

TNNI3 基因 p. Arg79Cys 罕见纯合突变导致一家族性肥厚型心肌病的家系分析及突变位点生物信息学分析*

程维礼¹ 陶琴¹ 张郁青¹ 何萍萍¹ 陈香璇¹ 许定虎²

[摘要] 目的:对 TNNI3 基因 p. Arg79Cys 罕见纯合突变导致一家族性肥厚型心肌病进行家系分析,并对突变位点进行生物信息学分析。方法:对先证者及其亲属进行临床资料的评估,采集先证者及其亲属静脉血提取全基因组 DNA 并进行二代测序,寻找致病基因并进行 Sanger 测序验证。对致病基因突变进行生物信息学分析,获取突变基因野生型及突变型氨基酸序列,利用计算机对野生型及突变型蛋白质进行二级结构及三级结构预测分析。结果:先证者直系亲属均不符合肥厚型心肌病诊断标准。先证者 TNNI3 基因 5 号外显子 p. Arg79Cys 的纯合突变,先证者母亲、其中 1 个姐姐及儿子携带 TNNI3 基因杂合突变,另外 1 个姐姐未携带 TNNI3 基因突变。生物信息学分析提示该变异所致的氨基酸改变可能会对蛋白功能产生影响,并且导致蛋白质稳定性降低,在脊椎动物中保守性较好。二级结构预测突变的 TNNI3 及野生型 TNNI3 蛋白质二级结构未见明显变化。三级结构预测蛋白三级结构转角处折叠的角度发生了变化,导致蛋白的空间结构发生了变化。结论:TNNI3 基因 p. Arg79Cys 纯合突变可能通过不同于经典单基因遗传的其他遗传模式导致肥厚型心肌病,该位置的突变对蛋白质的结构产生了影响。

[关键词] 心肌病,肥厚性;TNNI3;纯合突变;蛋白质结构

DOI:10.13201/j.issn.1001-1439.2022.08.014

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Pedigree analysis of one familial hypertrophic cardiomyopathy caused by rare homozygous mutation of TNNI3(p. Arg79Cys) and bioinformatics analysis of the mutation

CHENG Weili¹ TAO Qin¹ ZHANG Yuqing¹ HE Pingping¹
CHEN Xiangxuan¹ XU Dinghu²

(¹Department of Cardiology, The Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 211199, China; ²Department of Medical Imaging, The Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University)

Corresponding author: TAO Qin, E-mail: tqsz07277@163.com

Abstract Objective: The study aims to perform pedigree analysis of one familial hypertrophic cardiomyopathy (HCM) caused by a rare homozygous mutation of TNNI3, as well as carry out bioinformatics analysis of the mutation. **Methods:** The clinical data of the proband and his relatives were evaluated. Venous blood was collected from the proband and his family. The whole genome DNA was extracted and screened by targeted next-generation sequencing, following validation by Sanger sequencing. Bioinformatics analysis of the mutation site was carried out. The amino acid sequences of wild-type and mutant TNNI3 were obtained, and the secondary and tertiary structures of the proteins were predicted and analyzed by a computer. **Results:** None of the proband's family members met the diagnostic criteria of HCM. A homozygous mutation of TNNI3 P. Arg79Cys was found in the proband. The proband's mother, one sister and son carried the heterozygous mutation of the same site while the other sister did not carry the mutation. Sequence alignment showed the residue homology in closely related mammals. Bioinformatics analysis indicated that the changes of the amino acid caused by this mutation might affect the protein function. In addition, the stability of mutant protein was decreased. There was no significant change in the secondary structure between the wild-type TNNI3 and the mutant protein. It was predicted that the angle at the corner of the tertiary structure changed, resulting in the change of the spatial structure of the protein. **Conclusion:**

*基金项目:南京市卫生科技发展专项资金项目(No:YKK20195)

¹南京医科大学附属江宁医院心血管内科(南京,211199)

²南京医科大学附属江宁医院影像科

通信作者:陶琴,E-mail:tqsz07277@163.com

引用本文:程维礼,陶琴,张郁青,等. TNNI3 基因 p. Arg79Cys 罕见纯合突变导致一家族性肥厚型心肌病家系分析及突变位点生物信息学分析[J]. 临床心血管病杂志, 2022, 38(8): 670-674. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1439.2022.08.014.

The homozygous mutation of *TNNI3* P. arg79cys may lead to hypertrophic cardiomyopathy through other genetic modes different from the classical single gene inheritance. The mutation at this site has an impact on the structure of the protein.

Key words hypertrophic cardiomyopathy; *TNNI3*; homozygous mutation; protein structure

肥厚型心肌病是一种以左心室肥厚为特征的遗传性心肌病,可导致左心室舒张功能减退,心力衰竭甚至猝死。研究发现肥厚型心肌病是青少年特别是运动员猝死的最常见的原因之一^[1]。尽管有少量常染色体隐性遗传的病例报道,目前观点仍然认为肥厚型心肌病是一种常染色体显性遗传病^[2]。通常肥厚型心肌病的致病性基因突变发生在编码肌节蛋白的基因中,超过一半的基因突变位于 *MYBPC3* 及 *MYH7*,而 *TNNT2* 及 *TNNI3* 等基因突变所占的比例相对较低^[3]。*TNNI3* 基因的编码产物为心肌肌钙蛋白 TnI3,该蛋白与 TnT、TnC 共同组成肌钙蛋白复合物。TnI 可阻止肌动蛋白-肌球蛋白相互作用,从而调整心肌舒张。国内外均有 *TNNI3* 基因突变导致肥厚型心肌病的报道,但大多为单基因杂合突变^[4-5]。本中心研究本地区肥厚型心肌病将近 10 余年时间,发现了多个导致肥厚型心肌病的基因突变,包括单基因突变及多基因突变,首次发现导致肥厚型心肌病的罕见纯合突变。该突变位点本中心此前已有报道^[6],查阅 gnomAD 数据库发现该等位基因频率为 4.63×10^{-4} ,且该突变大多发生在东亚人种。但是无论是国内还是国外目前均未发现该位点的纯合突变。本研究的目的是对该纯合突变进行报道,并进一步运用计算机模拟的方法预测该突变可能导致的有害结果,了解该突变对蛋白质的结构和功能产生的影响。

1 对象与方法

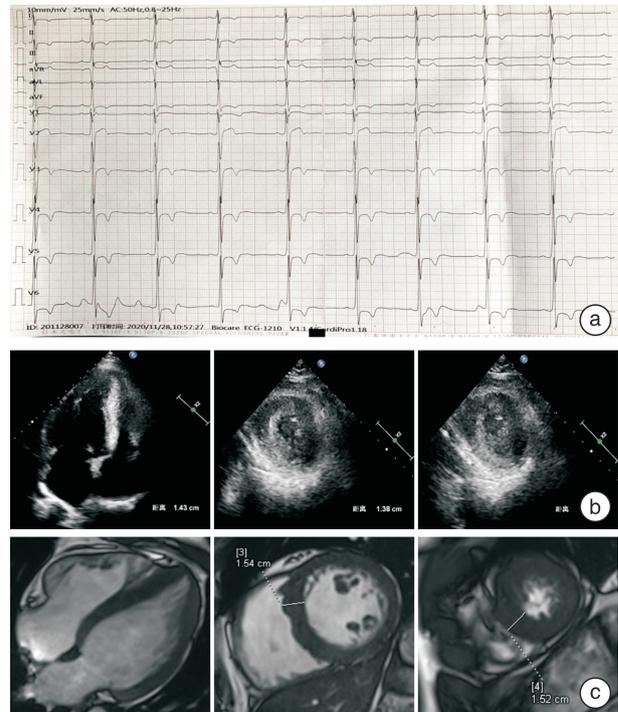
1.1 对象

本研究的对象为一家族性肥厚型心肌病家系。先证者为一男性患者,40 岁,因心电图异常(图 1a)前来就诊。门诊初步完善心脏超声及冠状动脉(冠脉)CTA 检查未见明显异常。为进一步评估是否存在心肌病前来我中心行心脏超声检查提示室间隔中远段心肌肥厚(图 1b),符合肥厚型心肌病诊断标准^[7],心脏磁共振增强检查(图 1c)进一步明确诊断。为进行家系筛查,先证者母亲、2 个姐姐及儿子行心电图及心脏超声检查,均排除肥厚型心肌病。采集先证者及其直系亲属共 5 例外周血 5 mL,并选取同时期我院体检的健康对照者 20 例,采集 5 mL 外周血,用于基因检测。本试验通过南京医科大学附属江宁医院伦理委员会审核并且遵循《赫尔辛基宣言》准则,所有参与者均签署知情同意书。

1.2 DNA 提取及基因测序

本研究 DNA 提取及测序均由百世诺(北京)医学检验实验室有限公司进行,具体步骤如下:提取全血白细胞基因组 DNA,应用二代测序技术对

25 个 DNA 样本进行全外显子测序。使用 Burrows-Wheeler Aligner(BWA)将每个样品的 clean reads 比对到人参考基因组序列上(GRCh37/HG19)。将变异的结果进行过滤后得到高信度、高质量的变异结果,与遗传性心肌病相关基因所有外显子编码区及其侧翼区序列进行筛查,得到 142 个与心肌病相关的突变位点。对 142 个突变位点使用百世诺遗传性心肌病致病突变分析鉴定软件进行致病性评级,筛选出可能的致病突变。对筛选出的致病基因行 Sanger 测序进一步验证,并检索相关文献,结合生物信息学预测软件对此 2 个突变位点进行进一步论证。



a:心电图;b:心脏超声;c:心脏增强磁共振检查。

图 1 先证者临床相关检查

Figure 1 Clinical examination of proband

1.3 基因序列获取及生物信息预测

TNNI3 蛋白质氨基酸序列从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 HomoloGene 数据库获取,并同时获取其他脊柱动物的 *TNNI3* 蛋白质氨基酸序列,进行 *TNNI3* 蛋白突变物种进化保守性分析。同时,我们对发现的蛋白突变位点进行了多个生物信息预测软件(包括 SIFT、Polyphen-2、Mutation Taster_pred 以及 VEST3 等)交叉预测^[8]。此外,本中心还利用蛋白质稳定性预测软件(I-MUTANT 2.0 及 I-MUTANT Suite)对突变后

蛋白质稳定性的变化进行预测^[9]。

1.4 序列对比及二级结构预测

使用 Geneious Pro software (Auckland, New Zealand) 软件对蛋白氨基酸序列进行对比分析^[10]。*TNNI3* 蛋白氨基酸序列使用数据库获得序列, *TNNI3* 突变蛋白氨基酸序列通过人工编辑 FASTA 文件获得。野生及突变蛋白氨基酸序列对比后进一步进行二级结构预测, 对比野生及突变蛋白二级结构的变化。

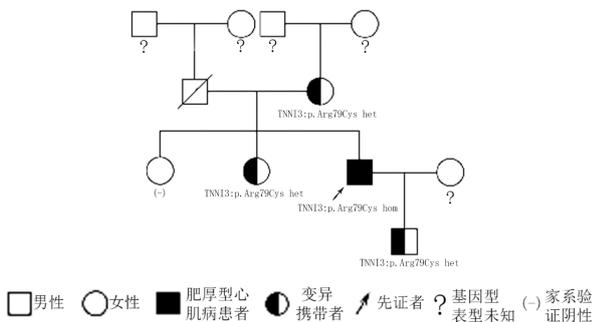
1.5 蛋白质三级结构构建

为进一步了解蛋白突变对蛋白结构造成的影响, 我们进一步使用计算机对野生及突变的蛋白质进行蛋白质结构预测。本研究中我们使用 Robetta (<https://robetta.bakerlab.org/>)^[11] 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)^[12] 2 种方法对蛋白结构进行预测, 对于计算机预测的蛋白质结构进行对比。

2 结果

2.1 肥厚型心肌病家系分析

本研究先证者 2017 年开始发现心电图异常, 因其父亲 40 岁时猝死, 患者异常焦虑, 反复至医院就诊, 均未能明确原因。2020 年 10 月患者来我院门诊就诊, 冠脉 CTA 及心脏超声初步筛查未见明显异常。为进一步寻找病因至我科心肌病中心就诊, 经心脏超声及心脏磁共振检查, 明确诊断为非梗阻性肥厚型心肌病。该患者肥厚部位位于室间隔中远段, 门诊心脏超声检查容易漏诊。对患者进行家系调查分析, 患者母亲、2 个姐姐及患者儿子均不符合肥厚型心肌病诊断标准。患者父亲于 40 岁猝死, 具体原因不详, 是否存在心肌病无法考证。结合先证者及其直系亲属基因筛查结果, 对该家系进行分析, 发现该基因突变可能通过不同于经典单基因遗传的其他遗传模式导致肥厚型心肌病 (图 2)。



注: 黑色箭头所指处为突变位点。

图 2 肥厚型心肌病家系系谱图

Figure 2 Pedigree of hypertrophic cardiomyopathy

2.2 候选变异的基因分析

根据二代测序结果, 对遗传性心肌病基因所有外显子编码区及其侧翼区序列进行筛查, 共得到

142 个与心肌病相关的突变位点。经过一代测序验证后, 受检者未携带目前已知的与单基因遗传肥厚型心肌病相关致病基因的明确致病突变。先证者携带 *TNNI3* 基因 5 号外显子 p. Arg79Cys 的纯合突变 (图 3)。先证者母亲、其中 1 个姐姐及儿子携带 *TNNI3* 基因杂合突变, 另外 1 个姐姐未携带 *TNNI3* 基因突变。通过对致病突变基因进一步论证后, 考虑 *TNNI3* 基因纯合突变为先证者肥厚型心肌病的致病基因。

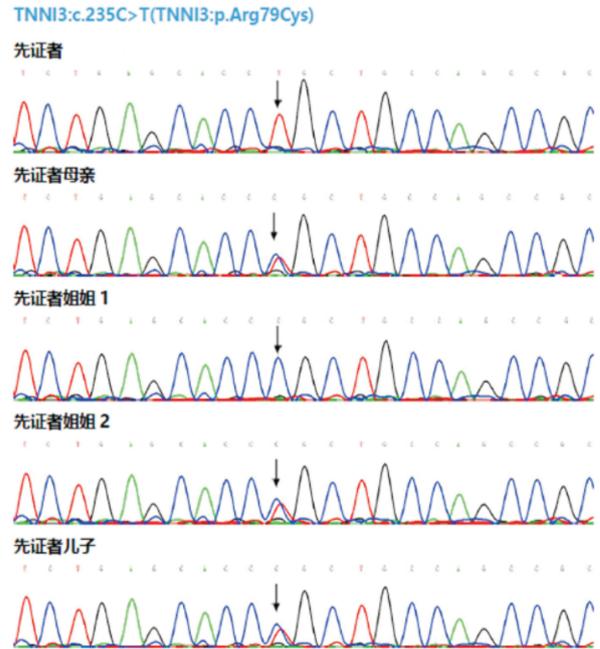


图 3 *TNNI3* 基因测序峰图

Figure 3 The sequencing analysis of *TNNI3* in the family

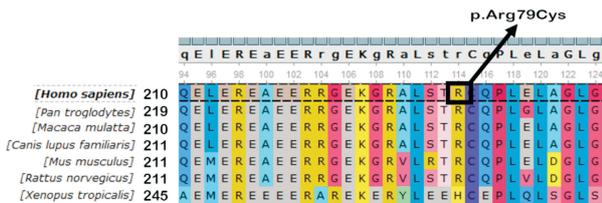
2.3 生物信息学预测结果

受检者携带了 *TNNI3* 基因 c. 235C>T 纯合错义变异 (*TNNI3*:p. Arg79Cys hom), 查询人群频率数据库发现该变异为罕见变异 (千人基因组: 0.00119808, ESP6500: 无, ExAC: 0.0004)。本研究进行了多个生物信息预测软件交叉预测, 结果多为有害, SIFT 为“D”, Polyphen-2 为“D”, MutationTaster_pred 为“D”, VEST3 评分为“0.292”。改变以导致 *TNNI3* 蛋白氨基酸由极性带正电荷的精氨酸变为极性不带电荷的半胱氨酸, 提示该变异所致的氨基酸改变可能会对蛋白功能产生影响。进一步对突变后蛋白质稳定性进行预测, I-MUTANT 预测突变后蛋白质自由能变化值为 -0.01 Kcal/mol, I-MUTANT Suite 预测变后蛋白质自由能变化值为 -0.64 Kcal/mol, 2 个结果均提示突变后蛋白质稳定性降低。查询数据库发现该位置的氨基酸在脊椎动物中保守性较好 (图 4)。

2.4 蛋白质结构预测结果

Geneious Pro 软件对野生型及突变型蛋白质进行二级结构预测, 结果提示突变的氨基酸位点

于转角区域,对比突变的 *TNNI3* 及野生型 *TNNI3* 蛋白质二级结构未见明显变化(图 5)。该突变位点由极性带正电荷的精氨酸变为极性不带电荷的半胱氨酸,且该位点恰好位于二级结构的转角区域,推测该突变将导致蛋白质三级结构的改变。为了进一步验证,本研究使用 Robetta 和 SWISS-MODEL 2 个蛋白质三级结构预测工具对蛋白质三级结构进行预测。结果发现,该突变位点导致 *TNNI3* 蛋白第 79 位氨基酸由精氨酸变成半胱氨酸。2 种氨基酸极性不同,精氨酸带正电荷,半胱氨酸不带电荷,由于极性不同导致突变的蛋白质氨基酸相互作用改变,最终引起蛋白质三级结构的改变。另一方面,2 种氨基酸侧链基团不同,精氨酸不含硫,而半胱氨酸为含硫氨基酸,含硫氨基酸对蛋白质三级结构产生重要影响。预测结果提示是该突变引起蛋白三级结构转角处折叠的角度发生了变化,导致蛋白的空间结构发生了变化,这一变化可能导致蛋白功能的变化(图 6)。



注:黑色箭头标记处为突变位点。

图 4 *TNNI3* 突变位点在脊柱动物中的氨基酸同源性
 Figure 4 Sequence homology analysis of amino acid of *TNNI3* in vertebrates

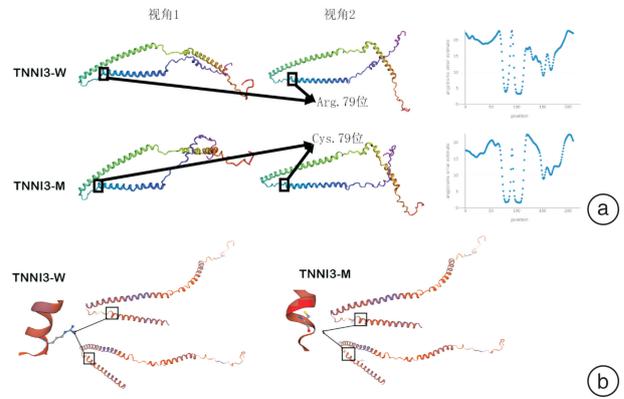


图 5 野生型 (*TNNI3*-W) 及突变型 (*TNNI3*-M) *TNNI3* 蛋白二级结构预测结果
 Figure 5 The prediction results of protein secondary structure by Geneious Pro software

3 讨论

肥厚型心肌病是一种全球性疾病,是最常见的遗传性心脏病之一,患病率超过千分之二^[13]。其导致的猝死,尤其是青少年的猝死,在全球范围内引起广泛的重视^[14]。识别与家族性肥厚型心肌病相关的新突变和基因对于疾病的防治,特别是对家族性肥厚型心肌病家族成员的临床及遗传监测,具

有重要的意义。目前主流观点认为肥厚型心肌病是一种常染色体显性遗传病,致病基因以杂合突变为^[15-17]。本研究中,我们采用二代测序技术,发现了 1 例导致肥厚型心肌病的罕见纯合致病突变。



a: Robetta 方法预测结果; b: SWISS-MODEL 方法预测结果。

图 6 野生型 (*TNNI3*-W) 及突变型 (*TNNI3*-M) *TNNI3* 蛋白三级结构计算机预测结果

Figure 6 The prediction results of protein tertiary structure by Robetta and SWISS-MODEL

本研究先证者的父亲于 40 岁时猝死,具体原因不详。先证者 3 年前开始发现心电图异常,后明确为肥厚型心肌病。对先证者进行直系亲属筛查,未发现其他肥厚型心肌病患者,尽管按照家族性肥厚型心肌病诊断标准^[18],该病例不符合家族性肥厚型心肌病诊断,但考虑到该患者家系相对较小,家族性肥厚型心肌病亦不能排除,需要对该家系继续随访。

对先证者及其直系亲属进行全基因组二代测序,发现受检者携带肥厚型心肌病相关纯合错义变异 *TNNI3* 基因 c. 235C>T (p. Arg79Cys hom)。Kimura 等^[19]的研究表明,有 5 例无血缘关系的肥厚型心肌病患者携带该变异,但在家系里未呈现共分离;同时还有对照携带该变异。Mogensen 等^[20]的研究发现在 748 例肥厚型心肌病患者中有 1 例携带该变异,该患者具体表型未知,是否携带其他致病突变未知;未进行家系共分离情况分析;同时也有同种族健康对照携带该变异。

Wu 等^[21]研究发现常见基因变异 (*TNNI3* 基因 p. Arg79Cys) 也是导致肥厚型心肌病发病的重要原因,且肥厚型心肌病发病存在非孟德尔遗传模式。结合患者生物信息学预测结果,考虑该变异为导致先证者肥厚型心肌病的致病基因。与前人研究发现不同的是,本研究发现该家系中只有携带纯合突变的先证者发病,而家系中其他携带该基因的杂合突变,目前均未出现心肌肥厚表现。本研究提示携带该致病基因突变的杂合突变并不是导致肥厚型心肌病的单一因素,这也与 Wu 等^[21]的研究

结果相吻合。携带者是否发病除了与致病基因相关外,还可能与环境及其他原因如基因连锁、基因累积效应等有关^[22]。肥厚型心肌病的基因型与临床表型之间复杂的关系,需要我们进一步去探索。

为了进一步研究该突变对蛋白的影响,本研究利用计算机对野生型及突变型的蛋白质二级及三级结构进行了预测。Geneious Pro 软件蛋白质二级结构预测结果提示该突变位点位于蛋白质转角区域,氨基酸的改变对于蛋白质的二级结构并未产生影响。进一步使用 Robetta 和 SWISS-MODEL 2 个预测工具对蛋白质三级结构进行模拟。研究发现 SWISS-MODEL 模拟的蛋白质三级结构与 Robetta 不完全相同,但相同的是由于突变位点的氨基酸发生变化,导致蛋白质空间结果发生了改变。计算机对蛋白质三级结构的预测存在一定的局限性,但对研究突变是否能导致蛋白质空间结果的变化具有重要的指导意义,2 种模型预测结果提示该突变位点对 *TNNI3* 蛋白功能能够产生影响。

本研究报道了 *TNNI3* 基因 p. Arg79Cys 罕见纯合错义变异导致肥厚型心肌病。家系分析及基因检测结果提示肥厚型心肌病的基因型与临床表型之间关系相当复杂,打破了我们传统的对肥厚型心肌病常染色体显性遗传的认识,丰富了肥厚型心肌病基因型与临床表型的关系。计算机模拟对于蛋白质二级结构及三级结构的预测,提示了该突变对蛋白质结构造成的影响,具体的功能验证尚需要进一步细胞及动物层面的验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 林丽容,卢荔红,胡雪群,等. 家族性肥厚型心肌病 MYBPC3 基因变异及其临床表型分析[J]. 临床心血管病杂志,2021,37(6):557-560.

[2] Salazar-Mendiguchía J, Ochoa JP, Palomino-Doza J, et al. Mutations in TRIM63 cause an autosomal-recessive form of hypertrophic cardiomyopathy[J]. Heart, 2020,106(17):1342-1348.

[3] Dorsch LM, Schuldt M, dos Remedios CG, et al. Protein Quality Control Activation and Microtubule Remodeling in Hypertrophic Cardiomyopathy[J]. Cells, 2019,8(7).

[4] 段丽琴,李琼,任毅,等. *TNNI3* 基因 p. Arg162Gln 罕见纯合突变所致肥厚型心肌病一家系[J]. 中华心血管病杂志,2019,47(12):1008-1010.

[5] Pantou MP, Gourzi P, Gkouziouta A, et al. A case report of recessive restrictive cardiomyopathy caused by a novel mutation in cardiac troponin I (*TNNI3*) [J]. BMC Med Genet, 2019,20(1):61.

[6] Tao Q, Yang J, Cheng W, et al. A Novel *TNNI3* Gene Mutation (c. 235C>T/ p. Arg79Cys) Found in a Thirty-eight-year-old Women with Hypertrophic Cardiomyopathy[J]. Open Life Sci, 2018,13:374-378.

[7] Ciabatti M, Fumagalli C, Beltrami M, et al. Prevalence, causes and predictors of cardiovascular hospitalization in patients with hypertrophic cardiomyopathy

[J]. Int J Cardiol, 2020,318:94-100.

[8] Yang Q, Wang B, Wang J, et al. Analysis of genotype-phenotype correlation for a novel MYH7-D554Y mutation identified in an ethnic Han Chinese pedigree affected with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2018,35(5):667-671.

[9] Mathur MC, Kobayashi T, Chalovich JM. Some cardiomyopathy-causing troponin I mutations stabilize a functional intermediate actin state [J]. Biophys J, 2009,96(6):2237-2244.

[10] Doevendans PA, Glijnis PC, Kranias EG. Leducq Transatlantic Network of Excellence to Cure Phospholamban-Induced Cardiomyopathy (CURE-PLaN) [J]. Circ Res, 2019,125(7):720-724.

[11] Hammer E, Goritzka M, Ameling S, et al. Characterization of the human myocardial proteome in inflammatory dilated cardiomyopathy by label-free quantitative shotgun proteomics of heart biopsies[J]. J Proteome Res, 2011,10(5):2161-2171.

[12] Yu H, He X, Liu X, et al. A novel missense variant in cathepsin C gene leads to PLS in a Chinese patient: A case report and literature review[J]. Mol Genet Genomic Med, 2021,9(7):e1686.

[13] Maron BJ, Rowin EJ, Maron MS. Paradigm of Sudden Death Prevention in Hypertrophic Cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2019,125(4):370-378.

[14] Husser D, Ueberham L, Jacob J, et al. Prevalence of clinically apparent hypertrophic cardiomyopathy in Germany-An analysis of over 5 million patients[J]. PLoS One, 2018,13(5):e0196612.

[15] Teekakirikul P, Zhu W, Huang HC, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: An Overview of Genetics and Management[J]. Biomolecules, 2019,9(12).

[16] Wolf CM. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics and clinical perspectives[J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2019,9(Suppl 2):S388-S415.

[17] Kitaoka H, Kubo T, Doi YL. Hypertrophic Cardiomyopathy-A Heterogeneous and Lifelong Disease in the Real World[J]. Circ J, 2020,84(8):1218-1226.

[18] Guerrier K, Anderson JB, Pratt J, et al. Correlation of precordial voltages to left ventricular mass on echocardiogram in adolescent patients with hypertrophic cardiomyopathy compared with that in adolescent athletes[J]. Am J Cardiol, 2015,115(7):956-961.

[19] Kimura A, Harada H, Park JE, et al. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Nat Genet, 1997,16(4):379-382.

[20] Mogensen J, Murphy RT, Kubo T, et al. Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy [J]. J Am Coll Cardiol, 2004,44(12):2315-2325.

[21] Wu G, Liu L, Zhou Z, et al. East Asian-Specific Common Variant in *TNNI3* Predisposes to Hypertrophic Cardiomyopathy[J]. Circulation, 2020,142(21):2086-2089.

[22] Gurtner C, Hug P, Kleiter M, et al. YARS2 Missense Variant in Belgian Shepherd Dogs with Cardiomyopathy and Juvenile Mortality[J]. Genes (Basel), 2020,11(3).

(收稿日期:2022-01-06)