

Case Report Article

Evaluation of Genome in Early Familial Coronary Artery Disease: A Case Report

Mohammad Javad Ghorbani^{1,2} , Nematollah Razmi^{3*} , Seyed Mohammad Bagher Taber⁴ ,
Mohammad Javad Zibaeenezhad⁵ , Hamid Reza Goodarzi² 

¹Department of Genetics,
School of Basic Sciences,
Fars Science & Research
Branch, Islamic Azad
University, Marvdasht, Iran.

²Department of Genetics,
School of Basic Sciences,
Marvdasht Branch, Islamic
Azad University, Marvdasht,
Iran.

³Department of
Biochemistry, School of
Basic Sciences, Shiraz
Branch, Islamic Azad
University, Shiraz, Iran.

⁴Department of Medical
Genetics, School of Basic
Sciences, Shiraz University
of Medical Sciences, Shiraz,
Iran.

⁵Department of Cardiology,
School of Medicine, Shiraz
University of Medical
Sciences, Shiraz, Iran.

***Corresponding Author:**
Nematollah Razmi;
Department of Biochemistry,
School of Basic Sciences,
Shiraz Branch, Islamic Azad
University, Shiraz, Iran.

Email:
doctor.n.razmi@gmail.com

Received: 2 Jan, 2019
Accepted: 4 May, 2019

Abstract

Background and Objectives: Coronary artery diseases (CAD) are the most common cause of death in Iran and worldwide. Myocardial infarction (MI) is a complex multifactorial and the most severe type of CAD. Early onset MI in first degree relatives could be considered as an independent risk factor for CAD. This study was performed to investigate the genetic cause of early onset familial CAD.

Case Report: The patient was a 49-year-old female, who had an acute MI at the age of 45. Evaluation of family history indicated that her father, older brother, aunts, and male cousin were also diagnosed to have MI, and had not any diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia, diabetes, obesity, and also they did not use alcohol and tobacco. The c.6241C>T (p.Arg2081Trp) mutation was identified in *ABCA1* gene in heterozygous state (CT) in proband using Whole Exome Sequencing. Mutation was confirmed by PCR and Sanger sequencing. This mutation in heterozygous state was found in all patients and not in others. This findings show that *ABCA1* gene could be a possible cause of early onset familial CAD.

Keywords: Coronary artery disease; Whole exome sequencing; ATP binding cassette transporter 1.

DOI: 10.29252/qums.13.4.73

بررسی ژنوم افراد مبتلا به بیماری عروق کرونر زودرس خانوادگی: گزارش مورد

محمدجواد قربانی^{۱،۲}، نعمت‌الله رزمی^{۳*}، سید محمدباقر تابعی^۴، محمدجواد زیبایی‌نژاد^۵، حامد رضا گودرزی^۶

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های عروق کرونر، شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر در ایران و جهان محسوب می‌شوند. انفارکتوس میوکارد، یک بیماری مولتی فاکتوریال پیچیده و شدیدترین حالت بیماری عروق کرونر است. همچنین انفارکتوس میوکارد زودرس در خویشاوندان درجه یک می‌تواند به عنوان یک فاکتور خطر مستقل برای بیماری عروق کرونر مطرح باشد. در این مطالعه به تشخیص علت ژنتیکی بیماری عروق کرونر زودرس خانوادگی پرداخته شد.

معرفی مورد: بیمار، خانم ۴۹ ساله‌ای است که در سن ۴۵ سالگی یک انفارکتوس میوکارد حاد داشت. ارزیابی سابقه خانوادگی نشان داد پدر، برادر بزرگتر، عمه‌ها و پسر عمه بیمار، مبتلا به انفارکتوس میوکارد بوده و هیچ ویژگی بالینی برای هیپرکلسترولمی خانوادگی، دیابت و چاقی نداشته‌اند، همچنین آن‌ها الکل و دخانیات مصرف نمی‌کردند. جهش

c. 6241 C>T و p. Arg 2081 Trp در ژن *ABCA1* با حالت هتروزیگوس CT در پروباند، به وسیله توالی‌یابی اگزومی شناسایی گردید. جهش با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توالی‌یابی Sanger مورد تأیید قرار گرفت. این جهش با حالت هتروزیگوس در همه افراد مبتلا یافت شد و در سایرین پیدا نشد.

این نتایج نشان می‌دهد ژن *ABCA1* می‌تواند یک علت احتمالی بیماری عروق کرونر زودرس خانوادگی باشد.

کلیدواژه‌ها: بیماری عروق کرونر؛ توالی‌یابی اگزومی؛ آت پ انتقال‌دهنده کاست باند شونده ۱.

^۱گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، مرودشت، ایران.

^۲گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرودشت، مرودشت، ایران.

^۳گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران.

^۴گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

^۵گروه قلب و عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

نعمت‌الله رزمی؛ گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

doctor.n.razmi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۱۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ghorbani MJ, Razmi N, Bagher Tabei SM, Zibaenezhad MJ, Goodarzi HR.
Evaluation of genome in early familial coronary artery disease: A Case Report.
Qom Univ Med Sci J 2019;13(4):73-79. [Full Text in Persian]

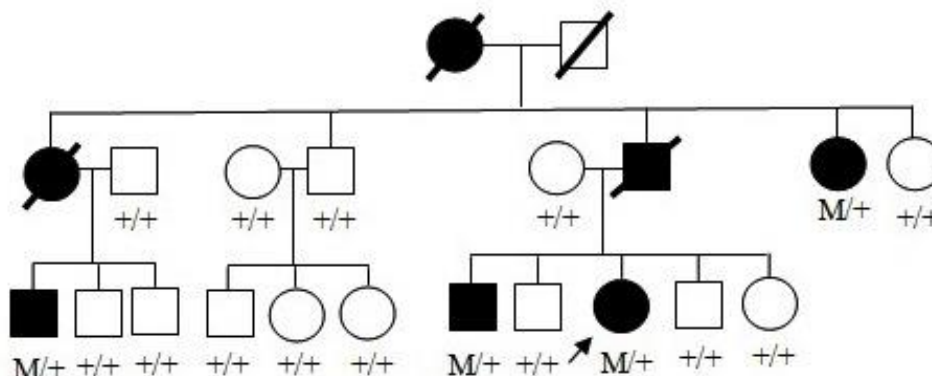
مقدمه

شیوع بیماری‌های قلبی - عروقی در کشورهای درحال توسعه، به سرعت رو به افزایش است (۱). در ایران نیز بیماری‌های قلبی - عروقی، شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر هستند (۲). طبق گزارش اخیر مرکز قلب و عروق وزارت بهداشت ایران، روزانه حدود ۳۰۰ نفر در ایران به دلیل بیماری‌های قلبی - عروقی فوت می‌کنند (۳). وجود سابقه خانوادگی ابتلا به بیماری عروق کرونر در اعضای درجه اول خانواده، به خصوص بروز در سن پایین که بیماری عروق کرونر زودرس (کمتر از ۵۵ سال در مردان و کمتر از ۶۵ سال در زنان) (۴) نامیده می‌شود، به عنوان یک ریسک فاکتور مستقل برای بیماری‌های عروق کرونر تلقی می‌گردد (۵). قدرت وراثت‌پذیری در تعیین خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر، با افزایش تعداد بستگان درجه اول مبتلا و با سن بروز کمتر، افزایش می‌یابد (۶). توالی‌یابی کل اگزون‌های ژنوم (اگزوم)، امروزه به پرکاربردترین ابزار برای تشخیص بیماری‌های نادر ژنتیکی تبدیل شده است (۷).

توالی‌یابی اگزومی، یک ابزار غربالگری فوق‌العاده ارزشمند برای تشخیص بالینی بیماری‌های وراثتی قلبی - عروقی، به خصوص در موارد مرگ ناگهانی قلبی، بدون تشخیص قطعی و علت مشخص است (۸). اگرچه توالی‌یابی اگزومی، یک روش با توان توالی‌یابی بالا بوده، اما برای استفاده بالینی و تشخیصی تأیید نشده است (۹)؛ بنابراین جهش باید توسط روش توالی‌یابی Sanger تأیید شود. شناخت استعداد ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی می‌تواند از مهم‌ترین راه‌های پیشگیری، به ویژه در افراد دارای سابقه مثبت خانوادگی ابتلا به بیماری عروق کرونر زودرس باشد.

شرح مورد

بیمار، خانم ۴۹ ساله‌ای است که در سن ۴۵ سالگی دچار انفارکتوس میوکارد حاد شده بود. ارزیابی سابقه خانوادگی نشان داد پدر، برادر بزرگتر، عمه‌ها و پسرعمه بیمار، مبتلا به انفارکتوس میوکارد بوده‌اند. آنالیز شجره، الگوی وراثتی اتوزومال غالب را برای انفارکتوس میوکارد زودرس نشان می‌دهد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: شجره. افراد مبتلا به انفارکتوس میوکارد توسط مربع‌های توپر (مردان) و دایره‌های توپر (زنان) و افراد سالم توسط مربع‌ها و دایره‌های توخالی نشان داده شده‌اند. مرگ افراد به وسیله (/) و پروباند توسط یک پیکان (↗) مشخص است. در شکل، "M" نشان‌دهنده آلل جهش‌یافته و "+" نشان‌دهنده آلل طبیعی و نرمال است.

جهت رد بیماری هیپرکلسترولمی خانوادگی؛ میزان HDL، LDL، TG و کلسترول پلاسما سنجیده شد. در این مطالعه، ۵ خانواده با ویژگی‌های یادشده بررسی شدند. با این حال، تنها در خانواده مورد مطالعه، یک جهش Missense با حالت هتروزیگوس در همه افراد مبتلا گزارش شد که این جهش در افراد سالم مشاهده نشد. در سایر خانواده‌ها نیز جهش در افراد سالم دیده شد. ویژگی‌های بالینی افراد مبتلا در خانواده مورد بررسی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

افراد مبتلا به بیماری عروق کرونر زودرس براساس یافته‌های آنژیوگرافی انتخاب شدند. با توجه به اینکه در بروز بیماری عروق کرونر و انفارکتوس میوکارد، هم عوامل محیطی و هم وراثتی دخیل هستند؛ لذا جهت افزایش شانس شناسایی عوامل ژنتیکی، فرم خانوادگی بیماری انتخاب و افراد مبتلا که دارای ریسک فاکتورهای اکتسابی بیماری قلبی - عروقی (از جمله دیابت، هایپرکلسترولمی خانوادگی، مصرف دخانیات و الکل) بودند، از مطالعه حذف شدند.

کد شناسایی فرد مبتلا بر اساس شجره	سن بروز (سال)	جنسیت	سابقه فشارخون	قند خون (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	تری گلیسرید (mg/dl)	کلسترول تام (mg/dl)
III.1	۴۳	مرد	ندارد	۸۹	۱۴۳	۲۸	۱۳۲	۱۹۹
III.7	۴۷	مرد	ندارد	۹۸	۱۲۱	۳۳	۱۳۹	۱۸۶
III.9	۴۵	زن	ندارد	۸۵	۸۷	۳۰	۱۲۴	۱۴۶
II.7	۴۹	زن	ندارد	۹۲	۹۷	۳۶	۱۱۰	۱۵۷

پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه، از همه اعضای خانواده موردبررسی، ۶ - ۵ میلی‌لیتر خون گرفته شد. جهت استخراج DNA از نمونه‌های خون تهیه‌شده، از کیت استخراج High Pure PCR Template Preparation Kit (محصول شرکت Roche Life Science آلمان) استفاده شد. نمونه DNA پروباند، جهت توالی‌یابی اگزومی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید.

Gene & transcript	Variant	Location	Zygosity ^a	Inheritance ^b	Associated disease	OMIM	CADD Score ^c	Polyphen
ABCA1 NM_005502	c.6241C>T pR2081W	q9q 31	Het	AR AD	HDL deficiency, type2 Tangier disease Coronary artery	600046	28	Possibly damaging

تمام عواقب پیش‌بینی شده برای جهش (p.Arg 2081 Trp)

جدول شماره ۳: عواقب پیش‌بینی شده برای جهش *ABCA1* c.۶۲۴۱ C>T (p.Arg ۲۰۸۱ Trp) در ژن

Mutation Assessor	926/96 (95%)
MetalR	(a) آسیدوز 39/96/0
REVEL	(احتمالا منجر به بیماری) 68/9/0
PolyPhen	(احتمالاً آسیب‌زا) 79/9/0
SIFT	(زیان آور) 0/9/96
Codons	TGT/GGC
AA Change	M/R
Position in protein	(f: 161) 170.8
Position in CDS	(f: 67/6) 141.6
Position in transcript	(f: 94.0) 45.6
Consequence	missense variant
Alt	L
Ref	C
Gene	ABCA1
Consequence	96/96/0 (100%)

پرایمرها توسط نرم‌افزار oligo نسخه ۷ طراحی شدند. توالی و
برخی از ویژگی‌های پرایمرهای طراحی شده برای ژن *ABCA1* در

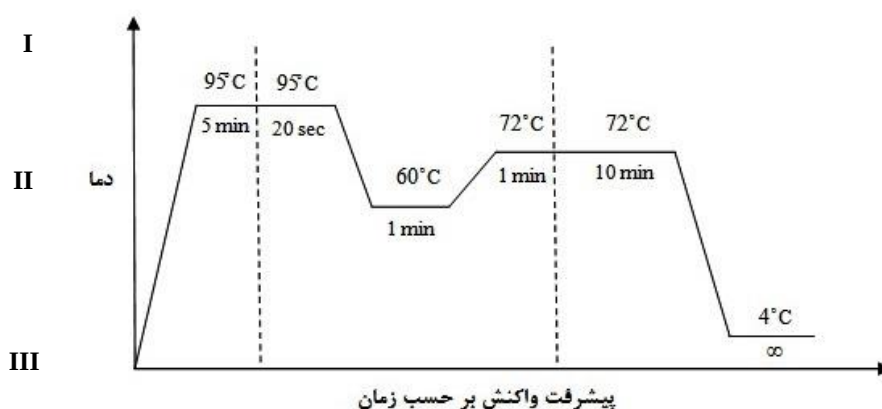
GC%	Tm	طول پرایمر (bp)	پرایمر	ژن
۴۲	۵۹	۲۴	AACTAAATGGCCTTTTTCCTTCCC	Forward
۴۸	۶۱	۲۳	AAAACATCCCACAGTGAGGAACC	Reverse

فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی محاسبه شده برای پلی مورفسم عروق کرونر و انفارکتوس میوکارد در جدول شماره ۵ نشان داده شده است.

جدول شماره ۵: فراوانی ژنوتیپی در ژن *ABCA1* و میزان اثر آن در بیماری عروق کرونر و انفارکتوس میوکارد

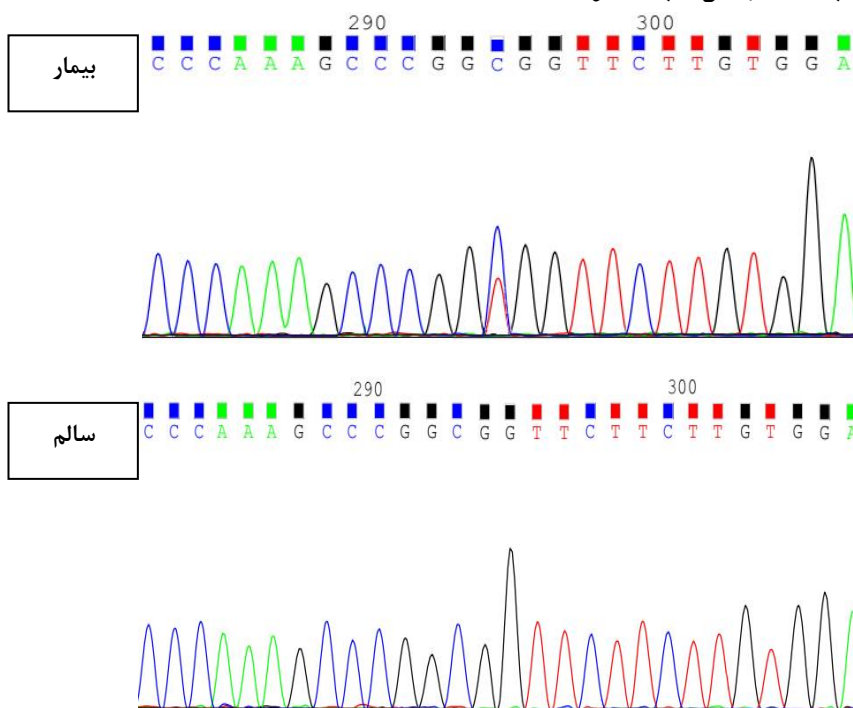
p	OR (95% CI)	خانواده مورد بررسی (درصد)	پروژه هزار ژنوم (درصد)	<i>ABCA1</i> c.6241C/T
-	(Ref) ۱	۱۳ (۰/۷۶)	۱۰۰۳ (۰/۹۹۷)	CC
<۰/۰۰۰۱	(۲۵/۹۱۸-۹۳/۱۴) ۱۵۴/۳۰	۴ (۰/۲۴)	۲ (۰/۰۰۲)	CT
۰/۰۵۲۶	(۰/۶۳۶-۹۶/۰۹) ۲۴/۷۷	۰ (۰)	۱ (۰/۰۰۱)	TT

با توجه به دمای ذوب پرایمر، یک شیب دمایی برای دستگاه ترموسیکلر تعریف شد و دمای بهینه برای



شکل شماره ۲: پروفایل حرارتی واکنش PCR برای ژن *ABCA1*

بعد از تکثیر ناحیه C6241 T ژن *ABCA1*، توالی‌یابی Sanger انجام شد (شکل شماره ۳). تحلیل نتایج حاصل از توالی‌یابی Sanger نشان داد همه افراد مبتلا، جهش را به صورت



شکل شماره ۳: تصویر کروماتوگرام ناحیه جهش یافته ژن *ABCA1* محل جهش توسط یک پیکان (↗) نشان داده شده است.

بحث

جهش به صورت هموزیگوت در ژن *ABCA1*، منجر به بیماری تانجر (Tangier disease) می شود. بیماری تانجر، یک بیماری نادر با الگوی وراثتی اتوزومال مغلوب است که به وسیله جهش در ژن *ABCA1* ایجاد شده و از ویژگی های اصلی این بیماری می توان به سطح پایین (نزدیک به صفر)، لیپوپروتئین با چگالی بالای کلسترول (HDL)، تجمع کلسترول در چندین بافت، لوزه های بزرگ نارنجی، نوروباتی محیطی و شتاب بروز آترواسکلروز اشاره کرد (۱۰). افراد مبتلا به بیماری تانجر با افزایش ریسک ابتلا به آترواسکلروز مواجه اند (۱۱، ۱۲). سطح پلاسمایی HDL نیز به طور معکوس با بیماری آترواسکلروز قلبی - عروقی در ارتباط است. جهش به صورت هتروزیگوت در ژن *ABCA1* منجر به نقص فامیلی HDL می شود و یکی از عوامل شایع کاهش HDL-C در جمعیت عمومی است (۱۳، ۱۴). اگرچه بیان این مطلب با توجه به جهش های متعدد که در ساختار ژن *ABCA1* کشف شده می تواند رخ دهد، بحث برانگیز است (۱۵). جهش (p.Arg 2081 Trp) c.6241 C>T در ژن *ABCA1*، در انتهای کربوکسیل (C- ترمینال) پروتئین *ABCA1* اتفاق می افتد. این جهش اولین بار در سال ۲۰۰۱ به وسیله Huang و همکاران معرفی شد. آن ها با آنالیز توالی ژن *ABCA1* بر روی دو خواهر مبتلا به بیماری تانجر در یک خانواده و یک خانواده مبتلا به نقص فامیلی HDL، در حالی که هر دو پروباند بیماری عروق کرونر را نشان داده بودند، جهش (p.Arg 2081 Trp) c.6241 C>T را به صورت هموزیگوت در افراد مبتلا به بیماری تانجر گزارش کردند. همچنین بررسی توالی ژن *ABCA1* بر روی افراد مبتلا به نقص فامیلی HDL، حذف چهار جفت بازی (CGCC) به صورت هموزیگوت از نوکلئونید ۳۷۸۷-۳۷۹۰ را نشان داد (۱۶). در پژوهش حاضر جهش (p.Arg 2081 Trp) c.6241 C>T به صورت هتروزیگوت در چهار فرد مبتلا به بیماری عروق کرونر

و انفارکتوس میوکارد مشاهده گردید؛ این در حالی است که این جهش در سایر اعضای خانواده مشاهده نشد. بعد از مقایسه نتایج حاصل از پژوهش حاضر با داده های حاصل از پروژه هزار ژنوم شامل ۱۰۰۶ نفر، از آزمون کای اسکور جهت بررسی تفاوت فراوانی ژنوتیپی میان دو گروه کنترل و بیمار استفاده شد و میزان $\chi^2 = ۱۵۶/۰۷۴$ با سطح معنی داری $p < ۰/۰۰۰۱$ به دست آمد؛ بنابراین از آنجایی که مقدار p کمتر از ۰/۰۵ است، می توان این گونه نتیجه گرفت که تفاوت معنی داری در توزیع ژنوتیپی پلی مورفیسم *ABCA1* میان گروه بیمار و کنترل وجود دارد. در ادامه، برای تعیین میزان اثر هر ژنوتیپ بر خطر بیماری عروق کرونر و انفارکتوس میوکارد، از آزمون Odds ratio استفاده شد. این بررسی نشان داد ژنوتیپ CT سبب افزایش ۱۵۴/۳۰ برابری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر در بروز بیماری می شود ($p < ۰/۰۰۰۱$)، (OR=۱۵۴/۳۰، ۹۵٪ CI=۲۵/۹۱۸-۹۳/۱۴).

با توجه به نتایج جدول شماره ۵ می توان این گونه استنباط کرد که جهش (p.Arg 2081 Trp) c.6241 C>T به صورت هتروزیگوت می تواند منجر به بیماری عروق کرونر و انفارکتوس میوکارد شود. Zwarts و همکاران در سال ۲۰۰۲، چندین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) را در نواحی غیر کد کننده *ABCA1* از جمله پروموتور، ناحیه غیر کد کننده انتهای

5' prime untranslated region 5 و اینترون شماره ۱ که ممکن است در تنظیم بیان ژن دخیل باشند، شناسایی و اثر فنوتیپی آن ها را در ۸۰۴ مرد هلندی که بیماری عروق کرونر در آنان به اثبات رسیده بود مورد آزمایش قرار دادند، نتایج نشان داد این نواحی می توانند بر بیان ژن تأثیر گذاشته و در شدت بروز آترواسکلروز بدون تأثیر بر میزان لیپید مؤثر باشند (۱۷). با توجه به نتایج Zwarts و همکاران، ممکن است نواحی غیر کد کننده که در پژوهش حاضر بررسی نشد در بروز بیماری تأثیر داشته باشند.

References:

1. Lydia K, Erastus M, Anne K, Jane M, Chrispine OO, Judith K, et al. Stroke distribution patterns and characteristics in Kenya's leading public health tertiary institutions: Kenyatta National Hospital and Moi Teaching and Referral Hospital. *Cardiovasc J Afr* 2018;29(2):68-72. PubMed
2. Mohseni J, Kazemi T, Maleki MH, Beydokhti H. A systematic review on the prevalence of acute myocardial infarction in Iran. *Heart Views* 2017;18(4):125-32. PubMed
3. Biglu MH, Ghavami M, Biglu S. Cardiovascular diseases in the mirror of science. *J Cardiovasc Thorac Res* 2016;8(4):158-63. PubMed
4. Schildkraut JM, Myers RH, Cupples LA, Kiely DK, Kannel WB. Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study. *Am J Cardiol* 1989;64(10):555-9. PubMed
5. Dai X, Wiernek S, Evans JP, Runge MS. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World J Cardiol* 2016;8(1):1-23. PubMed
6. Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic--epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 1980;61(3):503-8. PubMed
7. Prows CA, Tran G, Blosser B. Whole exome or genome sequencing: nurses need to prepare families for the possibilities. *J Adv Nurs* 2014;70(12):2736-45. PubMed
8. Seidelmann SB, Smith E, Subrahmanyam L, Dykas D, Abou Ziki MD, Azari B, et al. Application of whole exome sequencing in the clinical diagnosis and management of inherited cardiovascular diseases in adults. *Circ Cardiovasc Genet* 2017;10(1). PubMed
9. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2014;59(1):5-15. PubMed
10. Brunham LR, Kang MH, Van Karnebeek C, Sadananda SN, Collins JA, Zhang LH, et al. Clinical, biochemical, and molecular characterization of novel mutations in ABCA1 in families with Tangier disease. *JIMD Rep* 2015;18:51-62. PubMed
11. Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, Marcil M, Roomp K, Zwarts KY, et al. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J Clin Invest* 2000;106(10):1263-70. PubMed
12. van Dam MJ, de Groot E, Clee SM, Hovingh GK, Roelants R, Brooks-Wilson A, et al. Association between increased arterial-wall thickness and impairment in ABCA1-driven cholesterol efflux: an observational study. *Lancet* 2002;359(9300):37-42. PubMed
13. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004;305(5685):869-72. PubMed
14. Alrasadi K, Ruel IL, Marcil M, Genest J. Functional mutations of the ABCA1 gene in subjects of French-Canadian descent with HDL deficiency. *Atherosclerosis* 2006;181(2):182-19. PubMed
15. Brunham LR, Kastelein JJ, Hayden MR. ABCA1 gene mutations, HDL cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease. *JAMA* 2008;300(17):1997-8. PubMed
16. Huang W, Moriyama K, Koga T, Hua H, Ageta M, Kawabata S, et al. Novel mutations in ABCA1 gene in Japanese patients with Tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency with coronary heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2001;1537(1):71-8. PubMed
17. Zwarts KY, Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Singaraja R, Loubser O, et al. ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effects on plasma lipid levels. *Clin Genet* 2002;61(2):115-25. PubMed