/Fn type-III 17	0.000004	—	»
560	м, 29	c.57514delA (294)	p.Arg19172fs	A-band/Ig-like 103	0	—	Дилатационный
579	м, 22	c.73734G>A (326)	p.Trp24578*	A-band/Fn type-III 66	0	LDB3 (III)	»
690	м, 40	c.77913T>G (326)	p.Tyr25971*, rs72648203	A-band/Fn type-III 76	0	JPH2 (III)	»
Контрольная группа							
111, 112	ж, 47 м, 27	c.10927G>T (46)	p.Glu3643*	Nvx-2 (экзон 44)	0	—	—

Примечание. м — мужской пол, ж — женский пол; ^a — возраст манифестации; жирный шрифт — новая, ранее неописанная мутация.

Таблица 2. Локализация миссенс-вариантов в экзонах гена *TTN* в группах пациентов и в контроле

Группа	Номер экзона в канонической форме гена <i>TTN</i> (метатранскрипт)		
	с несколькими уникальными вариантами	с общими вариантами	без нуклеотидных вариантов
НКМ	I (2 экзона): 61, 127 A (2 экзона): 326 , 339 M (1 экзон): 358	Z (8 экзонов): 7, 9, 15, 21, 22, 24, 27, 28 I (40 экзонов): 31, 33, 36, 40, 42–44, 48, 50, 51, 55, 58, 61, 66, 72–74, 77, 78, 80, 84, 87, 88, 90–92, 98, 105, 107, 119, 123, 130, 132, 138, 173, 209, 229, 233, 245, 248 A (25 экзонов): 260, 266, 272, 277, 286, 289, 294, 298, 301, 304, 308, 311, 316, 326 , 330, 331, 337, 338, 342, 346, 350, 352, 353, 356, 357 M (4 экзона): 358 –361	Z (13 экзонов): 1, 4–6, 8, 10–13, 17, 19, 20, 23 I (153 экзона): 30, 32, 34, 35, 37–39, 41, 47, 53, 54, 57, 59, 62, 65, 75, 79, 82, 83, 85, 89, 93–96, 101–104, 106, 108–112, 114–118, 120–122, 124–126, 129, 131, 133–137, 139–172, 174–201, 203–208, 210–224, 226–228, 231, 232, 234–236, 240–244, 247, 249–251 A (46 экзонов): 255, 258, 259, 261, 262, 267, 268, 270, 271, 276, 280–285, 288, 290, 292, 296, 297, 299, 302, 303, 307, 309, 312–315, 317–319, 321, 323, 324, 329, 332, 336, 341, 343, 345, 347, 348, 351, 354 M (1 экзон): 363
ГКМП	A (2 экзона): 310, 326 M (1 экзон): 358		
Контроль	Z (2 экзона): 3, 28 I (10 экзонов): 29, 46, 48, 70, 74, 76, 86, 88, 229, 245 A (13 экзонов): 256, 277, 293, 304, 310, 326 , 327, 334, 335, 337, 343, 344, 350 M (2 экзона): 358 , 360		
Всего	30 экзонов	77 экзонов	213 экзонов

Примечание. Жирным шрифтом выделены наиболее вариабельные экзоны.

Оценка разнообразия и патогенной значимости миссенс-вариантов у пациентов с кардиомиопатиями (НКМ и ГКМП)

В группах пациентов с НКМ и ГКМП и в контрольной выборке всего выявлено 372 отличающихся от референсных нуклеотидных варианта, из которых 249 (66.9%) были уникальными и встречались только в одной из трех анализируемых групп, 75 (20.2%) встречались во всех трех группах, 48 (12.9%) были общими только для каких-либо двух групп (рис. 1).

Сравнительный анализ распространенности уникальных миссенс-вариантов в группах пациентов показал, что их доли составили 30.0% (42 из 140 мутаций, выявленных в этой группе) и 20.7% (28 из 135) в группах с НКМ и ГКМП соответственно и статистически значимо не различались ($\chi^2 = 2.64$; $p = 0.104$). Частота встречаемости уникальных замен в контрольной выборке равнялась 60.7% (179 из 295) и существенно превышала этот показатель в обеих группах пациентов ($p < 0.00001$).

Из табл. 2 следует, что распределение миссенс-вариантов в гене *TTN* по экзонам было неравномерным. В 213 (58.5%) из 364 экзонов вообще не обнаружено каких-либо нуклеотидных замен, а в 30 (8.2%) экзонах наблюдалось по несколько уникальных вариантов. Общие во всех группах нуклеотидные замены локализовались в 77 (21.2%) экзонах, при этом в 13 из них (28, 48, 61, 74, 229, 245, 277, 304, 326, 337, 350, 358, 360) встречались также и уникальные нуклеотидные замены. Самыми “нагруженными” по наличию уникальных

и общих вариантов во всех группах были 326-й (54 варианта) и 358-й (26 вариантов) экзоны. Они же были и самыми большими: 17 106 и 5609 пн соответственно. Однако прямой зависимости частоты замен от протяженности экзонов не наблюдалось, что, вероятно, связано с функциональной значимостью кодируемых ими областей белка и требует дополнительного изучения.

При анализе распределения общих и уникальных миссенс-вариантов в зонах саркомера (A-, I-зоны), представленного в табл. 3 и на рис. 2, выявлены следующие различия: половина уникальных замен во всех рассматриваемых группах, включая контрольную, сосредоточена в A-области, что в среднем в 1.5 раза выше по сравнению с I-зоной. При этом общие варианты, наоборот, статистически значимо чаще регистрировались в I-полосе, чем в A-области ($p = 0.0005$) (табл. 3).

Распределение уникальных и общих миссенс-вариантов в функциональных доменах белка (FnIII, Ig и др.) также имело свои особенности (табл. 4, рис. 3). 70–80% уникальных замен в каждой из рассматриваемых групп были практически поровну распределены между FnIII и Ig доменами. Общие варианты находились в FnIII и Ig доменах в 67% случаев, а их присутствие в Ig было в 2 раза выше, чем в FnIII, что статистически значимо отличалось от распределения уникальных миссенс-вариантов ($p = 0.01$).

В табл. 5 и 6 представлено распределение уникальных миссенс-вариантов в сердечных изоформах титина (N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2 и Nvx-3) в

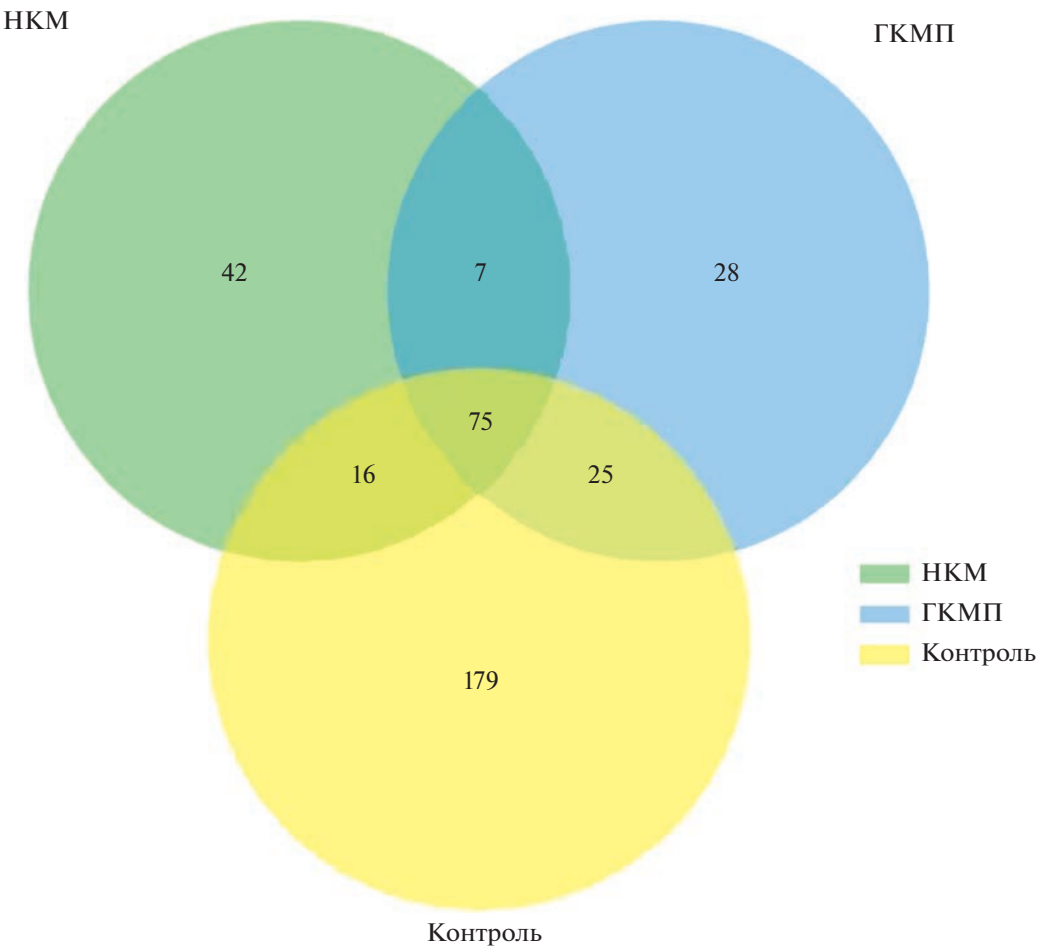


Рис. 1. Соотношение общих и уникальных миссенс-вариантов в гене *TTN* в группах пациентов с ГКМП и НКМ и в контрольной выборке (диаграмма Венна).

трех анализируемых группах для оценки представленности выявленных нуклеотидных замен в различных изоформах белка у пациентов с кардиомиопатиями в сравнении с контрольной выборкой.

В группе из 44 пациентов с НКМ обнаружено 42 уникальных миссенс-варианта (табл. 5, 6):

39 замен – в метатранскрипте и 3 (7.1%) – в 46-м экзоне *Nvх-3*, отсутствующего в метатранскрипте. Только одна замена (2.4%) в 28-м экзоне присутствовала во всех изоформах; еще 25 (59.5%) вариантов в 14 экзонах метатранскрипта присутствовали во всех изоформах, кроме *Nvх-3* (табл. 6). Тринадцать (31.0%) миссенс-вариантов в 11 экзонах ме-

Таблица 3. Распределение уникальных и общих миссенс-вариантов метатранскрипта гена *TTN* относительно А-, I-, М-областей саркомера у пациентов и в контроле

Область	Уникальные замены, <i>n</i> (%)			Общие замены, <i>n</i> (%)
	НКМ	ГКМП	контроль	
М-полоса	1 (2.6)	2 (7.1)	20 (11.9)	8 (11.0)
А-зона	22 (57.9)	14 (50.0)	90 (53.6)	24 (32.9)
I-зона	13 (34.2)	11 (39.3)	45 (26.8)	34 (46.6)
Z-диск	—	1 (3.6)	13 (7.7)	6 (8.2)
Другая	2 (5.3)	—	—	1 (1.4)
Всего	38	28	168	73

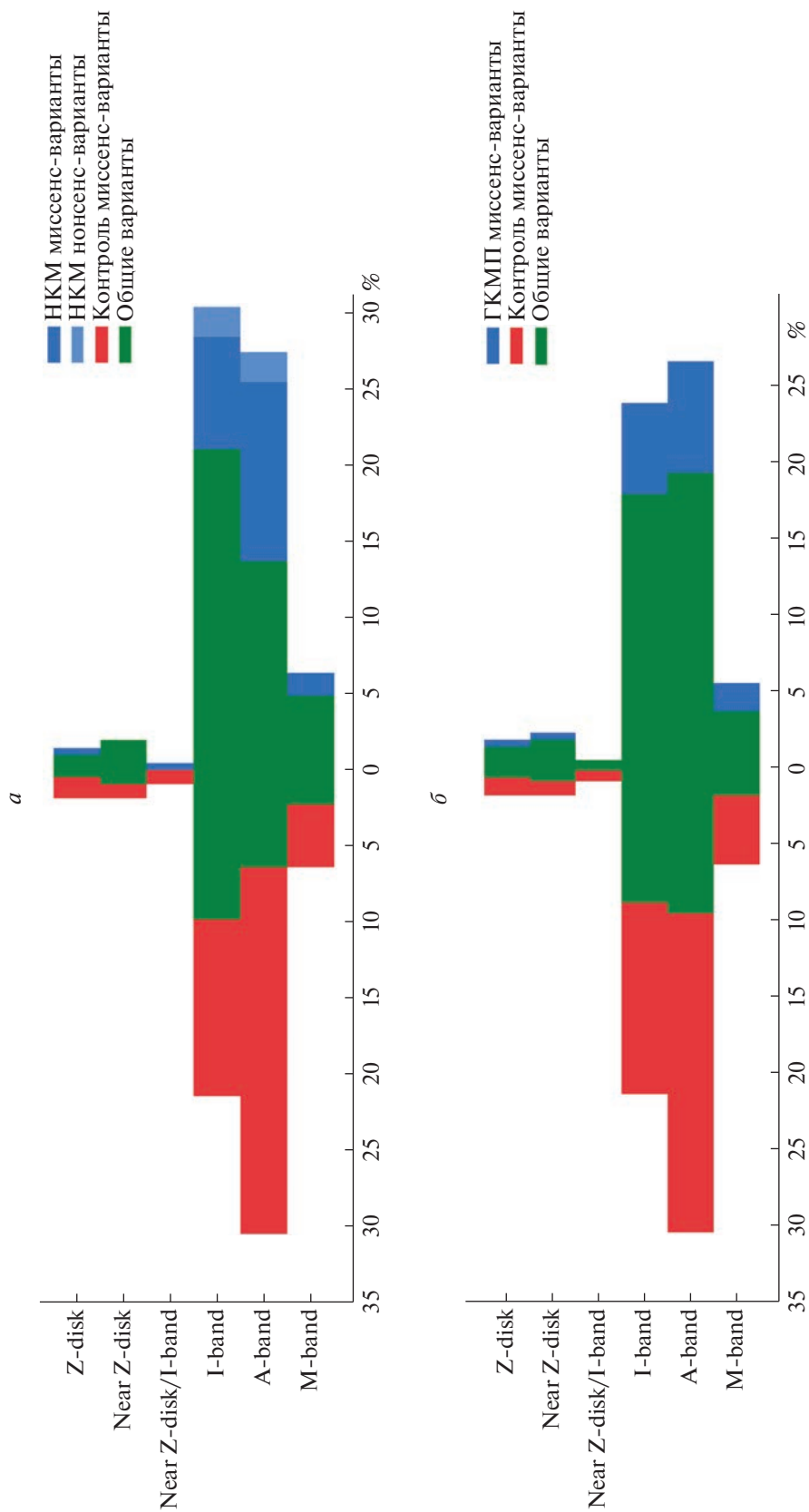


Рис. 2. Схематичное изображение распределения уникальных и общих миссенс-вариантов в зонах саркомера между анализируемыми группами: *a* – НКМ и контроль; *б* – ГКМП и контроль. Вправо отложена доля вариантов в группе пациентов, влево – в контрольной выборке.

Таблица 4. Распределение уникальных и общих миссенс-вариантов метатранскрипта гена *TTN* в функциональных доменах титина у пациентов и в контроле

Домен	Уникальные замены, <i>n</i> (%)			Общие замены, <i>n</i> (%)
	НКМ	ГКМП	контроль	
FnIII	15 (39.5)	12 (42.8)	70 (41.6)	15 (20.5)
Ig	17 (44.7)	9 (32.2)	62 (36.9)	34 (46.6)
Protein kinase	—	1 (3.6)	2 (1.2)	—
PEVK	—	—	3 (1.8)	1 (1.4)
Другие	6 (15.8)	6 (21.4)	31 (18.5)	23 (31.5)
Всего	38	28	168	73

Таблица 5. Представленность выявленных уникальных миссенс-вариантов в различных транскриптах (изоформах) титина в изучаемых группах

Группа	Всего мутаций	Meta, <i>n</i> (%) (364 ex)	Кол-во мутаций в изоформах титина, <i>n</i> (%)				
			N2BA (313 ex)	N2B (191 ex)	Nvx-1 (192 ex)	Nvx-2 (192 ex)	Nvx-3 (46 ex)
НКМ	42	39 (92.9)	38 (90.4)	25 (59.5)	25 (59.5)	25 (59.5)	3 (7.1)
ГКМП	28	2 (100)	28 (100)	22 (78.6)	22 (78.6)	22 (78.6)	5 (17.8)
Контроль	179	168 (93.9)	164 (91.6)	132 (73.7)	132 (73.7)	136 (75.95)	26 (14.5)

Таблица 6. Распределение встречаемости уникальных миссенс-вариантов и их локализация с учетом различных изоформ титина в группах пациентов и в контроле

Изоформы <i>TTN</i>	НКМ		ГКМП		Контроль	
	<i>n</i> (%)	экзоны*	<i>n</i> (%)	экзоны	<i>n</i> (%)	экзоны
N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2, Nvx-3	1/42 (2.4)	1 : 28	5/28 (17.9)	5 : 16, 29, 36, 42, 48	15/179 (8.4)	12 : 2, 3 (2), 7, 14, 18, 25, 26, 28 (3), 29, 39, 42, 44
N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2	25/42 (59.5)	14 : 238, 254, 273, 308, 310, 311, 326 (9)**; 333, 335, 338, 339 (2), 349, 357 (2), 358 (2)	17/28 (60.7)	16 : 49, 237, 253, 257, 263, 264, 278, 287, 306, 310, 316, 326 (2), 340, 352, 356, 358	117/179 (65.4)	49 : 48 (3), 225, 229 (2), 230, 239, 245 (2), 252, 253, 254, 256 (5), 265, 266, 269, 272, 275, 277 (3), 279, 286, 287, 289, 291, 293 (4), 295, 300, 301, 304 (3), 305, 310 (3), 316, 320, 322, 325, 326 (26), 327 (2), 328, 334 (3), 335 (2), 337 (3), 339, 343 (2), 344 (3), 350 (2), 352, 353, 355, 358 (14), 359, 360 (2), 362 (2)
N2BA	13/42 (31.0)	11 : 50, 56, 61 (2), 67, 69, 71, 80, 86, 99, 107, 127 (2)	6/28 (21.4)	5 : 52, 66, 93, 113 (2), 207	32/179 (17.9)	26 : 50, 58, 60, 61, 63, 64, 68, 69, 70 (2), 71, 73, 74, 76 (2), 78, 81, 86 (2), 88 (4), 91, 92, 97, 100, 117, 128, 131, 136, 202
Nvx-3	3/42 (7.1)	1 : 46***	—	—	11/179 (6.1)	1 : 46***
Nvx-2	—	—	—	—	4/179 (2.2)	1 : 46

Примечание. * — нумерация экзонов в метатранскрипте; ** — в скобках указано число уникальных нуклеотидных вариантов в экзоне; *** — 46-й экзон Nvx-3 (отсутствует в метатранскрипте); жирным шрифтом выделены число экзонов и доля вариантов.

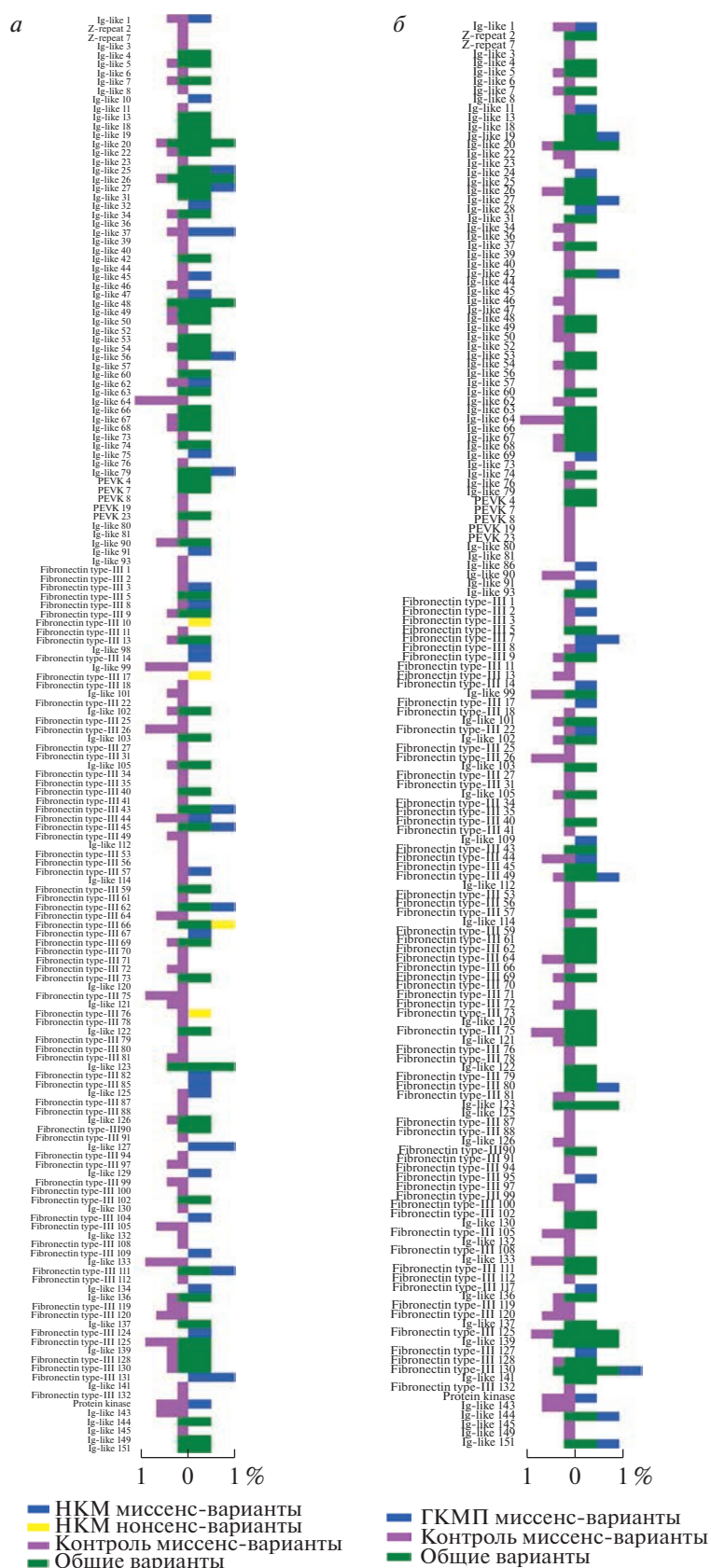


Рис. 3. Схематичное изображение распределения уникальных и общих миссенс-вариантов в функциональных доменах между анализируемыми группами: *а* – НКМ и контроль; *б* – ГКМП и контроль. Вправо отложена доля вариантов в группе пациентов, влево – в контрольной выборке.

татранскрипта затрагивали только сердечную изоформу N2BA и отсутствовали в других изоформах в результате альтернативного сплайсинга. Один вариант (2.4%) находился в 199-м экзоне метатранскрипта и не идентифицировался в анализируемых изоформах.

Все варианты были единичными, за исключением нуклеотидной замены с.200T>C (p.I67T, rs952685437) в третьем экзоне, которая встретилась у двух пациентов с НКМ (табл. 7).

В группе из 74 пациентов с ГКМП в метатранскрипте обнаружено 28 уникальных миссенс-вариантов (табл. 5, 6). Пять из 28 (17.9%) вариантов в пяти экзонах присутствовали во всех сердечных изоформах, 17 (60.7%) замен в 16 экзонах метатранскрипта присутствовали во всех изоформах, кроме Nvx-3 (табл. 6). В сердечной изоформе N2BA насчитывалось еще шесть (21.4%) уникальных миссенс-вариантов в пяти экзонах метатранскрипта, которые отсутствовали в других сердечных изоформах. У пациентов с ГКМП в отличие от группы с НКМ не выявлено миссенс-мутаций, локализованных в 46-м экзоне Nvx-3.

Нуклеотидная замена в третьем экзоне, обнаруженная у двух пациентов с НКМ, также дважды встретилась в группе с ГКМП (табл. 7), при этом отсутствовала в нашей группе сравнения и в других популяциях мира.

В контрольной выборке (194 человека) в метатранскрипте установлено 179 миссенс-вариантов (табл. 5, 6), не встретившихся у пациентов: 168 (93.8%) замен — в метатранскрипте и 11 (6.2%) — в 46-м экзоне Nvx-3. 15 (8.4%) из 179 миссенс-вариантов в 12 экзонах присутствовали во всех сердечных изоформах (N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2 и Nvx-3), а 117 (65.4%) мутаций в 49 экзонах метатранскрипта присутствовали во всех изоформах, кроме Nvx-3. В сердечной изоформе N2BA насчитывалось еще 32 (17.9%) уникальных миссенс-варианта в 26 экзонах, характерных исключительно для этой изоформы титина. Выявлено также четыре (2.2%) миссенс-мутации в 46-м экзоне метатранскрипта, соответствующего 44-му экзону Nvx2 (табл. 6).

Более одного раза выявлен 31 (17.3%) вариант в 24 экзонах (2, 3, 14, 25, 26, 29, 46, 70 (2 мутации), 71, 86, 254, 256, 269, 277 (2 мутации), 304, 310, 325, 326 (3 мутации), 335, 339, 344, 352, 358 (4 мутации), 360). Эти замены с большой долей вероятности являются доброкачественными и не вызывают структурных нарушений миокарда.

Характеристика потенциально патогенных миссенс-мутаций в гене TTN у пациентов со структурными нарушениями миокарда

В группе с НКМ (44 пациента) у 16 (36.4%) человек идентифицировано 17 (40.5%) уникальных мис-

сенс-вариантов, характеризующихся $MAF < 0.00001$ (табл. 7). 12 (70.6%) нуклеотидных замен приводили к изменению А-зоны саркомера, три (17.6%) затрагивали I-зону, одна у двух пациентов находилась в Z-диске. Пять (29.4%) вариантов находились в 326-м экзоне, два — в 339-м экзоне.

Трое (№ 577, 614, 583) из 16 пациентов с заменами в гене *TTN* были компаундными гетерозиготами (два редких варианта), у пациента № 583 второй была нонсенс-мутация в гене *TTN* (табл. 1). У семи (43.8%) пробандов найден дополнительный вариант в другом гене, ассоциированном с кардиомиопатией. Девять (52.9%) нуклеотидных вариантов были новыми (табл. 7).

В группе с ГКМП у 13 (17.6%) из 74 пациентов идентифицировали 13 (46.4%) из 28 миссенс-вариантов, имеющих $MAF < 0.00001$ (табл. 7). Все мутации были уникальными за исключением двух: p.Le67Thr (два пациента) и p.R16524H (два пациента). Замена p.Le67Thr была выявлена, как уже говорилось выше, и у двух пациентов с НКМ. Шесть (46.2%) нуклеотидных вариантов приводили к изменению А-зоны саркомера, пять (38.5%) затрагивали I-зону, одна локализована у двух пациентов в Z-диске и еще одна в М-области.

Два (№ 365, 493) из 13 пациентов были компаундными гетерозиготами. У троих (23.1%) пробандов обнаружен дополнительный вариант в другом гене, ассоциированном с ГКМП. Пять (38.5%) мутаций были новыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

Секвенирование гена *TTN* независимо от клинических характеристики исследуемых групп приводит к идентификации большого количества нуклеотидных вариантов, что скорее всего обусловлено огромным размером гена, его структурой, а также потерей значительных участков в ходе альтернативного сплайсинга при образовании различных изоформ титина. Варианты в гене *TTN* описаны при различных патологиях скелетных мышц и сердца [21–24]. Доказано, что укороченные варианты (*TTNtv*) в большинстве случаев являются причиной ДКМП и НКМ [25], при этом их наследование является аутосомно-доминантное. *TTNtv* также обнаруживается у пациентов с мышечными миопатиями, но в данном случае в основном наблюдается рецессивное наследование [21, 24].

Интерпретация диагностической значимости миссенс-вариантов в гене *TTN*, представляющих подавляющее большинство идентифицированных вариантов, является более сложной задачей. М. Savarese и соавт. показали, что определить уровень их патогенности, опираясь исключительно на критерии руководства по классификации вариантов ACMG, затруднительно и предложили

Таблица 7. Характеристика редких потенциально патогенных миссенс-мутаций (MAF < 0.00001) в гене *TTN* в группах пациентов

№ п/п	Шифр пациента	Экзон (зона саркомера)	Домен	Замена в ДНК (rs)	Замена в белке	MAF (gnomAD)	Дополнительные варианты (класс ACMG)
Пациенты с НКМ							
1	614 (1)	339 (A)	Ig-134	c.93002A>G rs1308531791	p.N31001S	4.025e-06	<i>KCNJ2 (III)</i>
2	550	339 (A)		c.92756G>C	p.R30919P	—	—
3	581	338 (A)	Fn-111	c.92087C>A	p.A30696E	—	<i>LDB3 (III)</i>
4	594	333 (A)	Fn-104	c.88930A>G	p.K29644E	—	—
5	585	326 (A)	Ig-127	c.84092G>A rs1206516728	p.G28031E	4.045e-06	—
6	614 (2)	326 (A)	Fn-82	c.80258A>C rs1321131877	p.Y26753S	4.021e-06	<i>KCNJ2 (III)</i>
7	547	326 (A)	Fn-67	c.73858C>T rs1191890177	p.P24620S	4.035e-06	<i>RYR2 (III)</i>
8	575	326 (A)	Fn-62	c.71903A>C rs769320596	p.N23968T	2.017e-05	—
9	563	326 (A)	Fn-57	c.69992C>T	p.P23331L	—	<i>MYH7 (III)</i>
10	577 (1)	308 (A)	Fn-43	c.64151C>G	p.T21384S	—	—
11	555	273 (A)	Ig-98	c.51961C>T rs752764827	p.R17321C	2.02e-05	<i>CACNA1C (III)</i>
12	625	254 (A)	Fn-3	c.47691G>T	p.E15897D	—	—
13	577 (2)	199 (—)	—	c.38807A>G	p.K12936R	—	—
14	579	71 (I)	Ig-47	c.20583C>G	p.N6861K	—	<i>LDB3 (III), TTNtv</i>
15	585	69 (I)	Ig-45	c.20252G>T	p.C6751F	—	—
16	583	28 (near Z-disk/I)	Ig-10	c.6449T>C rs761352132	p.M2150T	1.594e-05	<i>MYBPC3 (IV), TTNtv</i>
17	331; 556	3 (Z-disk)	Ig-1	c.200T>C rs952685437	p.I67T	7.0 e-06	—
Пациенты с ГКМП							
1	237	360 (M)	Ig-151	c.107182G>A rs764891218	p.E35728L	1.216e-05	—
2	36	316 (A)	Fn-49	c.66589C>T rs774696610	p.R22197W	1.214e-05	—
3	71	310 (A)	Fn-44	c.64688C>G rs751700216	p.P21563R	8.1e-06	<i>TCAP (III)</i>
4	50	310 (A)	Fn-44	c.64860G>C rs373713828	p.R21620S	8.05e-06	<i>MYBPC3 (IV)</i>
5	408	306 (A)	Ig-109	c.63715G>C	p.D21239H	—	—
6	289	264 (A)	Fn-7	c.49571G>A rs757390152	p.R16524H	1.621e-05	—
7	493 (1)	257 (A)	—	c.48163C>T rs1012450335	p.R16055C	4.051e-06	—
8	340	237 (I)	Ig-86	c.43883C>T	p.S14628F	—	—
9	365 (1)	113 (I)	—	c.30801A>T	p.K10267N	—	—
10	365 (2)	113 (I)	—	c.30794C>T rs1333544444	p.P10265L	0	—
11	493 (2)	52 (I)	Ig-28	c.15378G>T	p.Q5126H	—	—
12	213	29 (I)	Ig-11	c.6560A>G	p.E2187G	—	—
13	101	3 (Z-disk)	Ig-1	c.200T>C rs952685437	p.I67T	7.0 e-06	<i>MYH7 (IV)</i>
	59						—

Примечание. Жирным шрифтом выделены новые нуклеотидные варианты; MAF — частота минорного аллеля; * — в скобках указан № п/п нуклеотидного варианта для пациентов с компаундной гетерозиготой.

поправки классификации вариантов гена *TTN* в контексте конкретных заболеваний скелетных мышц [26].

В ходе нашего исследования секвенирована кодирующая последовательность гена *TTN* методом NGS у пациентов с НКМ (44 человека) и ГКМП (74 человека), а также в контрольной группе (194 человека) и выявлено девять нуклеотидных вариантов, приводящих к укороченному титину (*TTNtv*), и 372 миссенс-варианта. Проведен сравнительный анализ генетической изменчивости титина между группами пациентов с НКМ и ГКМП и контрольной выборкой по типу мутаций и их локализации в экзонах гена, а также в саркомерных и функциональных доменах белка.

Варианты *TTNtv* были сосредоточены в группе пациентов с НКМ, что подтверждает их значимую роль в патогенезе этого заболевания (табл. 1). Их доля в этой группе составила 18.2% и была в 18 раз выше, чем в контроле (1.1%; $p < 0.00004$). Важно отметить, что *TTNtv* у пациентов были уникальными, локализовались в конститутивных экзонах, не подвергающихся альтернативному сплайсингу, и присутствовали во всех сердечных изоформах, за исключением *Nvx-3*. В противоположность этому обнаруженная у двух человек контрольной группы новая нонсенс-мутация c.10927C>A (p.Glu3643*) находилась в 46-м экзоне метатранскрипта и приводила к преждевременному стоп-кодону только в 44-м экзоне *Nvx-2*. Уровень транскрипции (PSI – proportion spliced-in) в этом экзоне по литературным данным составляет только 7–14% [23]. Поскольку мутация p.Glu3643* затрагивает всего лишь одну изоформу титина с низким уровнем экспрессии, можно предположить, что данное нарушение является не столь критичным для функционирования кардиомиоцитов. У пациентов с ГКМП такой тип мутаций вообще отсутствовал. Полученные данные подтверждают важность поиска мутаций в гене *TTN* при НКМ. Интересно, что в нашей когорте *TTNtv* в 75.0% случаев сочетались с одним или несколькими вариантами с неустановленной клинической значимостью (VUS) в этом же гене или в других генах, ассоциированных с кардиомиопатиями (табл. 1). В исследовании K. Miszalski-Jamka и соавт. [25] также продемонстрировано значительное превышение совместного наследования *TTNtv* с другими нуклеотидными заменами, что позволяет предположить необходимость дополнительных генетических факторов для фенотипического проявления *TTNtv* в большинстве случаев. У 75% носителей мутаций *TTNtv* наблюдался дилатационный фенотип НКМ (табл. 1). Ранее в ряде работ учеными установлена связь *TTNtv* с ДКМП, но при этом ими не проводилась оценка некомпактности миокарда в этой когорте пациентов [11]. На сегодняшний день считается, что основным механизмом действия *TTNtv* является гаплонедостаточ-

ность, которая проявляется дезорганизацией саркомера и подавлением сигнальных путей [23].

Миссенс-замены в гене *TTN* обнаружены как среди пациентов с НКМ и ГКМП, так и у людей в контрольной выборке без структурных нарушений миокарда, при этом две третьих от 372 отличающихся от референсных нуклеотидных вариантов были уникальными и встречались только в одной из трех анализируемых групп (рис. 1). Одна треть нуклеотидных замен представляла общие полиморфные варианты, установленные либо во всех трех группах (20.2%), либо в каких-либо двух (12.9%). Наибольшая доля уникальных миссенс-вариантов (71.9%) была сконцентрирована в контрольной выборке. На втором месте по данному типу мутаций стояла выборка пациентов с НКМ (16.9%), а наименьшее число наблюдалось в группе пациентов с ГКМП (11.2%), несмотря на то, что количество пациентов в этой группе было практически в 1.7 раз больше, чем в группе пациентов с НКМ. Существенные различия касались также доли частых уникальных вариантов, встречающихся более чем у одного человека. Наибольшим этот показатель также был в контрольной выборке. Повышенный уровень уникальных миссенс-вариантов в контроле, по-видимому, в какой-то мере объясняется большим объемом этой группы (194 человека), а также является косвенным подтверждением существующего на данный момент предположения о доброкачественности большинства миссенс-вариантов в гене *TTN*. В пользу этого свидетельствует и наличие существенной доли частых уникальных вариантов в контрольной группе, которые распространяются в популяции в силу их нейтральности.

Следует отметить, что распределение миссенс-вариантов по экзонам гена *TTN* и соответственно по областям саркомера и функциональным доменам не было равномерным (табл. 2–4, рис. 2, 3) и характеризовалось межгрупповой вариабельностью. Более половины (58.5%) экзонов характеризовались отсутствием каких-либо нуклеотидных замен, что, вероятно, указывает на критическую значимость кодируемых ими областей белка. Несколько уникальных нуклеотидных замен имела небольшая часть экзонов (8.2%): 61 и 127 экзоны – в группе НКМ; 310, 326, 358 экзоны – у пациентов с ГКМП; 3, 28, 29, 46, 48, 70, 74, 76, 86, 88, 229, 245, 256, 277, 293, 304, 310, 326, 327, 334, 335, 337, 343, 344, 350, 358, 360 экзоны – в контрольной выборке. 21.2% экзонов были богаты полиморфными сайтами, в них концентрировались общие для всех трех групп варианты. Таким образом, данные, представленные в табл. 2–7, могут быть полезными при оценке патогенного статуса выявляемых миссенс-вариантов в гене *TTN*: варианты в экзонах без нуклеотидных замен, а также в экзонах с большим количеством уникальных мутаций, выявленных у пациентов со

структурными изменениями миокарда, имеют больше шансов оказаться патогенными.

В ходе анализа было показано, что уникальные варианты у пациентов с кардиомиопатиями чаще локализовались в А-зоне саркомера (рис. 2, табл. 1, 7): 62.5% *TTNtv* (НКМ); 70.6 и 46.2% миссенс-мутаций у пациентов с НКМ и ГКМП соответственно. Среди вероятно доброкачественных вариантов, которые встречались как среди пациентов, так и в контрольной выборке, доля мутаций в А-зоне составила лишь около 32.9%, а основная часть была сосредоточена в I-зоне. Это согласуется с данными других исследователей, также установивших, что мутации в гене *TTN* в условно здоровой популяции локализуются обычно в экзонах, соответствующих I-зоне саркомера и имеющих низкий показатель PSI, в отличие от пациентов с кардиомиопатиями (КМП), у которых они преимущественно находятся в экзонах с конститутивным уровнем экспрессии (PSI = 100%), кодирующих область А-зоны титина [23, 27].

Анализ присутствия уникальных миссенс-вариантов в сердечных изоформах (N2BA, N2B, Nvx-1, Nvx-2 и Nvx-3) титина в изучаемых группах (табл. 5, 6) не выявил существенных различий между пациентами и контролем. Доля вариантов, представленных во всех сердечных изоформах титина, составила только 2.4% в группе с НКМ и была несколько выше у пациентов с ГКМП (17.9%) и в контроле (8.4%). Еще порядка 60–65% нуклеотидных замен в анализируемых группах находились во всех изоформах, исключая Nvx-3. Варианты, локализованные в экзонах только сердечной изоформы титина N2BA, составили 20–30%, их число было выше в группе с НКМ: 31.0% (НКМ), 21.4% (ГКМП), 17.9% (контроль).

Во всех группах выявлено порядка 30–50% новых вариантов, не обнаруженных ранее. Поскольку они встречались практически с одинаковой частотой как среди пациентов, так и в контроле, трудно оценить степень патогенности этих нуклеотидных изменений, многие из них могут оказаться нейтральными и представлять исключительно популяционный интерес.

Таким образом, в ходе проведенного исследования показана роль укорачивающих титин вариантов *TTNtv* в развитии НКМ, преимущественно дилатационного фенотипа. В настоящей работе определены высокомутабельные и консервативные экзоны гена *TTN*, а также представлен перечень миссенс-мутаций с возможной клинической значимостью в отношении структурной патологии миокарда, включая новые варианты. Представленные данные могут быть дополнительным ориентиром в интерпретации патогенного статуса миссенс-вариантов в этом гене. При этом следует отметить, что на данный момент самым надежным методом определения и доказательства

патогенности выявленного миссенс-варианта в гене *TTN* у пациентов со структурными нарушениями миокарда остается, пожалуй, сегрегационный анализ в случае больших информативных семейств. Это подтверждается и результатами других исследований [28].

Значительный прорыв в понимании роли и патогенной значимости вариантов титина при сердечной и мышечной патологии лежит в плоскости совместных усилий исследователей в изучении его генетической изменчивости с использованием больших когорт пациентов, а также в проведении сравнительных исследований случай–контроль, принадлежащих одной популяции.

Работа выполнена в рамках мероприятия 2.2.6 “Изучение спектра и распространенности мутаций в гене титина у белорусских пациентов с наследственными моногенными заболеваниями миокарда и оценка их диагностической значимости” подпрограммы 1 “Геномика, эпигеномика, биоинформатика” ГПНИ “Биотехнологии 2” (2021–2025 гг.).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *LeWinter M.M., Granzier H.L.* Titin is a major human disease gene // *Circulation*. 2013. V. 127. № 8. P. 938–944. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.139717>
2. *Granzier H.L., Irving T.C.* Passive tension in cardiac muscle: Contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments // *Biophys. J.* 1995. V. 68. № 3. P. 1027–1044. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80278-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80278-X)
3. *Bang M.L., Centner T., Fornoff F. et al.* The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system // *Circ Res.* 2001. V. 89. № 11. P. 1065–1072. <https://doi.org/10.1161/10.1161/hh2301.100981>
4. *Linke W.A.* Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction // *Cardiovasc. Res.* 2008. V. 77. № 4. P. 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.029>
5. *Musa H., Meek S., Gautel M. et al.* Targeted homozygous deletion of M-band titin in cardiomyocytes prevents sarcomere formation // *J. Cell Science*. 2006. V. 119. № 20. P. 4322–4331. <https://doi.org/10.1242/jcs.03198>

6. *Lahmers S., Wu Y., Call D.R. et al.* Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium // *Circ. Res.* 2004. V. 94. № 4. P. 505–513.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000115522.52554.86>
7. *Greaser M.L., Krzesinski P.R., Warren C.M. et al.* Developmental changes in rat cardiac titin/connectin: Transitions in normal animals and in mutants with a delayed pattern of isoform transition // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2005. V. 26. № 6–8. P. 325–332.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-9039-0>
8. *Cazorla O., Freiburg A., Helmes M. et al.* Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness // *Circ. Res.* 2000. V. 86. № 1. P. 59–67.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>
9. *Neagoe C., Kulke M., del Monte F. et al.* Titin isoform switch in ischemic human heart disease // *Circulation.* 2002. V. 106. № 11. P. 1333–1341.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029803.93022.93>
10. *Nagueh S.F., Shah G., Wu Y. et al.* Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy // *Circulation.* 2004. V. 110. № 2. P. 155–162.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF>
11. *Roberts A.M., Ware J.S., Herman D.S. et al.* Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. P. 270–276.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010134>
12. *Herman D.S., Lam L., Taylor M.R. et al.* Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 366. № 7. P. 619–628.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>
13. *Golbus J.R., Puckelwartz M.J., Fahrenbach J.P. et al.* Population-based variation in cardiomyopathy genes // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012. V. 5. № 4. P. 391–399.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.112.962928>
14. *Roncarati R., Viviani Anselmi C., Krawitz P. et al.* Doubly heterozygous LMNA and TTN mutations revealed by exome sequencing in a severe form of dilated cardiomyopathy // *Eur. J. Hum. Genet.* 2013. V. 21. № 10. P. 1105–1111.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.16>
15. *Jenni R., Oechslin E., Schneider J. et al.* Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: A step towards classification as a distinct cardiomyopathy // *Heart (British Cardiac Society).* 2001. V. 86. № 6. P. 666–671.
<https://doi.org/10.1136/heart.86.6.666>
16. *Petersen S.E., Selvanayagam J.B., Wiesmann F. et al.* Left ventricular non-compaction: in sights from cardiovascular magnetic resonance imaging // *J. Am. College Cardiology.* 2005. V. 46. № 1. P. 101–105.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.045>
17. *Jacquier A., Thuny F., Jop B. et al.* Measurement of trabeculated left ventricular mass using cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of left ventricular non-compaction // *Eur. Heart J.* 2010. V. 31. № 9. P. 1098–1104.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp595>
18. *Wang K., Li M., Hakonarson H.* ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // *Nucl. Acids. Res.* 2010. V. 38. № 16. e164.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
19. *Richards S., Aziz N., Bale S.* 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. V. 17. P. 405–424.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
20. *Hazebroek M.R., Krapels I., Verdonschot J. et al.* Prevalence of pathogenic gene mutations and prognosis do not differ in isolated left ventricular dysfunction compared with dilated cardiomyopathy // *Circ. Heart Fail.* 2018. V. 11. № 3. e004682.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004682>
21. *Savarese M., Sarparanta J., Vihola A. et al.* Increasing role of titin mutations in neuromuscular disorders // *J. Neuromuscular Diseases.* 2016. V. 3. № 3. P. 293–308.
<https://doi.org/10.3233/JND-160158>
22. *Oates E.C., Jones K.J., Donkervoort S. et al.* Congenital titinopathy: Comprehensive characterization and pathogenic insights // *Ann. Neurol.* 2018. V. 83. № 6. P. 1105–1124.
<https://doi.org/10.1002/ana.25241>
23. *Hinson J.T., Chopra A., Nafissi N. et al.* HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy // *Science.* 2015. V. 349. № 6251. P. 982–986.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa5458>
24. *Savarese M., Maggi L., Vihola A.* Interpreting genetic variants in titin in patients with muscle disorders // *JAMA Neurol.* 2018. V. 75. № 5. P. 557–565.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4899>
25. *Miszalski-Jamka K., Jefferies J.L., Mazur W. et al.* Novel genetic triggers and genotype–phenotype correlations in patients with left ventricular noncompaction // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017. V. 10. № 4. e001763.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.117.001763>
26. *Savarese M., Johari M., Johnson K. et al.* Improved criteria for the classification of titin variants in inherited skeletal myopathies // *J. Neuromuscul. Dis.* 2020. V. 7. № 2. P. 153–166.
<https://doi.org/10.3233/JND-190423>
27. *Akinrinade O., Koskenvuo J.W., Alastalo T.P.* Prevalence of titin truncating variants in general population // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. e0145284.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145284>
28. *Begay R.L., Graw S., Sinagra G. et al.* Familial cardiomyopathy registry. role of titin missense variants in dilated cardiomyopathy // *J. Am. Heart Assoc.* 2015. V. 4. № 11. e002645.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002645>

Genetic Variation in Titin in Patients with Hypertrophic and Non-Compact Cardiomyopathy

N. N. Chakova^{a, *}, R. S. Shulinski^a, S. M. Komissarova^b, T. V. Dolmatovich^a, S. S. Niyazova^a,
O. Ch. Mazur^a, A. S. Ivanova^a, and A. D. Liaudanski^a

^a*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Republic Belarus*

^b*Republican Scientific and Practical Centre "Cardiology", Minsk, 220036 Republic Belarus*

*e-mail: n.chakova@igc.by

Using NGS, the coding sequence of the *TTN* gene was sequenced in patients with left ventricular non-compaction cardiomyopathy (LVNC, 44 individuals) and hypertrophic cardiomyopathy (HCM, 74 individuals), as well as in the control (194 individuals), and 9 nucleotide variants leading to truncated titin (*TTNtv*) and 372 missense variants were identified. A comparative analysis of the genetic variability of titin between the groups of patients with LVNC and HCM and the control sample was carried out in terms of the type of mutations and their localization in the exons of genes, as well as in the sarcomeric and functional domains of the protein. The role of *TTNtv* in the development of LVNC was confirmed, and the significance of additional variants in the same gene or in other genes associated with various cardiomyopathies for the phenotypic implementation of *TTNtv* was demonstrated. 75% of patients with *TTNtv* had a dilated LVNC phenotype. Missense substitutions in the *TTN* gene were found both among the patients with LVNC and HCM, and in people in the control sample, which indirectly confirms that most missense variants in this gene are benign. The paper identifies and lists highly mutable and conserved exons of the *TTN* gene and also presents a list of missense mutations with possible clinical significance in relation to the structural pathology of the myocardium, including new variants. It was shown that the majority of pathogenic and potentially significant mutations were located in the A-zone of the sarcomere. In all the groups, about 30–50% of new variants were identified. Probably, many of them are neutral and are of exclusively population interest.

Keywords: *TTN* gene, titin-truncating variants (*TTNtv*), missense-mutations, pathogenic significance of mutations, hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction cardiomyopathy.