Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Emrahi and Toufan Tabrizi, *Med J Tabriz Uni Med Sciences.* 2021;43(4):323-334
doi: 10.34172/mj.2021.059
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

New mutation in the NEBL gene in a family with Hypertrophic cardiomyopathy: Complexity of whole exome sequencing results interpretation

Leila Emrahi[1], **Mehrnoush Toufan Tabrizi**[2*]

[1]Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Cardiovascular Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO:

Article History:
Received: 27 Jan 2020
Accepted: 28 March 2020
ePublished: 15 Sep 2021

Keywords: Hypertrophic cardiomyopathy;
Whole exome sequencing;
NEBL gene

Abstract

Background. Hypertrophic cardiomyopathy is the most common genetic cardiovascular disease and is predominantly inherited in an autosomal dominant pattern. In this study, genetic analysis of a family affected by hypertrophic cardiomyopathy with three patients was done using whole-exome sequencing.

Methods. Whole-exome sequencing was performed on two affected individuals and one healthy family member. The candidate variant was evaluated using Sanger sequencing on other family members. Given the novelty of the candidate variant, it was also studied in 200 healthy individuals. Different bioinformatics analyses were performed to evaluate variant pathogenicity.

Results. The candidate variant was present in two affected patients as well as in two apparently healthy siblings. This variant was novel and did not exist in any databases. An echocardiographic result on family members showed that another proband's brother was affected and did not have a candidate variant. Also, this variant was not found in a population of 200 healthy individuals. Bioinformatics analysis revealed the pathogenicity of the variant.

Conclusion. Although all the early studies of the candidate variant showed it as a causative variant, further studies on more individuals of the family rejected its causality alone and from these results, concluding that the results of exome sequencing should be analyzed carefully, and necessitating further study in a pedigree with more affected individuals and functional studies to prove the variant as pathogenic.

How to cite this article: Emrahi L, Toufan Tabrizi M. [New mutation in the NEBL gene in a family with Hypertrophic cardiomyopathy: Complexity of whole exome sequencing results interpretation]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(4):323-334. Persian.

*Corresponding author; E-mail: mtoufan@gmail.com
© 2021 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Extended Abstract

Background

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a heterogeneous cardiac disease with an incidence of 1 in 500 in the general population. The European Society of Cardiology (ESC) and American Heart Association (AHA) defined HCM as a condition marked by unexplained left ventricular hypertrophy (LVH), myocyte/myofibrillar disarray, interstitial fibrosis, and dysplastic arterioles in the absence of other abnormal loading conditions.

It is commonly caused by mutations in cardiac sarcomere protein genes and rarely by genes involved in calcium signaling and metabolic pathways. Previous studies showed the links between cardiomyopathies and gene mutations in more than 19 Z-disks associated proteins such as *NEBL*. *NEBL*, encoding nebulette, a member of the nebulin proteins family that are essential in myofibrillogenesis and assembly of the Z-disks and a variety of other cytoskeletal structures. In this study, we aimed to present an interpretation complexity of genetic analysis in a family affected by HCM with a nonsense variant c.T1680A in *NEBL*.

Methods

The study protocol was approved by the Ethics committee of the Tarbiat Modares University. Informed consent for genetic testing was obtained from the patients and other participants after appropriate genetic counseling.

The proband, a 27-year old woman, and her 5 relatives who participated in the study were subjected to a comprehensive clinical examination including echocardiography. HCM status for participants was considered according to conventional diagnostic criteria of European Society of Cardiology (ESC) guidelines on a diagnosis. Blood sampling was performed from family members and 200 apparently healthy individuals of different Iranian ethnic groups and DNA was extracted by salting out method. Whole exome sequencing was done for proband, her aunt(affected), and her brother(nonaffected). Co-segregation analysis was applied using Sanger sequencing to screen other family members for the variant. The amplification-refractory mutation system (ARMS) was performed to evaluate the *NEBL* c.T1680A substitution in healthy control individuals. Primers for sanger sequencing and ARMS-PCR (Internal and external direct and reverse primers) were designed using Gene Runner and Primer Express software. To perform the reaction, a 2X PCR master mix (Amplicon, Pishgam, Iran) containing an ultimate concentration of 1.5 mM MgCl2 was used in a final volume of 20 µl. The PCR program included 5 min initial priming at 95°C and then 30 cycles with 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 59°C (Sanger sequencing) and 52°C (ARMS-PCR), 30 seconds at 72°C with a final extension of 72°C for 10 minutes. The PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel along with the 100 base pairs DNA marker. The precision of the Tetra-ARMS assay was confirmed by DNA sequencing of randomly selected samples. The pathogenicity of the variant was checked on the following databases and online resources.

Results

Echocardiography findings

Our proband at 7th week of pregnancy referred to a cardiac murmur evaluation. Echocardiography showed typical hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM) with reverse curvature type and significant septal hypertrophy with a gradient of more than 100 mmHg across LVOT at rest. Given the critical systolic anterior motion (SAM), severe resting LVOT gradient, near severe mitral regurgitation

(MR), and also dyspnea, therapeutic abortion recommended. She followed pharmacologic therapies with Metoprolol 95mg daily, and six months later, she underwent surgical myectomy and myotomy due to inadequate response to pharmacologic therapies. Follow echocardiography revealed significant improvement of LVOT flow, resolved SAM residual 30 mmHg gradient across LVOT at rest, and mild MR.

Family history

In pedigree analysis, Proband's father and one of her aunts (II-2 and II-4) had a cardiac disease and they have died at 55 and 58 years of age, respectively. There was no evidence to examine and identify their disease. Proband's other aunt (II-3) was affected with HCM and none of her siblings had symptoms. Since some HCM affected individuals are asymptomatic and never experience cardiac symptoms, all family members underwent further physical examination and echocardiography. In the first relative screening, we realized that one of the proband's siblings (III-1) had also the same HOCM feature as proband, with frequent PVCs at rest, so he became a candidate for ICD devise implantation.

Molecular Genetics Results

Although the patient was asymptomatic and the disease was diagnosed by physical examination and echocardiography, she was analyzed using WES to identify the apparent causative variants. Through WES of the proband, a novel heterozygous mutation was identified. The variant is a nonsense mutation c.T1680A (p.Y560*) in exon 17 of the *NEBL* gene. This nucleotide and its corresponding amino acid tyrosine are highly conserved throughout a variety of species, and MutationTaster suggests pathogenicity for this variation. 2D modeling for assessing mutant and normal forms of *NEBL* protein shows that this nonsense mutation leads to the production of truncated protein which may result in structural and functional changes. The results of co-segregation analysis of the *NEBL* gene mutation through proband's relatives by Sanger-sequencing showed that II-3 was also heterozygote for this variant but it is not found in III-1. Also, III-2 and III-4 individuals have inherited this mutation but they were asymptomatic for HCM conditions. III-3 for the variant was not segregated. We observed T1680 substitution to A in none of the 200 healthy samples indicating that c.T1680A mutation is not an SNP in the Iranian population.

Conclusion

In this study, we evaluated a novel nonsense mutation c.T1680A, p.Y560* in the *NEBL* gene through screening of an HCM family and ethnically matched control group. To our knowledge, this variant has not been reported in dbSNP, gnomAD, and other related databases. Comprehensive bioinformatics analysis showed the pathogenicity of the mutation. Population study confirmed in silico analysis since in 200 healthy control no carrier of the c.T1680A mutation was observed. However, co-segregation analysis of proband's relatives led to contradictory results. Although the mutation was confirmed in the second HCM patient, unexpectedly the Sanger sequencing did not confirm c.T1680A mutation in the third affected case who was diagnosed by clinical family screening. Therefore, our results clearly show that in HCM pedigree, even with co-segregation of a nonsense mutation in two patients of a family, its absence in the healthy population, and in silico evidence of pathogenicity, the mutation cannot be considered causative with certainty.

امراهي و طوفان تبريزی، *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. مهر و آبان ۱۴۰۰؛ ۴۳(۴): ۳۲۳-۳۳۴
doi: 10.34172/mj.2021.059
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

جهش جدید در ژن NEBL در یک خانواده مبتلا به بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک: پیچیدگی تفسیر نتایج حاصل از توالی‌یابی اگزوم کامل

لیلا امراهی[۱]، مهرنوش طوفان تبریزی[۲*]

[۱]گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۷
پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۹
انتشار برخط: ۱۴۰۰/۶/۲۴

کلید واژه‌ها:
کاردیومیوپاتی‌هایپرتروفیک؛
توالی‌یابی اگزوم کامل؛
ژن NEBL

چکیده

زمینه. کاردیومیوپاتي هايپرتروفيك شايعترين بيماري قلبي عروقي ژنتيكي است كه اغلب داراي توارث اتوزومال غالب مي‌باشد. هدف از اين مطالعه، بررسی ژنتیکی یک خانواده مبتلا به بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک با سه فرد مبتلا با استفاده از روش توالی‌یابی اگزوم کامل می‌باشد.

روش کار. توالی‌یابی اگزوم کامل بر روی دو فرد مبتلا و یک فرد سالم خانواده انجام شد و واریانت کاندید با استفاده از روش توالی‌یابی سنگر بر روی سایر اعضای خانواده مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به جدید بودن، این کاندید در ۲۰۰ فرد سالم هم مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی برای بررسی بیماری‌زایی واریانت انجام شدند.

یافته. واریانت کاندید در دو فرد مبتلای ارسال شده برای توالی‌یابی اگزوم و همچنین در یک خواهر و یک برادر به ظاهر سالم وجود داشت. این واریانت جدید بوده و در هیچ یک از پایگاه داده‌ها وجود نداشت. نتایج اکوکاردیوگرافی بر روی اعضای خانواده نشان داد که یک برادر دیگر پروباند مبتلا به بیماری بوده و فاقد واریانت کاندید بود. بررسی واریانت در یک جمعیت ۲۰۰ نفری سالم، عدم وجود واریانت را نشان داد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی بیماری‌زا بودن واریانت را نشان دادند.

نتیجه‌گیری. با وجود اینکه همه مطالعات اولیه واریانت کاندید، نشان از عامل ایجاد بیماری بودند، اما مطالعات بعدی بر روی افراد بیشتر خانواده، عامل بودن آن به تنهایی در این خانواده را رد کردند و از این نتایج می‌توان نتیجه گرفت آنالیز نتایج حاصل از توالی‌یابی اگزوم نیاز به‌دقت عمل و مطالعه بیشتر در شجره‌نامه‌هایی با تعداد افراد مبتلای بیشتر و مطالعات عملکردی برای اثبات بیماری‌زا بودن واریانت دارند.

مقدمه

کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک یک اختلال اولیه میوکارد است که معمولاً با هایپرتروفی بطن چپ همراه با عدم اتساع یا حتی کوچک شدن اندازه حفره بطن چپ و فقدان علت واضحی بر هایپرتروفی مشخص می‌شود.[۱] مهم‌ترین مشخصه کلینیکی این بیماری وجود هایپرتروفی در بطن چپ خصوصاً ضخیم‌شدگی ≥۱۳mm سپتوم بطنی پایان دیاستولی در افراد بالغ است که در صورت عدم وجود سایر ناهنجاری‌های منجر شونده به هایپرتروفی همانند فشارخون بالا، تنگی آئورت، هایپرتروفی فیزیولوژیک در افراد ورزشکار یا عوامل و شرایط فنوکپی اتفاق می‌افتد. با وجود اینکه درجه ضخیم‌شدگی ۱۳mm در افراد بالغ یک معیار تشخیصی با حساسیت بالا را مطرح می‌کند ولی ریسک تشخیص اشتباه با بیماری‌های مشابه همچنان محتمل است، به همین خاطر گروه قلب و عروق اروپا (ESC) درجه ضخیم‌شدگی بالای ۱۵ mm را به‌عنوان معیار قرار دادند.[۲] از دیگر مشخصه‌های پاتولوژیک می‌توان به هایپرتروفی میوسیت‌های قلبی، آرایش نامنظم

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: mtoufan@gmail.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

میوفیبریل‌ها، فیبروز بینابینی و ضخیم شدن عروق کرونر انترمیوکاردی اشاره کرد.[۳] بسیاری از بیماران مبتلابه HCM ممکن است سال‌ها علائم خاصی را به دلیل پیشرفت کند بیماری نشان ندهند. این افراد مثل سایر افراد جمعیت زندگی عادی داشته ولی حدود ۲۵ درصد ممکن است علائم جزئی از بیماری ازجمله درد قفسه سینه، تنگی نفس و خستگی، سنکوپ را نشان دهند و یا دچار SCD شوند.[۴] HCM عموماً به‌عنوان یک بیماری وراثتی (وراثت مندلی) با شیوه وراثتی اتوزومال غالب شناخته می‌شود که بالای ۶۰ درصد بیماران خصوصاً افراد بالغ به دلیل جهش‌ها و تغییرات برخی ژن‌ها و پروتئین‌های ماهیچه قلب بروز می‌کند.[۲،۵،۶] شیوه‌های وراثتی اتوزمال مغلوب و وابسته به X هم تاکنون برای این بیماری گزارش شده ولی بسیار نادر است.[۷،۸] حدود ۵ تا ۱۰ درصد بیماران به دلیل ابتلا به دیگر بیماری‌های ژنتیکی (همچون بیماری‌های وراثتی متابولیک و عصبی-ماهیچه ای)، ناهنجاری‌های کروموزومی و دیگر سندرم‌های ژنتیکی علائم HCM را از خود نشان می‌دهند.[۹] بیماران دیگری هم هستند که علت HCM آن‌ها بیماری‌های غیر ژنتیکی مثل آمیلوئیدوز ترنس ترتین (TTR) وابسته به سن و آمیلوئیدوز AL است ولی حالت ژنتیکی HCM را از خود نشان می‌دهند.[۱۰] این بیماری همچنین تحت تأثیر عواملی مختلفی از جمله فاکتورهای محیطی استرس‌زا (چون فشارخون بالا، پیری، جنسیت، مصرف الکل و سبک زندگی)، ژن‌های تعدیل‌کننده (مثل جهش‌های سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدسترون (همانند جهش ژن کد کننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE))) و بیماری‌هایی چون دیابت و مشکلات تیروئیدی علائم پیشرونده ای را از خود نشان می‌دهد.[۱۱، ۱۲] تقریباً ۶۰ درصد افراد بالغ مبتلابه HCM سابقه خانوادگی داشته و مابقی تک‌گیر بوده و به دلیل دیگر عوامل ذکر شده در بالا ایجاد می‌شود. این بیماری به‌عنوان یک بیماری هتروژن شناخته می‌شود که جهش در ژن‌های متعدد ماهیچه قلب همچون ژن‌های سارکومری، ژن‌های مرتبط با سیگنالینگ کلسیم، ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسم سوبسترا – انرژی و نهایتاً ژن‌های حد واسط بین این مسیرها در بروز این بیماری نقش بسزایی دارند.[۸،۱۳] تاکنون بیش از هزار جهش در ژن‌های مرتبط با این بیماری مورد شناسایی قرار گرفته است که اکثر این جهش‌ها (بالای ۹۰ درصد)، جهش‌های بد معنی بوده و باعث تغییر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و نهایتاً ایجاد ویژگی‌ها مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی معمول در HCM می‌شوند.[۱۴، ۱۵] اکثر جهش‌های وابسته به HCM در بین خانواده‌ها محدود بوده و فراوانی کمتری داشته ولی برخی دیگر با فراوانی بالا در سطح جمعیت‌های مختلف بروز می‌کنند که مهم‌ترین ژن‌های حاوی این جهش‌ها شامل زنجیره سنگین میوزین قلبی (MYH7) و پروتئین متصل شونده به میوزین قلبی نوع C (MYBPC3) است که در ۷۵ تا ۸۰ درصد موارد HCM مشاهده شده است. جهش‌های تروپونین T قلبی (TNNT2)، تریونین I (TNNI3)، آلفا تریومیوزین (TPM1)، زنجیره‌های سبک میوزین (MYL2 و MYL3) و اکتین قلبی (ACTC1) ۱۵ تا ۲۰ درصد جهش‌های سارکومری را به خود اختصاص می‌دهند. جهش دیگر ژن‌های سارکومری یا وابسته به سارکومر همچون زنجیره سنگین آلفا میوزین (MYH6)، تیتین (TTN)، ژن‌های پروتئین دیسک Z همانند پروتئین ماهیچه‌ای LIM (CSRP3) یا ژن‌های مربوط به فرآیند کلسیم مثل فسفولمبان (PLN) تقریباً کمتر از یک درصد موارد را شامل می‌شوند (شکل ۹). تاریخچه خانوادگی اطلاعات مهمی در تشخیص بیماران مبتلا به HCM فراهم می‌کند به‌خصوص در خانواده‌هایی که سابقه ابتلا به بیماری‌های قلبی–عروقی در سنین جوانی یا پایین‌تر داشته‌اند.[۱۶] آنالیز این فاکتور شامل بررسی ۳ یا ۴ نسل در شجره افراد بیمار برای پیدا کردن پایه ژنتیکی، الگوی توارثی و شناسایی افراد در معرض ابتلا به بیماری است. در این آنالیز توجه به بروز بیماری، سن شروع بیماری، SCD، نارسایی قلبی، پیوند قلب و سکته امری حیاتی است.[۱۷] در این مطالعه بر آن شدیم با استفاده از روش توالی‌یابی اگزوم کامل در یک خانواده مبتلا به HCM با ۳ فرد مبتلا به بررسی عامل ژنتیکی بیماری در این خانواده بپردازیم.

روش کار

در این مطالعه که یک مطالعه توصیفی است، پس از معرفی پروباند مبتلا به HCM توسط کاردیولوژیست، پس از مشاوره ژنتیکی، شجره‌نامه رسم گردید (شکل ۱). سپس از دیگر افراد مبتلا و غیر مبتلای خانواده که حاضر به همکاری بودند دعوت به همکاری گردید. فرم رضایت‌نامه مطابق با مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس تکمیل شد. پروباند (III-5) یک خانم باردار ۲۵ ساله از شهرستان عجب‌شیر استان آذربایجان‌شرقی بود که در هفته ۷ بارداری به دلیل مشکل قلبی برای اکوکاردیوگرافی ارجاع داده شد. اکوکاردیوگرافی ابتلا به بیماری HCM (Reverse Curvature type) را نشان داد. ضخامت قابل‌توجه دیواره به وسیله‌ی گرادیانت

بیش از ۱۰۰ میلی‌متر جیوه در LVOT در زمان استراحت تائید شد. پس از مشاوره ژنتیک و رسم شجره مشخص شد که پدر (II-2) و عمه پروباند (II-4) دارای بیماری قلبی بوده و به ترتیب در سن ۵۵ و ۵۸ سالگی به‌طور ناگهانی فوت کرده بود. عمه دیگر پروباند (II-3) نیز مبتلا به بیماری HCM بود. در زمان انجام مشاوره ژنتیکی ۲ خواهر و دو برادر از نظر ظاهری سالم بودند و به‌عنوان افراد سالم خانواده در نظر گرفته شدند. افراد مبتلا فاقد سایر اختلالاتی مانند دیابت، فشارخون و ... که می‌توانند موجب هایپرتروفی قلب شوند بودند.

نمونه‌گیری و استخراج DNA

نمونه خون افراد مبتلا و سایر اعضای خانواده که حاضر به همکاری در مطالعه بودند، در لوله‌های نمونه‌گیری حاوی EDTA جمع‌آوری و استخراج DNA به روش Salting out انجام شد و DNA پروباند، عمه پروباند به عنوان افراد مبتلا و یکی از برادران پروباند (III-2) به عنوان فرد سالم برای توالی‌یابی اگزوم ارسال شدند.

تعیین توالی اگزوم کامل و آنالیز داده‌ها

این تکنیک با استفاده از ۳ میکروگرم DNA و Exome Enrichment Kit با استفاده از پروب‌های Agilent's SureSelect Human All Exon V6 capture probes و پلات فرم Illumina HiSeq 4000 با متوسط عمق خوانش x۱۰۰ انجام گردید و سپس نتایج حاصل از آن‌ها آنالیز شدند.

داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی اگزوم به ترتیب ذیل مورد آنالیز و دسته‌بندی قرار گرفت:

۱. ابتدا به وسیله نرم‌افزار FASTQC کنترل کیفی روی‌داده صورت گرفت. با استفاده از FastQ Screen نمونه مورد نظر از بابت آلودگی نمونه DNA مورد بررسی قرار گرفت.

۲. با استفاده از Trimmomatic بر روی داده‌ها فیلتر انجام شد.

۳. خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bowtie2، با توالی ژنومی مرجع Human GRCh37/hg19 هم ردیف شدند.

۴. در ادامه پردازش بیشتر از طریق بهترین روش مجموعه GATK، از جمله نشان‌دار کردن مضاعف شده‌ها با مجموعه نرم‌افزار picard انجام گرفت.

۵. واریانت‌های تک نوکلئوتیدی (SNVs) و ایندل‌ها با استفاده از Caller GATK Haplotype تعیین و شناسایی شدند.

۶. واریانت‌های مثبت کاذب با استفاده از GATK Variant Filtration حذف شدند.

۷. با استفاده از نرم‌افزار ANNOVAR واریانت‌ها تفسیر شدند.

اولویت‌بندی داده‌های خام حاصل از WES:

جهت شناسایی ژن کاندید عامل بیماری بایستی اولویت بندی دقیق و قدرتمندی روی داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی کامل اگزوم صورت گیرد. بر این اساس پس از فیلترینگ‌های روتین آنالیز داده‌های خام توالی‌یابی کامل اگزوم، از یک رویکرد برای اولویت‌بندی داده‌های خام باقیمانده بهره گرفته شد که شامل مراحل زیر بودند:

۱. واریانت‌ها بر اساس الگوی توارث اتوزومی غالب اولویت‌بندی شدند.

۲. واریانت‌های مشترک ژنوم دو فرد مبتلا (عدم وجود آن در فرد سالم) حفظ شدند و دیگر واریانت‌ها حذف شدند.

۳. واریانت‌های یافت شده در نواحی اینترونی، فرادست و فرودست، بین ژنی، UTR، ۵ و ۳، واریانت‌های هم‌معنی با این پیش‌فرض که تأثیر احتمالی کمتری در پاتوژنز بیماری دارند خارج شدند. فیلتر کردن واریانت‌ها بر اساس میزان فراوانی آللی آن‌ها در پایگاه داده ۱۰۰۰ ژنوم و ExAC انجام شد. واریانت‌هایی که فراوانی آللی بالاتر از ۱ درصد داشتند از لیست واریانت‌ها حذف شدند. در مرحله‌ی بعد پاتوژنیک بودن واریانت‌ها بر اساس معیارهای بیوانفورماتیک فانکشنال و حفاظت‌شدگی بین سایر گونه‌ها تعیین شده و بر این اساس اولویت‌بندی شده‌اند. این معیارها با استفاده از آنالیزهای نرم‌افزاری Polyphen2 Sift, Mutation Taster , Fathmm Cadd_Phred, Gerp و ... انجام شده است.

۴. واریانت‌هایی که در دیتا بیس‌هایی نظیر DECIPHER، HGMD و Clinvar پاتوژنیک مطرح شده‌اند و با بیماری‌های قلبی-عروقی مرتبط بودند در اولویت قرار گرفته‌اند.

۵. در نهایت با توجه به شیوه‌ی وراثت بیماری در خانواده وضعیت زایگوسیتی واریانت در نظر گرفته شد و واریانت‌هایی که مربوط به ژن‌های دخیل در ساختار عضله قلب انتخاب شدند. این واریانت‌ها بر اساس پایگاه‌های اطلاعاتی UCSC, Gene Card, Ensemble GRCh 36, OMIM مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

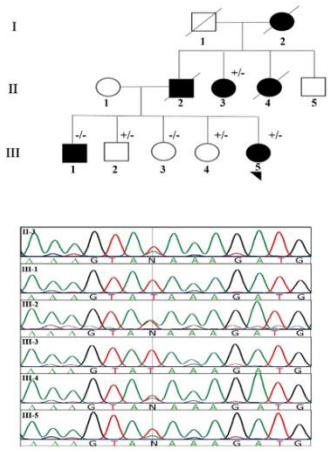
اعتبارسنجی واریانت‌های کاندید در اعضای خانواده

تأیید واریانت‌ها در اعضای خانواده (افراد مبتلا و سالم) به روش توالی‌یابی سنگر انجام شد. چون واریانت کاندید به صورت جدید بوده و در هیچ‌یک از پایگاه‌های داده ClinVar،

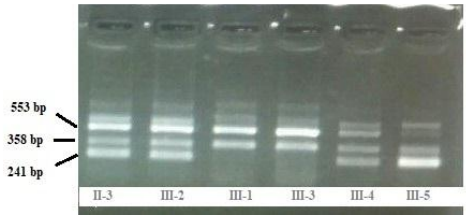
Exac، gnomAD و Iranome گزارش نشده بودند مطالعه جمعیتی برای بررسی این کاندید بر روی ۲۰۰ فرد سالم از نظر فنوتیپ (بیماری قلبی-عروقی) از منطقه شمال غرب ایران، با استفاده از روشTetra-ARMS انجام گرفت. طراحی پرایمر برای بررسی با این روش با استفاده از نرم‌افزار Primer1 (http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html) انجام گرفت.

آنالیز بیوانفورماتیکی

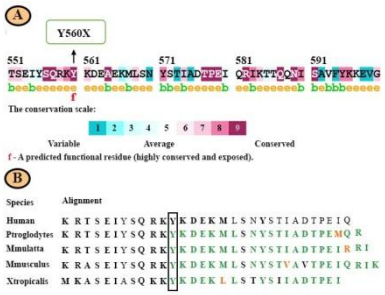
با استفاده از ابزارهای In silico، آنالیز بیوانفورماتیکی بیماری‌زایی بیماری مورد بررسی قرار گرفته و ساختار دوم پروتئین مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱: شجره‌نامه خانوادگی و نتایج حاصل از توالی‌یابی اگزوم کامل: شجره‌نامه مبتلا بودن سه فرد زنده در خانواده را نشان می‌دهد. اشکال توپر افراد مبتلا و اشکال توخالی افراد سالم را نشان می‌دهند. علامت +/- افراد هتروزیگوت و علامت -/- افراد فاقد جهش را نشان می‌دهند.



شکل ۲: عکس الکتروفورز ژل حاصل از نتایج Tetra-ARMS برای بررسی جهش p.Y560* در ژن NEBL- افراد هتروزیگوت برای جهش هر سه باند را نشان می‌دهند(II-3، III-2، III-4 و III-5). افراد فاقد جهش دو باند را نشان می‌دهند (III-1 و III-3).



شکل ۳: اسیدآمینه تیروزین در موقعیت ۵۶۰ پروتئین کد شده توسط ژن NEBL یک اسیدآمینه بسیار حفاظت شده می‌باشد که در بین گونه‌های مختلف وجود دارد.

جدول ۱: پرایمرها و اندازه محصولات PCR

پرایمرها		5’…3’	اندازه محصول PCR
توالی‌یابی سنگر	NEBL-F	GGTATCATTCTATCTCTGTCTCTCC	368 bp
	NEBL-R	GAAAACATCAGACAATGAGGAA	
Tetra-ARMS	NEBL-F-Cotrol	CTCATAGTAGCTCATTTAGTGGA	553 bp
	NEBL-R-Control	ATACACTTGACAGAAAATTCAAC	
	NEBL-R-T-mutant	CATCTTCTCTGCTTCATCTGTA	358 bp
	NEBL-F-A-Normal	GTTTATGTTTTTAGAGAAAGCAA	241 bp

جدول ۲: نتایج اکوکاردیوگرافی و بررسی ژنتیکی اعضای خانواده

شماره شجره‌نامه	سن	جنس	یافته‌های اکوکاردیوگرافی						ژنوتیپ *NEBL c.T1680A*
			ST (cm)	PWT (cm)	Maximum wall thickness(mm)	LVED D	LVES D	LV EF (%)	
II-3	۵۸	زن							TA
III-1	۳۷	مرد	۳/۵	۱/۲	۳۹	٤/۱	۲/۳	۵۰	TT
III-2	۳۲	مرد	۱/۲	۱	۱۲	٤/۸	۳	۵۵	TA
III-3	۳۵	زن	۰/٦	۱	۱۰	٤/۷	۲/۵	٦۰	TT
III-4	۳۰	زن	۱/۱	۱/۱	۱۱	۳/۸	۳	۵۵	TA
III-5	۲۷	زن	۱/۹	۱/٤	۱۹	۳/٤	۱/۷	٦۵	TA

علائم اختصاری

F: Female; M: Male; MVT: Maximum wall thickness; ST: Septal thickness; PWT:Posterior wall thickness; LVEDD: Left ventricular end diastolic diameter; LVESD: Left ventricular end systolic diameter; LVEF: Left ventricular ejection fraction

یافته‌ها

پس از فیلتر کردن واریانت‌ها برطبق مراحلی که در بالا ذکر گردید، واریانت c. T1680A در اگزون ۱۷ ژن NEBL در افراد بیمار مشاهده شد که در فرد سالم خانواده وجود نداشت و وجود این واریانت در این افراد با استفاده از توالی‌یابی سنگر (پرایمرهای آن در جدول ۱ آورده شده است) مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز این واریانت بر روی دیگر خواهر-برادرهای پروباند انجام گرفت و وجود جهش در یک برادر (III-2) و یک خواهر (III-4) نیز مشاهده شد (شکل ۱). اکوکاردیوگرافی بر روی سایر خواهر-برادرهای پروباند نیز انجام شد. نتایج اکوکاردیوگرافی کل افراد مطالعه شده در جدول ۲ آورده شده است. نتیجه اکوکاردیوگرافی وجود بیماری HCM را در یکی از برادران پروباند (III-1) نشان داد که فاقد جهش مورد نظر بود. سایر خواهر-برادرهای پروباند فاقد بیماری HCM بودند.

مطالعه انجام شده با استفاده از روش Tetra-ARMS بر روی ۲۰۰ فرد سالم، عدم وجود این جهش را نشان داد. پرایمرها و اندازه محصولات PCR در جدول ۱ و عکس ژل الکتروفورز آن در شکل ۲ آورده شده است.

بحث

هایپرتروفی بطن چپ یا HCM به‌عنوان یک ناهنجاری قلبی با ویژگی کلینیکی غالب یعنی ضخیم‌شدگی میوکارد در صورت عدم وجود دلیل مشخص دیگری بر هایپرتروفی بطن چپ مثل بیماری‌های سیستمیک و سایر ناهنجاری‌های درگیر کننده قلب تعریف می‌شود.[۱۸] از آنجایی‌که بروز این علائم در افراد مبتلا متغیر بوده و در مواردی بدون علامت است بیمار قبل از تشخیص دچار مرگ ناگهانی یا SCD می‌شود. بروز SCD در بین افراد بالغ، خصوصاً بیمارانی که در ورزش‌های رقابتی فعالیت می‌کنند بسیار شایع بود و باعث شده اهمیت تشخیص HCM دو چندان شود.[۱۹،۳] شیوع این بیماری در کل جمعیت به حدود ۲ درصد یعنی ۱ در ۵۰۰ نفر تخمین زده می‌شود و تقریباً در تمام نقاط جهان گزارش شده است. نرخ مرگ و میر کلی این بیماری حدوداً ۱درصد بوده که نسبتاً در نوجوانان و افراد مسن بیشتر است. البته لازم به ذکر است که ارزیابی شیوع HCM در کل جمعیت نسبت دقیقی را معین نمی‌کند چراکه اکثر افراد مبتلا بدون بروز علائمی به زندگی خود ادامه داده و در محاسبات نرخ اپیدمیولوژی این بیماری

وارد نمی‌شوند. بنابراین مجموعه کوچکی از افراد بیمار در این نرخ وارد و محاسبه می‌شوند و این بیماران هم عمدتاً با تشخیص تصادفی در طول ارزیابی‌های روتین کلینیکی یا غربالگری‌های خانواده‌ها با الکتروکاریوگرافی و تصویربرداری‌های پیشرفته چون اکوکاردیوگرافی، MRI قلبی و ... شناسایی شده‌اند.[۲۰،۲۱] همانند علائم کلینیکی، ازنظر ژنتیکی نیز به‌عنوان یک بیماری هتروژن با تنوع لوکوسی و اللی بالا، شناخته می‌شود.[۱۳] تاکنون بیش از ۱۵۰۰ جهش عمدتاً در ژن‌های سارکومری وابسته به HCM گزارش شده است که بالای ۹۰ درصد جهش‌ها بد معنی بوده و منجر به تغییر ساختار و عملکرد پروتئین‌های مربوطه و نهایتاً ویژگی‌های مرفولوژیکی معمول در HCM می‌شوند. از این بین جهش ژن‌های MYH7 و MYBPC3 بالای ۷۰ درصد موارد و TNNT2، TNNI3، TPM1، MYL2، MYL3 و ACTC1 حدوداً ۲۰ درصد جهش‌های سارکومری را به خود اختصاص می‌دهند. جهش در دیگر ژن‌های سارکومری، وابسته به سارکومر و غیر سارکومری همچون MYH6، TTN، CSRP3 و PLN نادرتر است و کمتر از ۱ درصد موارد را شامل می‌شوند.[۱۸،۲۲-۲۴] به دلیل اینکه بررسی ژنتیکی این بیماری نیاز به مطالعه ژن‌های زیادی دارد، درگذشته مطالعه ژنتیکی این بیماری بسیار مشکل بوده است؛ اما امروزه، با پیشرفت در حوزه توالی‌یابی های نسل جدید، امکان بررسی این بیماری نسبت به گذشته تسهیل شده است. از آنجایی‌که HCM به‌عنوان شایع‌ترین عامل مرگ و میر قلبی در بین نوجوانان و بزرگسالان کمتر از ۳۵ سال معرفی شده و با توجه به خصوصیات این بیماری مخصوصاً در بیمارانی که علائم خاصی را نشان نمی‌دهند، بررسی علل ژنتیکی این بیماری در افراد مبتلا با علائم و غربالگری خویشاوندان این بیماران کمک شایانی در پیش‌بینی و کنترل این بیماری دارد. از طرف دیگر علی‌رغم پیشرفت‌های بسیار زیاد در شناسایی روش‌های درمانی برای این بیماری، امروزه این موارد صرفاً در جهت تخفیف علائم بوده، بنابراین تشخیص و پیش‌بینی زود هنگام بیماری لازم‌الاجرا است. خانواده مورد مطالعه شامل خانواده ۱۲ نفری بودند که ۳ نفر از اعضای آن به دلیل بیماری‌های قلبی و عرقی فوت شده بودند. پروباند (III-5) خانمی ۲۷ ساله بود که یکی از برادران (III-1) و عمه ایشان (II-3) مبتلا به HCM بودند ولی سایر اعضاء فنوتیپ سالم را نشان می‌دادند. در بررسی پروباند جهش c.T1680A در اگزون ۱۷ ژن NEBL که کد کننده پروتئینی به نام نبولت است، یافت شد. این پروتئین به خانواده پروتئینی نبولین تعلق دارد که شامل پروتئین‌های نبولین، N-RAP، Lasp-1 و Lasp-2 است که نقش ویژه‌ای در فرآیندهای مهمی چون میوفیبریل زایی، پایداری دیسک Z و انواع مختلف اسکلت سلولی دارند. مشخصه ویژه این خانواده پروتئینی شامل حضور تکرارهای نبولین می‌باشد که نواحی ۳۵ آمینواسیدی با موتیف SDxxYK حفاظت شده هستند و نقش به سزایی در تجمع ترپونین و ترپومیوزین‌ها دارند.[۲۵] نبولت تنها پروتئین این خانواده است که منحصراً در سلول‌های عضله قلب بیان می‌شود. این پروتئین با وزن مولکولی ۱۰۹ kDa دارای موتیف های اختصاصی شامل مناطق اسیدی (ناحیه غنی از گلوتامات) در قسمت N ترمینال، ۲۳ عدد تکرار نبولین، دمین لینکر غنی از سرین که در قسمت C ترمینال سایت‌های فسفوریلاسیون و دمین SH3 (همولوگ ۳ src) را در بر می گیرد، است.[۲۶] هر یک از تکرارهای نبولین به یک مونومر اکتین متصل شده و دمین SH3 به ناحیه غنی از پرولین دیگر پروتئین‌ها متصل می‌شود. این پروتئین‌ها شامل میوپالادین (یک پروتئین تنظیمی و ساختاری که مختص ماهیچه‌های رشته‌ای است که با پروتئین کراس-لینک اکتین (آلفا اکتینین) و یک پروتئین در نوار I برهم‌کنش دارد)، پالادین (یکی از همولوگ‌های میوپالادین بوده که در همه‌جا بیان داشته و با آلفا اکتینین و F اکتین متصل شده و در سازمان‌دهی اکتین اسکلت سلولی، شکل سلول، چسبندگی و اتصال سلول به سلول نقش دارد)، زیکسین (یک فسفو پروتئین متصل شونده به روی است که به در ساختارهای وابسته به اکتین و چسبندگی‌های کانونی مربوط بوده و نقش بسزایی در سازمان‌دهی اسکلت سلولی دارد)، نواحی Zis1 و PEVK تیتین (یک پروتئین بزرگ که از دیسک Z تا نوار M امتداد دارد)، Xin و XIRP2 (اعضای خانواده Xin متصل شونده به تکرار اکتین و دارای XIRP که به‌صورت موقت و گذرا در زمان بازسازی و رشد متصل می‌شوند)، N-WASP/WASL یا پروتئین نورونی سندرم ویسکوت-الدریچ (نقش پلیمریزه شدن اکتین را بر عهده دارد). تکرارهای نبولینی و دمین SH3 همچنین به آلفا اکتینین در دیسک Z با پیوستگی بالا متصل می‌شوند.[۲۷] وجود برهم‌کنش با پروتئین‌های متعدد حاکی از نقش مهم نبولت در سلول‌ها داشته و گویای این است که جهش‌های پاتوژن این ژن احتمالاً در بروز بیماری‌های قلبی نقش داشته باشد. برای اولین بار جهش N654K در موتیف اتصال شونده به اکتین در ۱۸مین تکرار نبولین ارتباط نبولت را با بیماری قلبی آشکار کرد.[۲۸] سپس دیگر جهش‌ها هتروزیگوت همچون K60N،

Q128R، G202R، A592E که به ترتیب در ناحیه تکرارهای نبولین ۱، ۳، ۵ و ۱۶ قرار دارند، در بیماران DCM شناسایی شدند.[۲۹] اکثر مطالعات نشان دادند که جهش‌های نبولت بیشتر منجر به DCM نسبت به HCM می‌شوند. تا به حال حدود ۵ جهش در ژن NEBL در بررسی بیماران HCM شناسایی شدند که سه جهش در ClinVar گزارش شده و دوتای دیگر به‌صورت مطالعه موردی شناسایی شدند. مشابه مطالعات قبلی جهش یافت شده در مطالعه حاضر، جهش بی‌معنی p.Y560* در موتیف متصل شونده به اکتین در ۱۵مین تکرار نبولین در پروباند است که افراد مبتلا برای جهش مذکور هتروزیگوت بود. تیروزین موقعیت ۵۶۰ در این پروتئین یک اسیدآمینه به شدت حفاظت شده در بین گونه های مختلف است (شکل ۳). مطالعات بیوانفورماتیکی با mutation taster، SIFT و Polyphen و سایر ابزارها برای این جهش، بیماری‌زا بودن را تائید کرد. به نظر می‌رسد حذف دمین‌های و تکرارهای نبولین بعد از تکرار ۱۵ شامل تکرار ۱۵ تا ۲۳، دمین لینکر و دمین SH3 منجر به بروز بیماری می‌شوند. چرا که گزارش‌هایی از تأثیر حذف دمین SH3 بر موقعیت‌یابی این پروتئین و پروتئین‌های متصل شونده به دمین مذکور در دیسک Z دارد. مطالعه آزمایشگاهی با جهش‌های Q128ER و A592E در ناحیه تکرارهای نبولینی، در سلول‌های قلبی H9C2 منجر به پراکندگی این پروتئین در سلول شد که نشان دهنده نقش این پروتئین در مکانو-سنس است. موش‌های تراریخت با جهش‌های G202R و A592E افزایش اتساع قلبی، ناهنجاری‌های میتوکندریایی و اختلال عملکرد سیستولی در ۶ ماهگی نشان دادند. در سطح مولکولی، کاهش تنظیم پروتئین‌های دیسک Z همانند میوپالادین، آلفا اکتینین، ALP و Cypher/ZASP در سلول‌های عضله قلب موش ۶ ماهه با جهش A592E شناسایی شد. جهش A592E در موش سه ماه سبب کاهش تنظیم دسمین و لاترالیزاسیون کانکسین شد. تمامی این گزارش‌ها حاکی از نقش ویژه جهش‌های نبولت در بروز بیماری‌های قلبی همچون DCM و HCM است.[۲۹] اما نتایج حاصل از آنالیز co-segregation، از پاتوژن بودن p.Y560* حمایت نکرد چرا که فرد III-1 مبتلا به HCM، فاقد جهش بودند. همچنین III-2 و III-4 بدون سابقه بیماری‌های قلبی، نسبت به جهش یافت شده هتروزیگوت بودند. نتیجه حاصل از این مطالعه می‌تواند ناشی از دو عامل باشد: ۱- وجود یک واریانت دیگر که همراه با واریانت p.Y560*، می‌تواند عامل ایجاد این بیماری در خانواده مورد بررسی باشد ۲- یک واریانت دیگری عامل ایجاد بیماری باشد که در این صورت نیاز به آنالیز دوباره نتایج حاصل از توالی‌یابی اگزوم کامل دارد.

نتیجه‌گیری

در آخر، با وجود پیش‌بینی جهش به عنوان پاتوژن و تائید آن در دو فرد مبتلای خانواده در ابتدای مطالعه، این واریانت به عنوان کاندید عامل ایجاد بیماری به تنهایی مورد تائید قرار نگرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که بدون بررسی یک واریانت در تعداد بیشتر خویشاوندان یک پروباند و حتی در جمعیت بزرگ، تصمیم‌گیری در مورد بیماری‌زایی هر تغییر نوکلئوتیدی دشوار و نیازمند بررسی‌های بیشتر است و این نتایج می‌تواند اثبات کند در مواردی که برای بررسی عامل ژنتیکی یک بیماری، فقط یک فرد مبتلا با استفاده از توالی‌یابی‌های نسل جدید مورد مطالعه قرار گرفته و قبلاً گزارش شده‌اند، حتی با وجود این ژن کاندید قبلاً به عنوان عامل بیماری گزارش شده باشد، تصمیم‌گیری در مورد بیماری‌زا بودن آن، نیاز به مطالعات بیشتر عملکردی دارد.

قدردانی

نویسندگان از همه اعضای خانواده شرکت‌کننده در این مطالعه و همچنین از آزمایشگاه بیمارستان بهبود تبریز جهت همکاری در بخش نمونه‌گیری از بیماران قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه تربیت مدرس استان تهران به شماره مرجع IR.TMU.REC.1396.616 به تائید رسیده است.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی توسط دانشگاه تربیت مدرس تهران صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تألیف و یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

ل-ا. طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. همچنین مقاله را تألیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تائید کرده است.

م- ط. طراحی، اجرا و معرفی بیمار و معاینات بالینی اعضای خانواده را بر عهده داشت. همچنین مقاله را تألیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تائید کرده است.

References

1. Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. British Heart Journal. 1958;20(1):1. doi: 10.1136/hrt.20.1.1
2. Members ATF, Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Et Al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). European Heart Journal. 2014;35(39):2733-79. doi: 10.1093/eurheartj/ehu 284
3. Albakri A. Restrictive cardiomyopathy: a review of literature on clinical status and meta-analysis of diagnosis and clinical management methods table of contents. Int Med Care. 2018;2(1):1-15. doi: 10.15761/IMC.1000116
4. McKenna W, Deanfield J. Hypertrophic cardiomyopathy: an important cause of sudden death. Archives of Disease in Childhood. 1984;59(10):971-5. doi: 10.1136/adc.59.10.971
5. Lopes LR, Zekavati A, Syrris P, Hubank M, Giambartolomei C, Dalageorgou C, et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. Journal of Medical Genetics. 2013;50(4):228-39. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101270
6. Kassem HS, Azer RS, Ayad MS, Moharem-Elgamal S, Magdy G, Elguindy A, et al. Early results of sarcomeric gene screening from the Egyptian National BA-HCM Program. Journal of cardiovascular translational research. 2013;6(1):65-80. doi: 10.1007/s12265-012-9425-0
7. Hartmannova H, Kubanek M, Sramko M, Piherova L, Noskova L, Hodanova K, et al. Isolated X-linked hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel mutation of the four-and-a-half LIM domain 1 gene. Circulation: Cardiovascular Genetics. 2013;6(6):543-51. doi: 10.1161/circgenetics.113.000245
8. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. Circulation research. 2017;121(7):749-70. doi: 10.1161/circresaha.117.311059
9. Coats CJ, Elliott PM. Genetic biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy. Biomarkers in medicine. 2013;7(4):505-16. doi: 10.2217/bmm.13.79
10. Rapezzi C, Merlini G, Quarta CC, Riva L, Longhi S, Leone O, et al. Systemic cardiac amyloidoses: disease profiles and clinical courses of the 3 main types. Circulation. 2009;120(13):1203-12. doi: 10.1161/circulationaha.108.843334
11. Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. Nature Reviews Cardiology. 2012;9(2):91. doi: 10.1038/nrcardio.2011.159
12. Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, Tierney DM, Mueller FO. Sudden deaths in young competitive athletes. Circulation. 2009;119(8):1085-92. doi: 10.1161/circulationaha.108.804617
13. Xu J, Li Z, Ren X, Dong M, Li J, Shi X, et al. Investigation of pathogenic genes in Chinese sporadic hypertrophic cardiomyopathy patients by whole exome sequencing. Scientific Reports. 2015;5:16609. doi: 10.1038/srep16609
14. Keren A, Syrris P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. Nature Reviews Cardiology. 2008;5(3):158. doi: 10.1038/ncpcardio1110
15. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. Journal of the American College of Cardiology. 2012;60(8):705-15. doi: 10.1016/j.jacc.2012.02.068
16. Wigle ED. The diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. Heart. 2001;86(6):709-14. doi: 10.1136/heart.86.6.709
17. Di Toro A, Giuliani L, Favalli V, Di Giovannantonio M, Smirnova A, Grasso M, et al. Genetics and clinics: current applications, limitations, and future developments. European Heart Journal Supplements. 2019;21(Supplement_B):B7-B14. doi: 10.1093/eurheartj/suz048

18. Maron BJ, Ommen SR, Semsarian C, Spirito P, Olivotto I, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy: present and future, with translation into contemporary cardiovascular medicine. Journal of the American College of Cardiology. 2014;64(1):83-99. doi: 10.1016/j.jacc.2014.05.003
19. Enriquez AD, Goldman ME. Management of hypertrophic cardiomyopathy. Annals of Global Health. 2014;80(1):35-45. doi: 10.1016/j.aogh.2013.12.004
20. McKenna WJ, Sen-Chowdhry S. From Teare to the present day: a fifty year odyssey in hypertrophic cardiomyopathy, a paradigm for the logic of the discovery process. Revista Espanola De Cardiologia. 2008;61(12):1239-44. doi: 10.1016/s1885-5857(09)60050-5
21. Houston BA, Stevens GR. Hypertrophic cardiomyopathy: a review. Clinical Medicine Insights: Cardiology. 2014;8:CMC. S15717. doi: 10.4137/CMC.S15 717
22. Santos SR, Freitas A, Fernandes A. Overview of Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM) genomics and transcriptomics: molecular tools in HCM assessment for application in clinical medicine. Cardiovascular Disease. 2014. doi: 10.2147/TACG.S49126
23. Van Driest SL, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ, editors. Yield of genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy. Mayo Clinic Proceedings; 2005: Elsevier. doi: 10.1016/s0025-6196(11)61527-9
24. Millat G, Bouvagnet P, Chevalier P, Dauphin C, Jouk PS, Da Costa A, et al. Prevalence and spectrum of mutations in a cohort of 192 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. European Journal of Medical Genetics. 2010;53(5):261-7.doi: 10.1016/j.ejmg.2010.07.007
25. Wallgren-Pettersson C, Donner K, Sewry C, Bijlsma E, Lammens M, Bushby K, et al. Mutations in the nebulin gene can cause severe congenital nemaline myopathy. Neuromuscular Disorders. 2002;12(7-8):674-9. doi: 10.1016/s0960-8966(02)00065-2
26. Holmes WB, Moncman CL. Nebulette interacts with filamin C. Cell Motility and the Cytoskeleton. 2008;65(2):130-42. doi: 10.1002/cm.20249
27. Bang M-L, Chen J. Roles of nebulin family members in the heart. Circulation Journal. 2015:CJ-15-0854. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0854
28. Arimura T, Nakamura T, Hiroi S, Satoh M, Takahashi M, Ohbuchi N, et al. Characterization of the human nebulette gene: a polymorphism in an actin-binding motif is associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy. Human Genetics. 2000;107(5):440-51. doi: 10.1007/s004390000389
29. Purevjav E, Varela J, Morgado M, Kearney DL, Li H, Taylor MD, et al. Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. Journal of the American College of Cardiology. 2010;56(18):1493-502. doi: 10.1016/j.jacc.2010.05.045