

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА ВАРИАНТОВ В ГЕНЕ ТАЙТИНА В УСЛОВНО ЗДОРОВОЙ РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Вахрушев Ю. А., Козырева А. А., Жук С. В., Ротарь О. П.,
Костарева А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Вахрушев Юрий Алексеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: vakhrushev_yua@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию
12.10.2021 и принята к печати 15.12.2021.

Резюме

Актуальность. Ген тайтина (в русскоязычной литературе можно встретить также название титин/коннектин) ассоциирован с развитием кардиомиопатий, однако его крупные размеры (294 тыс. пар оснований) обуславливают большое число уникальных генетических вариантов, интерпретация которых затруднена. Кроме того, на сегодняшний день не существует данных по спектру вариантов в условно здоровой российской популяции. Определение частоты и спектра вариантов тайтина позволит интерпретировать результаты молекулярно-генетического обследования у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями и оценить прогноз течения этих заболеваний. **Цель.** Изучить спектр и частоту однонуклеотидных и укорачивающих вариантов в гене тайтина в условно здоровой российской популяции и сравнить с данными международных регистров, а также оценить степень их патогенности и распределение по структуре белка. **Материалы и методы.** В исследование включены 192 мужчины в возрасте $55,8 \pm 6,6$ лет. Им было выполнено молекулярно-генетическое обследование при помощи технологии высокопроцессивного секвенирования, основанной на использовании набора целевых зондов ко всем кодирующим экзонам тайтина, с последующим подтверждением полученных генетических вариантов секвенированием по Сэнгеру. **Результаты.** Аллельная частота миссенс-вариантов (с частотой менее 0,1 %) в гене тайтина в условно здоровой российской популяции составила 15,1 %, а укорачивающих вариантов — 0,52 %. По распределению с точки зрения патогенности 37,9 % из них являлись вариантами неопределенной значимости, 62 % — вероятно доброкачественными и 0,1 % — доброкачественными. Патогенных и вероятно патогенных вариантов выявлено не было. Найденные генетические варианты равномерно распределялись по всей длине молекулы тайтина. **Заключение.** Вышеуказанные результаты совпадают с данными международных исследований и регистров. Используемый нами лабораторный метод секвенирования нового поколения с последующим подтверждением полуавтоматическим секвенированием по Сэнгеру может применяться в клинической практике и при создании базы данных генетических вариантов условно здоровой российской популяции.

Ключевые слова: высокопроцессивное секвенирование, индекс процента сплайсинга, кардиомиопатии, однонуклеотидные полиморфизмы, тайтин, *TTN*.

Для цитирования: Вахрушев Ю.А., Козырева А.А., Жук С.В. и др. Анализ частоты и спектра вариантов в гене тайтина в условно здоровой российской популяции. Трансляционная медицина. 2021; 8 (5):29-37. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-29-37

ASSAY OF FREQUENCY AND SPECTRUM OF GENETIC VARIANTS IN TTN IN HEALTHY RUSSIAN POPULATION

Vakhrushev Yu. A., Kozyreva A. A., Zhuk S. V., Rotar' O. P., Kostareva A. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Vakhrushev Yuriy. A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: vakhrushev_yua@almazovcentre.ru

Received 12 October 2021; accepted
15 December 2021.

Abstract

Background. Gene *TTN* associated with all types of cardiomyopathy, however its large size (294 b.p.) warrants a lot of individual unique genetic variants or variants with low frequency, that aggravates their interpretation. Besides that nowadays there is no data about spectrum of variants in this gene in healthy Russian population. Recognition frequency and spectrum of variants in gene *TTN* in healthy Russian population will allow us to use it for interpretation results of molecular genetic research for patients with different heart pathology, and define prognosis for different heart diseases.

Objective. Recognize frequency and spectrum of single nucleotide and truncating variants in gene *TTN* in healthy Russian population and compare it with international data bases, and evaluate level of pathogenicity these variants and their distributing across titin structure.

Design and methods. 192 men in age $55,8 \pm 6,6$ years were tested with next-generation sequencing. Identified genetic variants were confirmed by Sanger sequencing.

Results. Allele missense variant frequency (with frequency less than 0.1%) in *TTN* in healthy Russian population amount to 15.1 %, and truncating variants — 0.52 %. 37,9 % of them were variants of unknown significance, 62 % — likely-benign and 0.1 % — benign. There was no pathological and likely-pathological variants. Identified genetic variants distributed throughout the titin structure.

Conclusion. Received result is congruent c international data bases and researches. Expended laboratory method (Next generation sequencing and confirmation with Sanger sequencing) can be used both in clinical practice, and in creating data bases of genetic variants in healthy Russian population.

Key words: cardiomyopathy, next-generation sequencing, PSI, SNP, titin, *TTN*tv.

For citation: Vakhrushev YuA, Kozyreva AA, Zhuk SV, et al. Assay of frequency and spectrum of genetic variants in TTN in healthy russian population. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2021;8(5): 29-37. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-29-37

Список сокращений:

ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, КМП — кардиомиопатия, ACMG — Американский колледж медицинской генетики и геномики, PSI — индекс процента сплайсинга, *TTN*tv — укорачивающие варианты в гене тайтина.

Введение

Развитие лабораторных методов молекулярно-генетической диагностики в последнее десятилетие, в частности появление технологии секвенирования нового поколения, позволило осуществить детекцию вариантов в генах большого размера, ассоциированных с развитием патологии человека. Одним из них является ген тайтина (*TTN*) — бел-

ка, осуществляющего в структуре кардиомиоцита обеспечение пассивной жесткости саркомера, а также участвующего в сигнализации и саркомерогенезе. Молекулы тайтина, состоящие из иммуноглобулин-подобных, фибронектин-подобных доменов и уникальных последовательностей, расположены в саркомере от М-линии до Z-диска. Впервые мутации в данном гене были обнаружены в 2002 году у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) [1], и на сегодняшний день они являются причиной 15–20 % всех случаев ДКМП [2]. Наиболее часто развитие данной патологии обусловлено укорачивающими вариантами (*TTNtv*), к которым относятся нонсенс-мутации, инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания. В дальнейшем было доказано влияние *TTNtv* и на развитие других типов кардиомиопатий (КМП), таких как некомпактный миокард левого желудочка, аритмогенная КМП правого желудочка, а также нейромышечных заболеваний и различных нарушений ритма [3, 4].

На сегодняшний день считается, что основным механизмом действия *TTNtv* является гаплонедостаточность, что было доказано на кардиомиоцитах, полученных в результате дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с *TTNtv* или созданных при помощи технологии CRISPR–Cas9 [5]. При исследовании кардиомиоцитов было выявлено, что *TTNtv* приводят к дезорганизации саркомера и подавлению сигнальных путей, необходимых для работы кардиомиоцита [5]. При исследовании влияния *TTNtv* на работу миокарда при использовании мышиных моделей было выявлено снижение ударного объема, фракции выброса левого желудочка и утончение миокарда у мышей с *TTNtv* по сравнению с аллелем дикого типа [6]. Большую сложность сейчас представляет интерпретация найденных генетических вариантов, так как примерно у 1–3 % в популяции присутствуют *TTNtv* [7, 8]. Наиболее часто, по данным международных баз данных, таких как gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>) и ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>), генетические варианты в общей популяции расположены в I-зоне молекулы тайтина, которая обеспечивает главную функцию молекулы — изменение пассивной жесткости саркомера. При сравнении здоровых носителей *TTNtv* с контрольной группой у них было выявлено увеличение объема левого желудочка как в систолу, так и в диастолу, снижение сократимости, а также эксцентрическое ремоделирование, обнаруженное с помощью магнитно-резонансной томографии [6]. Вышеописанные данные в значительной степени

подтверждаются тем, что патогенные варианты в гене тайтина ассоциированы с развитием не только первичных КМП, но и неблагоприятных вариантов ремоделирования миокарда, под воздействием неблагоприятных факторов, таких как прием алкоголя, антрациклинов и др. [9, 10].

Помимо *TTNtv*, в гене тайтина обнаружено около 60,000 различных однонуклеотидных генетических вариантов, при этом у каждого здорового человека присутствует хотя бы один из них [11]. Большинство генетических вариантов являются доброкачественными или их патологического эффекта недостаточно для развития заболевания, но при этом они могут выступать в качестве модифицирующих факторов при наличии патогенных вариантов в других генах [12]. Несмотря на интерес к данному гену в работах ряда отечественных авторов [13, 14, 15], частоты и спектр вариантов в гене тайтина в условно здоровой российской популяции является до сих пор не исследованным. Актуальность получения данной информации обусловлена тем, что на сегодняшний день для интерпретации степени патогенности вновь выявленных генетических вариантов необходимо их соотнесение с имеющимися контрольными базами данных, в российской же популяции подобного рода ресурс отсутствует. Также целесообразно сопоставление уже найденных генетических вариантов с клинической картиной соответствующих пациентов для оценки их патогенности и включение данной информации в реестр для последующего применения в клинической практике.

Материалы и методы

В исследование включены мужчины ($n = 192$) из Северо-Западного региона в возрасте $55,8 \pm 6,6$ лет из исследования ЭССЕ–РФ [16]. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение необходимых методов обследования, в том числе генетического анализа. Работа была одобрена Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) для генетического исследования была выделена из цельной крови с помощью набора FlexiGene DNA Kit. Контроль качества выделенной ДНК проводили с использованием электрофореза и спектрофотометрии. Для ультразвуковой обработки выделенной ДНК была применена ультразвуковая система Bioruptor компании Diagenode. Для приготовления библиотек были получены образцы ДНК размером 150 пар оснований. Оценка качества была проведена при помощи аппарата капиллярного электрофореза высокого разрешения Bioanalyzer 2100. При-

готовление библиотек для высокопроцессивного секвенирования осуществляли с помощью набора Sure Select Target Enrichment System. Было произведено восстановление концов образцов ДНК при помощи T4 и Klenow ДНК-полимеразы и T4 полинуклеотидной киназы, и проведена очистка с помощью магнитных частиц AMPure X. На следующем этапе было последовательно осуществлено прикрепление полиА-хвоста и концевых адапторов. По окончании данного этапа была проведена оценка качества вышеуказанным методом капиллярного электрофореза высокого разрешения. Максимальный уровень пика находился в диапазоне от 225 до 275 пар оснований. Следующий этап состоял из двух параллельных процессов: гибридизации и приготовления магнитных частиц, покрытых стрептавидином. Далее производился захват гибридизованной ДНК магнитными частицами и последующая их отмывка.

Последний этап приготовления библиотек состоял в прикреплении индексов к полученным образцам методом амплификации, их очистке с помощью магнитных частиц и последующей оценке качества и концентрации полученных библиотек. Для создания зондов был использован сервис Agilent Sure Design. Было создано три группы зондов только для экзонов гена *TTN*. Было создано 206 целевых интервалов. Были охвачены все экзоны, а также прилегающие к ним сайты сплайсинга.

Секвенирование было выполнено при помощи прибора Illumina MiSeq. Генетические варианты учитывались при количестве прочтений не менее десяти. Анализ данных секвенирования следующего поколения осуществлялся с использованием cutadapt v.3.0, bwa v.0.7.17, Picard v.2.25.0 and Genome Analysis ToolKit (GATK) v.4.2.0.0 на основании рекомендаций разработчиков GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>) для идентификации коротких герминальных вариантов. HaploTypeCaller в когортном режиме использовался

для генотипирования индивидуальных GVCF файлов. Фильтрация полученных вариантов проводилась с использованием параметров, рекомендованных GATK. Клиническая интерпретация вариантов осуществлялась согласно классификации ACMG (Американского колледжа медицинской генетики и геномики) с использованием международных баз данных UniProt Variants, RedSeq, gnomAD exomes, ClinVar и DANN SNVs. Информация о частоте варианта бралась из базы данных gnomAD Genomes version 3.1.1. Варианты с частотой более 0,1 % исключались, потому что они не могут выступать в качестве патогенных или условно-патогенных. Найденные генетические варианты были подтверждены при помощи полуавтоматического секвенирования по Сэнгеру при помощи прибора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Результаты

При биоинформатическом анализе данных, полученных в результате секвенирования, было выявлено 2069 вариантов в гене тайтина, в том числе 1102 миссенс-варианта, 896 синонимичных вариантов, 64 миссенс-варианта в сайте сплайсинга, 4 синонимичных замены в сайте сплайсинга, 1 вариант со сдвигом рамки считывания, 1 делеция и 1 инсерция без сдвига рамки считывания. Среди вариантов с частотой более 0,1 % ранее не описанных обнаружено не было. После исключения вариантов с частотой более 0,1 % для последующего анализа осталось 29 миссенс-вариантов, 7 синонимичных вариантов и 1 делеция со сдвигом рамки считывания соответственно. Данные варианты были обнаружены только у одного человека, и все они находились в гетерозиготном состоянии. Таким образом, аллельная частота миссенс-вариантов составила 15,1 %. Распределение данных вариантов изображено на рисунке 1. Единственным обнаруженным укорачивающим вариантом являлся rs781363456 (NM_133379.5:c.13939del, Glu4647LysfsTer54),

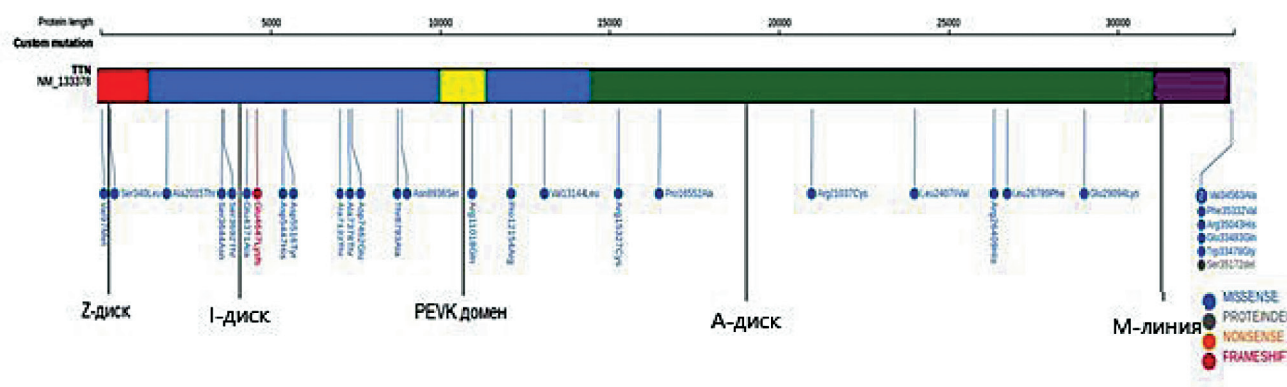


Рис. 1. Распределение генетических вариантов по структуре гена тайтина

который, согласно классификации ACMG, имеет неопределенную значимость. Аллельная частота встречаемости данного генетического варианта крайне низка (0,006371 %), что и обуславливает сложность его интерпретации. Таким образом, аллельная частота встречаемости *TTNtv* в условно здоровой популяции составила 0,52 %.

По распределению с точки зрения патогенности, 11 из них являлись вариантами неопределенной значимости, 17 — вероятно доброкачественными и 1 — доброкачественный. Патогенных и вероятно патогенных вариантов выявлено не было (рис. 2).

С точки зрения распределения по структуре молекулы тайтина, 11 из них были обнаружены в доменах фибронектина типа 3 и 6 — в иммуноглобулин-подобных доменах. При сравнении полученного распределения вариантов по структуре белка с данными международных исследований существенных различий обнаружено не было (рис. 3).

Найденные миссенс-варианты были также проанализированы на патогенность при помощи различных шкал на основе нейронных сетей, таких как FATHMM, Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, CADD PHRED (табл. 1).

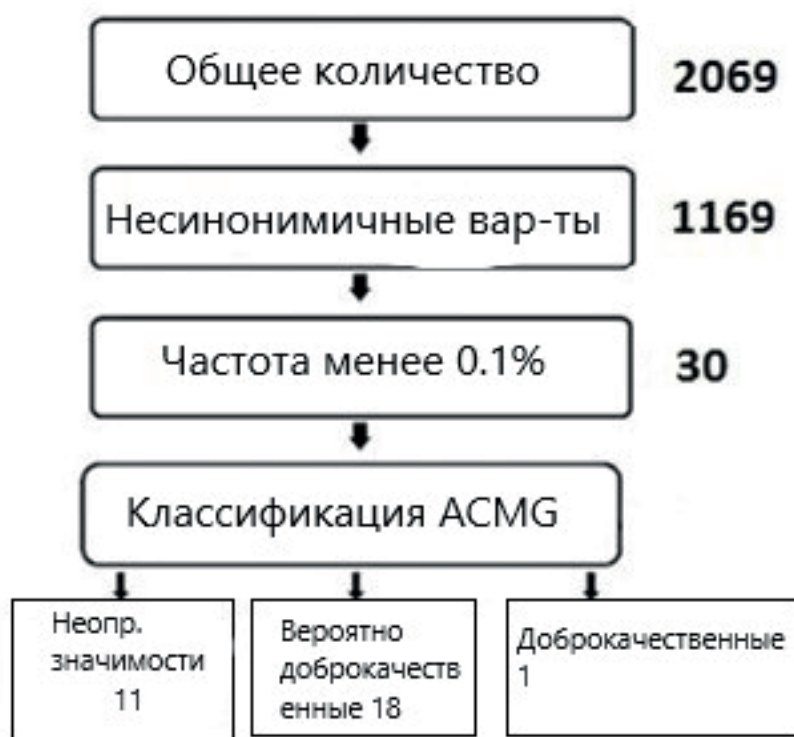


Рис. 2. Схема фильтрации найденных генетических вариантов

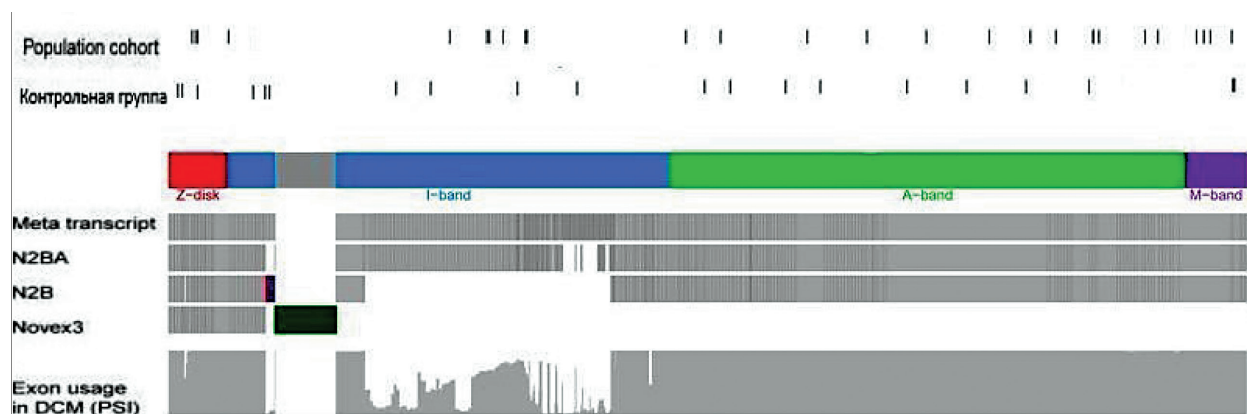


Рис. 3. Сравнение распределения генетических вариантов по структуре молекулы тайтина в условно здоровой российской популяции с результатами международных исследований. Серым цветом указан уровень экспрессии соответствующих экзонов

Таблица 1. Характеристика патогенности миссенс-вариантов в условно здоровой российской популяции по шкалам FATHMM, Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, CADD PHRED

Миссенс-вариант	FATHMM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen	CADD PHRED
2:178713327:T>C	Tolerated (0,6593)	Disease causing, Polymorphism(0,5876)	Tolerated (0,04277)	benign (0)	5,272
rs776154251	Tolerated (0,7001)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,2068)	benign (0.003)	21,3
rs1001215658	No data	No data	No data	benign (0.012)	14,45
rs368321767	Tolerated (0,5435)	Disease causing (0,4195)	Tolerated (0,3325)	benign (0.018)	19,72
rs72650034	Tolerated (0,7025)	Polymorphism (0,08975)	Tolerated (0,3138)	benign (0.055)	7,632
rs202098308	Tolerated (0,6593)	Disease causing (0,4189)	Tolerated (0,2556)	benign (0.146)	16,44
rs55945684	Tolerated (0,6374)	Disease causing (0,4569)	Damaging (0,4819)	benign (0.183)	22,6
rs55945684	Tolerated (0,6374)	Disease causing (0,4569)	Damaging (0,4819)	benign (0.183)	22,6
rs147314430	Tolerated (0,5773)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Damaging (0,4371)	benign (0.23)	10,91
COSV59974869	Tolerated (0,6556)	Disease causing (0,4457)	Tolerated (0,3554)	benign (0.322)	23,1
rs199501185	Tolerated (0,6575)	Disease causing (0,5876)	Damaging (0,5646)	possibly:damaging (0.607)	24
rs879099986	Tolerated (0,4106)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,08335)	possibly:damaging (0.696)	23,4
rs183482849	Tolerated (0,731)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,2031)	possibly:damaging (0.703)	15,45
rs776534823	Tolerated (0,6409)	Disease causing, Polymorphism (0,3858)	Tolerated (0,2107)	possibly:damaging (0.777)	23,6
rs72648940	Damaging (0,8164)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,6542)	possibly:damaging (0.877)	24,2
rs72648206	Tolerated (0,5709)	Disease causing (0,4483)	Damaging (0,4504)	probably:damaging (0.917)	24,1
rs372304158	Tolerated (0,5435)	Disease causing (0,548)	Tolerated (0,3712)	probably:damaging (0.93)	25,7
rs1403788853	Tolerated (0,5594)	Disease causing (0,5293)	Damaging (0,5993)	probably:damaging (0.942)	24,2
rs185921345	Tolerated (0,7897)	Disease causing (0,4283)	Damaging (0,7849)	probably:damaging (0.953)	24,3

Миссенс-вариант	FATHMM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen	CADD PHRED
rs201394117	Tolerated (0,6818)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,1018)	probably:damaging (0.966)	23,8
rs367774903	Tolerated (0,6683)	Disease causing (0,5876)	Damaging (0,9125)	probably:damaging (0.982)	25,8
2:178613067:G>C	Damaging (0,8615)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,9125)	probably:damaging (0.997)	23,7
rs370137295	Tolerated (0,7131)	Disease causing (0,5876)	Tolerated, Damaging (0,4278)	probably:damaging (0.998)	24
rs191549948	Tolerated (0,6073)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,9125)	probably:damaging (0.998)	26,3
rs1414717534	Tolerated (0,8081)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,5013)	probably:damaging (1)	16,06
rs374394719	Tolerated (0,6409)	Polymorphism (0,08975)	Tolerated (0,1015)	unknown (0)	0,006
rs371580084	Tolerated (0,7013)	Polymorphism (0,2615)	No data	unknown (0)	4,677
2:178740121:T>G	Tolerated (0,7489)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated, Damaging (0,9125)	unknown (0)	12,34
rs78535378	Tolerated (0,7048)	Polymorphism (0,2305)	Tolerated (0,05061)	unknown (0)	11,81

Обсуждение

Использованный нами лабораторный метод определения генетических вариантов в гене тайтина успешно зарекомендовал себя. Данный метод в дальнейшем может быть использован в лабораторной диагностике и лабораторной генетике для поиска вариантов в гене тайтина, ассоциированных с развитием различных заболеваний, а также может быть применен в научных исследованиях для создания базы данных в условно здоровой российской популяции, включая при этом все экзоны, в том числе и редко транскрибируемые.

Полученные нами результаты свидетельствуют об их соответствии данным международных регистров: так, аллельная частота миссенс-вариантов в нашем исследовании составила 15,1 %, в то время как, согласно международным базам данных ExAC и gnomAD, это значение составляет 16,5 % и 17,1 % соответственно [17]. Среди обнаруженных миссенс-вариантов больше половины составили вероятно доброкачественные варианты (62 %), однако довольно значительную часть составили варианты неопределенной значимости (37,9 %). По структурному распределению мис-

сенс-вариантов в молекуле тайтина, половина из них (15) располагались в области I-зоны, экзоны которой имеют низкий уровень индекса процента сплайсинга (PSI) в изоформе N2B и транскриптах Novex 1–3 (рис. 3). Данный индекс характеризует процентное содержание определенной последовательности или экзона, проходящего этап сплайсинга, в зрелой мРНК. Часть конститутивных экзонов имеет PSI 100 %, то есть они содержатся во всех транскриптах, получаемых с данного гена. Остальные же экзоны, имеющие PSI менее 100 %, присутствуют лишь в части транскриптов. Порядка 90 % генов в организме подвержены альтернативному сплайсингу, что позволяет создавать в организме белковое многообразие, не увеличивая при этом количество ДНК в клетке. Альтернативный сплайсинг для тайтина имеет крайне важное значение, так как позволяет синтезировать множество различных изоформ для разных типов мышечной ткани в разные периоды онтогенеза: так, менее жесткая и более длинная N2BA изоформа синтезируется в сердце преимущественно в эмбриональном периоде, постепенно заменяясь после рождения на более жесткую и короткую

N2B изоформу, а в скелетной мускулатуре синтезируются два типа изоформы N2A — короткая (N2A(S)) и длинная (N2A(L)), изменение соотношения которых позволяет регулировать жесткость миофибриллы [18]. Данный индекс устанавливается при помощи секвенирования РНК и количественного сравнения различных последовательностей с одной матрицы [19]. Аналогичная ситуация и с укорачивающими вариантами: их частота в нашем исследовании составила 0,52 %, а согласно различным международным исследованиям их частота в общей популяции составляет от 1 % до 3 % [7, 8]. Кроме того, найденный укорачивающий вариант располагался в экзоне с PSI 7,3 %, что соответствует закономерности, при которой *TTN*tv в условно здоровой популяции располагаются преимущественно в экзонах I-зоны, имеющих низкий показатель PSI, в отличие от, например, когорты больных ДКМП, у которых *TTN*tv локализуется преимущественно в экзонах A-зоны тайтина, имеющих 100 % PSI [8]. Также стоит отметить, что именно показатель PSI является одним из ключевых факторов при классификации миссенс-вариантов при помощи различных алгоритмов оценки патогенности наряду с описанием клинической картины у носителей полиморфизмов.

Исходя из полученных результатов, очевидна неоднозначность и сложность интерпретации полученных данных, что еще раз подчеркивает необходимость создания базы данных генетических вариантов в гене тайтина для российской популяции. Полученные результаты могут быть в дальнейшем оформлены в качестве базы данных для клинической лабораторной диагностики сердечно-сосудистых и нейромышечных заболеваний.

Наше исследование имело ряд ограничений, таких как относительно малый состав изучаемой группы, а также отсутствие данных по секвенированию интронов тайтина, которые могут содержать регуляторные последовательности, влияющие на экспрессию белка. Секвенирование некодирующих последовательностей, по крайней мере в диапазоне 20 нуклеотидов от края экзона, может служить почвой для дальнейших исследований, однако патогенное влияние полиморфизмов в данных областях крайне мало.

Выводы

1. Аллельная частота миссенс-вариантов в гене тайтина составила 15,1 %, аллельная частота укорачивающих вариантов — 0,52 %, что соответствует данным международных регистров.

2. Среди обнаруженных миссенс-вариантов большинство составляли вероятно доброкаче-

ственные (62 %) и варианты неопределенной значимости (37,9 %). Патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов выявлено не было.

3. Найденные генетические варианты располагались по всей длине молекулы тайтина, что соответствует данным международных регистров.

4. Используемый нами лабораторный метод может применяться как в клинической практике, так и в создании базы данных генетических вариантов условно здоровой российской популяции.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности/Acknowledgments

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № ААА-А19-119070490034-4).

Список литературы / References

1. Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, et al. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Feb 22; 291(2): 385-93. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6448.
2. Herman DS, Lam L, Taylor MR, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012 Feb 16; 366(7): 619-28. DOI: 10.1056/NEJMoa1110186.
3. Taylor M, Graw S, Sinagra G, et al. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation*. 2011 Aug 23; 124(8): 876-85. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005405.
4. Peled Y, Gramlich M, Yoskovitz G, et al. Titin mutation in familial restrictive cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2014 Jan 15; 171(1): 24-30. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.11.037.
5. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, et al. HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science*. 2015 Aug 28; 349(6251): 982-6. DOI: 10.1126/science.aaa5458. PMID: 26315439; PMCID: PMC4618316.
6. Schafer S, de Marvao A, Adams E, et al. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population. *Nat Genet*. 2017 Jan; 49(1): 46-53. DOI: 10.1038/ng.3719.
7. Norton N, Li D, Rampersaud E, et al. Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013 Apr; 6(2): 144-53. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.111.000062.
8. Akinrinade O, Koskenvuo JW, Alastalo TP. Prevalence of Titin Truncating Variants in General Population. *PLoS One*. 2015 Dec 23; 10(12):e0145284. DOI: 10.1371/journal.pone.0145284.
9. van Spaendonck-Zwarts KY, Posafalvi A, van den Berg MP, et al. Titin gene mutations are common in families with both peripartum cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2014 Aug 21; 35(32): 2165-73. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu050.

10. Ware JS, Amor-Salamanca A, Tayal U, et al. Genetic Etiology for Alcohol-Induced Cardiac Toxicity. *J Am Coll Cardiol*. 2018 May 22; 71(20): 2293-2302. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.03.462.
11. Merlo M, Sinagra G, Carniel E, et al. Familial Cardiomyopathy Registry. Poor prognosis of rare sarcomeric gene variants in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci*. 2013 Dec; 6(6): 424-8. DOI: 10.1111/cts.12116.
12. Golbus JR, Puckelwartz MJ, Fahrenbach JP, et al. Population-based variation in cardiomyopathy genes. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Aug 1; 5(4): 391-9. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.112.962928.
13. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77(13): 1515-35.
14. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys Rev*. 2017 Jun; 9(3): 189-199. DOI: 10.1007/s12551-017-0266-6
15. Vikhlyantsev IM, Okuneva AD, Shumilina UV, et al. Method for isolation of intact titin (connectin) molecules from mammalian cardiac muscle. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(5):455-62. DOI: 10.1134/S0006297913050039
16. Boytsov SA, Drapkina OM, Shlyakhto EV, et al. Epidemiology of cardiovascular diseases and their risk factors in regions of Russian Federation (ESSE-RF) study. Ten years later. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021; 20(5): 3007. In Russian. [Бойцов С.А., Драпкина О.М., Шляхто Е.В., и др. Исследование ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации). Десять лет спустя. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021; 20(5):3007] <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-3007>.
17. Akinrinade O, Heliö T, Lekan Deprez RH, et al. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2019 Mar 11; 9(1): 4093. DOI: 10.1038/s41598-019-39911-x.
18. Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003; 24(2-3): 175-89. DOI: 10.1023/a:1026053530766.
19. Schafer S, Miao K, Benson CC, et al. Alternative Splicing Signatures in RNA-seq Data: Percent Spliced in (PSI). *Curr Protoc Hum Genet*. 2015 Oct 6; 87:11.16.1-11.16.14. DOI: 10.1002/0471142905.hg1116s87.

Информация об авторах:

Вахрушев Юрий Алексеевич, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Козырева Александра Анатольевна, к.б.н., старший научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Жук Сергей Владимирович, младший научный сотрудник, НИЛ молекулярного и клеточного моделирования и генной терапии, ИЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Ротарь Оксана Петровна, к.м.н., заведующий НИЛ эпидемиологии артериальной гипертензии, НИО Артериальной гипертензии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Костарева Анна Александровна, д.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Author information:

Vakhrushev Yuriy A., assistant, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Kozyreva Alexandra A., PhD, senior researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Zhuk Sergey V., junior researcher, Research Laboratory of Molecular and Cellular Modeling and Gene Therapy, World-class research centre for personalized medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Rotar Oksana P., Candidate of Medical Sciences, Head of the Research Laboratory of Epidemiology of Arterial Hypertension, Almazov National Medical Research Centre;

Kostareva Anna A., MD, DrSci, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.