

Влияние вариантов с.1977G>A в гене MYH7 и с.1543_1545delAAC в гене MYBPC3 на развитие гипертрофической кардиомиопатии

Шульгина А.*, Павлова С., Проняева К., Закиян С., Дементьева Е.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* *ange.shulgina@yandex.ru*

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия; генетический вариант с неясным клиническим значением; CRISPR/Cas9; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; кардиомиоцит

Мотивация и цель: Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – одна из самых распространенных сердечно-сосудистых патологий. Заболевание характеризуется нарушением структуры саркомеров кардиомиоцитов и увеличением их размера, гипертрофией стенок левого желудочка, прогрессирующей сердечной недостаточностью, высоким риском аритмий и внезапной сердечной смерти. В 60% случаев заболевание является наследственным. На сегодняшний день известно более 1400 генетических вариантов, связанных с ГКМП, в генах, которые по большей части кодируют саркомерные белки [1]. Из этих генетических вариантов примерно 80% приходится на такие гены, как MYH7 и MYBPC3 [2]. Однако не для всех описанных генетических вариантов подтверждена способность влиять на развитие патологии. Ранее нами были выявлены два пациента, страдающих ГКМП, с вариантами с неясным клиническим значением с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в генах MYH7 и MYBPC3 соответственно [3]. Целью данной работы является исследование патогенетического вклада вариантов с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в генах MYH7 и MYBPC3 в развитие ГКМП.

Методы и алгоритмы: Для выяснения клинического значения вариантов с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в генах MYH7 и MYBPC3 данные мутации были внесены в линию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) здорового донора K7-4Lf [4], а также исправлены в ранее полученных пациент-специфичных линиях ИПСК [5-6]. Редактирование генов MYH7 и MYBPC3 в линиях ИПСК осуществляли с помощью системы CRISPR/Cas9 и однопечочных донорных олигонуклеотидов, содержащих нуклеотидные последовательности 18-го экзона гена MYH7 или 17-го экзона гена MYBPC3. Донорные олигонуклеотиды для внесения мутаций содержали замену с.1977G>A или делецию с.1543_1545delAAC, донорные олигонуклеотиды для исправления мутаций соответствовали нуклеотидной последовательности здорового донора. Система CRISPR/Cas9 использовалась в виде рибонуклеопротеиновых комплексов, sgRNA:Cas9-NLS, которые вместе с донорными олигонуклеотидами доставлялись в клетки с помощью электропорации. Полученные после электропорации ИПСК субклонировали. Анализ событий в целевых районах в субклонах ИПСК проводили секвенированием по Сэнгеру. Линии ИПСК с внесенными и исправленными мутациями с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в генах MYH7 и MYBPC3 стандартными методами были проверены на экспрессию маркеров

плюрипотентного состояния, способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и сохранение нормального кариотипа. Наличие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в полученных линиях ИПСК проверялось секвенированием по Сэнгеру пяти наиболее вероятных предсказанных нецелевых сайтов системы CRISPR/Cas9. Направленная дифференцировка линий ИПСК с внесенными мутациями с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в гены *MYH7* и *MYBPC3*, пациент-специфичных линий ИПСК и линий ИПСК здоровых доноров в кардиомиоциты осуществлялась по протоколу основанному на модуляции сигнального пути Wnt [7]. Размер полученных кардиомиоцитов оценивался с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания и последующего подсчета их площадей в программе ImageJ. Для кардиомиоцитов с внесенной мутацией с.1977G>A в ген *MYH7* также проведено исследование митохондриального дыхания с использованием технологии Seahorse (Agilent).

Результаты: В результате редактирования генов *MYH7* и *MYBPC3* линии ИПСК здорового донора и пациент-специфичных линий ИПСК с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены одна линия ИПСК, гетерозиготная по внесенной мутации с.1977G>A в ген *MYH7*, три линии ИПСК, гомозиготные по внесенной мутации с.1543_1545delAAC в ген *MYBPC3*, две линии ИПСК с исправленной мутацией с.1977G>A в гене *MYH7* и три линии ИПСК с исправленной мутацией с.1543_1545delAAC в гене *MYBPC3*. Все полученные линии ИПСК сохраняли свои плюрипотентные свойства: экспрессию маркеров плюрипотентного состояния и способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков – и нормальный кариотип. В полученных линиях ИПСК также не было обнаружено нецелевой активности системы CRISPR/Cas9. Было показано, что площади кардиомиоцитов, полученных в результате направленной дифференцировки линий ИПСК с внесенными вариантами с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в гены *MYH7* и *MYBPC3* и пациент-специфичных линий ИПСК, достоверно увеличены по сравнению с площадями кардиомиоцитов, полученных при дифференцировке линий ИПСК здоровых доноров. Также базовый уровень потребления кислорода в кардиомиоцитах с внесенным генетическим вариантом с.1977G>A в ген *MYH7* был значительно ниже относительно кардиомиоцитов, полученных из линии ИПСК здорового донора, использованной для внесения мутации.

Выводы: С использованием системы CRISPR/Cas9 была создана панель изогенных линий ИПСК для изучения патогенетического вклада вариантов с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в генах *MYH7* и *MYBPC3* в развитие ГКМП. В кардиомиоцитах, полученных из линий ИПСК с внесенными мутациями с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в гены *MYH7* и *MYBPC3*, воспроизводится такой важный признак ГКМП, как увеличенный размер. Кроме того, в кардиомиоцитах с внесенной мутацией с.1977G>A в ген *MYH7* обнаружено снижение митохондриального дыхания. Данные результаты свидетельствуют о патогенности вариантов с.1977G>A и с.1543_1545delAAC в генах *MYH7* и *MYBPC3*.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ (проект № 22-15-00271).

The effect of variants c.1977G>A in *MYH7* and c.1543_1545delAAC in *MYBPC3* on the development of hypertrophic cardiomyopathy

Shulgina A.*, Pavlova S., Pronyaeva K., Zakian S., Dementyeva E.

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* ange.shulgina@yandex.ru

Key words: hypertrophic cardiomyopathy; genetic variant of unknown significance; CRISPR/Cas9; induced pluripotent stem cells; cardiomyocyte

Motivation and Aim: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is one of the most common cardiovascular pathologies. The disease is characterized by disruption of sarcomere structure of cardiomyocytes and their enlarged size, hypertrophy of left ventricle walls, progressive heart failure, a high risk of arrhythmia and sudden cardiac death. In 60% of cases, the disease is inherited. To date more than 1400 HCM-associated genetic variants in genes encoding predominately sarcomeric proteins have been described [1]. Among the variants, about 80% were found in *MYH7* and *MYBPC3* [2]. However, capacity to have impact on pathology development is confirmed not for all the genetic variant. We previously identified two HCM patients carrying variants of unknown significance – c.1977G>A and c.1543_1545delAAC in *MYH7* and *MYBPC3*, respectively [3].

The aim of this work is studying pathogenetic contribution of c.1977G>A and c.1543_1545delAAC variants in *MYH7* and *MYBPC3* to HCM development.

Methods and Algorithms: To find out clinical significance of c.1977G>A and c.1543_1545delAAC variants in *MYH7* and *MYBPC3*, the mutations were introduced in induced pluripotent stem cells (iPSCs) of healthy donor, the K7-4Lf line [4] and were corrected in patient-specific iPSC lines generated previously [5-6]. *MYH7* and *MYBPC3* editing in the iPSC lines was performed with CRISPR/Cas9 and single-stranded donor oligonucleotides contained nucleotide sequences of *MYH7* exon 18 or *MYBPC3* exon 17. Donor oligonucleotides for introducing mutations comprised c.1977G>A substitution or c.1543_1545delAAC deletion, donor oligonucleotides for mutation correction corresponded to nucleotide sequences of healthy donor. CRISPR/Cas9 was used in the form of ribonucleoprotein complexes, sgRNA:Cas9-NLS, that were delivered to cells together with the donor oligonucleotides by electroporation. The iPSCs obtained after electroporation were subcloned. Analysis of events in the target regions in the iPSC subclones was carried out using Sanger sequencing. iPSC lines with introduced and corrected c.1977G>A and c.1543_1545delAAC mutations in *MYH7* and *MYBPC3* were checked for expression of pluripotency state markers, capacity to be differentiated into derivatives of three germ layers, and retaining normal karyotype by a standard set of methods. Off-target CRISPR/Cas9 activity in the iPSC lines was verified by Sanger sequencing of top-5 predicted CRISPR/Cas9 off-target sites. Directed differentiation of the iPSC lines with introduced c.1977G>A and c.1543_1545delAAC mutations in *MYH7* и *MYBPC3*, the patient-specific iPSC lines and iPSC lines of healthy donors into cardiomyocytes was performed according to the protocol based on the Wnt signaling pathway modulation [7]. The size of the cardiomyocytes was evaluated using immunofluorescence staining followed by cardiomyocyte area calculation in ImageJ.

For cardiomyocytes with introduced c.1977G>A mutation in *MYH7*, mitochondrial respiration was also examined using the Seahorse (Agilent) technology.

Results: As a result of *MYH7* and *MYBPC3* editing of the iPSC lines of healthy donor and patient-specific iPSC lines using CRISPR/Cas9, one iPSC line heterozygous at introduced c.1977G>A mutation in *MYH7*, three iPSC lines homozygous at introduced c.1543_1545delAAC mutation in *MYBPC3*, two iPSC lines with corrected c.1977G>A mutation in *MYH7*, and three iPSC lines with corrected c.1543_1545delAAC mutation in *MYBPC3* were generated. All the iPSC lines retained their pluripotent properties – expression of the pluripotency state markers and capacity to be differentiated into derivatives of three germ layers – and normal karyotype. Off-target CRISPR/Cas9 activity was not observed in the iPSC lines. It was shown that areas of cardiomyocytes derived from the iPSC lines with introduced c.1977G>A and c.1543_1545delAAC variants in *MYH7* and *MYBPC3* and patient-specific iPSC lines were significantly increased in comparison with those derived from the iPSC lines of healthy donors. Basic oxygen consumption rate in cardiomyocytes with introduced c.1977G>A variant in *MYH7* was decreased compared to cardiomyocytes derived from the iPSC line of healthy donor used for introducing the mutation.

Conclusion: A panel of isogenic iPSC lines for studying pathogenetic contribution of c.1977G>A and c.1543_1545delAAC variants in *MYH7* and *MYBPC3* to HCM development has been generated using CRISPR/Cas9. An important HCM feature, enlarged cardiomyocyte size, was reproduced in cardiomyocytes derived from the iPSC lines with introduced c.1977G>A and c.1543_1545delAAC mutations in *MYH7* and *MYBPC3*. A decrease in mitochondrial respiration was also revealed in cardiomyocytes with introduced c.1977G>A mutation in *MYH7*. The results testify in favor of pathogenicity of c.1977G>A and c.1543_1545delAAC variants in *MYH7* and *MYBPC3*.

Funding: The study was supported by Russian Science Foundation (project No. 22-15-00271).

Список литературы/References

1. Vatutin N.T. et al. Hypertrophic cardiomyopathy: genetic alterations, pathogenesis and pathophysiology. *Russian Journal of Cardiology*. 2014;5(109):35-42
2. Akhtar M., Elliott P. The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Global Cardiology Science and Practice*. 2018;71(3):132-138
3. Dementyeva E.V. et al. Genetic analysis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Genes and Cells*. 2020;15(3):68-73
4. Malakhova A.A. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res*. 2020;48:101952
5. Dementyeva E.V. et al. Generation of two clonal iPSC lines, ICGi019-A and ICGi019-B, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.M659I mutation in *MYH7*. *Stem Cell Res*. 2020;46:101840
6. Dementyeva E.V. et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi029-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cell of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.N515del mutation in *MYBPC3*. *Stem Cell Res*. 2021;53: 102344
7. BurrIDGE P.W. et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods*. 2014;11:855-860