

Original Article

Genomic and bioinformatics analysis of nucleotide changes in the coding regions of the *CCDC103* gene in patients with Tetralogy of Fallot (TOF): A type of Congenital Heart Defects

Zahra Moghadambarati ¹, Mehri Khatami ^{1*}, Mohammad Mehdi Heidari ¹, Mehdi HadadZadeh ²,
Reihane Ghorbanian ¹

ABSTRACT

Background and Aims: Tetralogy of Fallot (TOF) is one of infants' most common types of complex congenital heart defects (CHD). Several molecular mechanisms may play a role in its development, such as mutations in cardiac gene network components, cardiac gene regulatory pathways, dysfunction of cilia-expressing genes, and dysfunction of genes determining the left and right axis of the heart. The present study aimed to investigate the nucleotide changes of the *CCDC103* gene and its relationship with CHD of the TOF type.

Materials and Methods: The present work was conducted for the first time in Iran as a case-control study on 85 children with TOF. The control group involved 56 healthy children without a family history of heart disorders. Touchdown polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing were used to evaluate point mutations in the *CCDC103* gene. Moreover, bioinformatics databases were employed to predict the impact of nucleotide changes on protein structure and function.

Results: A total of five heterozygous single nucleotide changes were detected in this gene (three missense mutations: p.S115R, p.C191R, p.M201V, a synonymous change without amino acid change, and a change in the 3'-UTR region). In addition, bioinformatics results predicted that p.C191R mutation is pathogenic and harmful.

Conclusion: The results indicated that in addition to the genes known in the pathogenesis of TOF, changes in the *CCDC103* gene in the ciliary signaling pathway can play a role in causing heart defects.

Keywords: *CCDC103* gene, Celia, Cardiac development, Congenital heart disease, Tetralogy of Fallot



Citation: Moghadambarati Z, Khatami M, Heidari MM, HadadZadeh M, Ghorbanian R. [Genomic and bioinformatics analysis of nucleotide changes in the coding regions of the *CCDC103* gene in patients with Tetralogy of Fallot (TOF): A type of Congenital Heart Defects]. J Birjand Univ Med Sci. 2024; 31(1): 48-67. [Persian]

DOI [10.61186/JBUMS.31.1.48](https://doi.org/10.61186/JBUMS.31.1.48)

Received: January 27, 2024

Accepted: April 20, 2024

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran

² Department of Cardiac Surgery, Afshar Hospital, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

*Corresponding author:.

Tel: +983531233013

Fax: +983538210644

E-mail: m.khatami@yazd.ac.ir

بررسی ژنومیک و بیوانفورماتیکی تغییرات نوکلئوتیدی نواحی کدینگ ژن *CCDC103* در بیماران مبتلا به تترالوژی فالوت (TOF): یک نوع نقص قلبی مادرزادی

زهرا مقدم براتی^۱، مهری خاتمی^{۱*}، محمد مهدی حیدری^۱، مهدی حدادزاده^۱، ریحانه قربانیان^۱

چکیده

زمینه و هدف: تترالوژی فالوت (TOF) یکی از شایع‌ترین انواع پیچیده از نقایص مادرزادی قلبی (CHD) در نوزادان است. مکانیسم‌های مولکولی متعددی ممکن است در ایجاد آن نقش داشته باشند، مانند جهش در اجزای شبکه ژنی قلب، مسیرهای تنظیم ژن‌های قلبی، اختلال در عملکرد ژن‌های بیان‌کننده مژک و اختلال در عملکرد ژن‌های تعیین‌کننده محور چپ و راست قلب. نقص در عملکرد یا مونتاژ این ساختارها که در تحرک و مهاجرت سلول‌ها نقش دارند، با اختلالات مادرزادی قلب همراه است. هدف مطالعه حاضر، بررسی تغییرات نوکلئوتیدی ژن *CCDC103* و ارتباط آن با نقایص قلبی مادرزادی از نوع TOF است.

روش تحقیق: این مطالعه مورد-شاهدی برای اولین بار در ایران، به صورت مورد-شاهدی، در ۸۵ کودک بیمار مبتلا به TOF و ۵۶ کودک سالم، بدون سابقه خانوادگی اختلالات قلبی به عنوان گروه کنترل انجام شد. برای ارزیابی جهش‌های نقطه‌ای در ژن *CCDC103*، از روش Touchdown PCR و توالی‌یابی Sanger استفاده شد. به منظور پیش‌بینی تأثیر تغییرات نوکلئوتیدی بر روی ساختار و عملکرد پروتئین، از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی استفاده شد.

یافته‌ها: در مجموع ۵ تغییر تک‌نوکلئوتیدی به صورت هتروزیگوت در این ژن شناسایی شد (سه جهش بدمعنی: p.S115R، p.C191R و p.M201V، یک تغییر همنام و بدون تغییر اسید آمینه و همچنین یک تغییر در ناحیه 3'-UTR). نتایج بیوانفورماتیکی نیز پیش‌بینی کردند که جهش p.C191R بیماری‌زا و آسیب‌رسان است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه تأیید می‌کند که علاوه بر ژن‌های شناخته‌شده در بیماری‌زایی TOF، تغییراتی در ژن *CCDC103* در مسیر سیگنالینگ مژگانی نیز می‌تواند در ایجاد نقایص قلبی نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *CCDC103*، مژک، تکوین قلب، تترالوژی فالوت، نقایص قلبی مادرزادی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۳؛ ۳۱(۱): ۶۷-۴۸.

دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

^۲ بخش جراحی قلب، بیمارستان افشار، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

* نویسنده مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

آدرس: یزد- بلوار پژوهش- دانشگاه یزد- دانشکده علوم- گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۳۰۱۳ نمابر: ۰۳۵۳۸۲۱۰۶۴۴ پست الکترونیکی: m.khatami@yazd.ac.ir

مقدمه

در انسان تکوین قلب و سیستم گردش خون، در لایه میانی و یا مزودرم (Mesoderm) و بعد از ۱۵ تا ۱۶ روز از شروع بارداری با مهاجرت سلولهای بنیادی پیش ساز قلب آغاز می شود (۱). تکوین قلب دارای پنج مرحله است: مرحله اول، مهاجرت سلولهای پیش ساز قلبی از خط ابتدایی و مونتاژ هلالهای قلبی در صفحه میوکارد. مرحله دوم، یک پارچگی هلالهای قلبی برای تشکیل لوله قلبی ابتدایی، متشکل از سلولهای ماهیچه قلبی (میوکارد) که توسط یک لایه از سلولهای اندوکارد احاطه شده اند. مرحله سوم، ایجاد شکل حلقه ای قلب که این ساختار به منظور مشخص کردن حفره های قلبی که در مراحل بعدی ایجاد می شوند، به سمت چپ انحراف پیدا می کند. مرحله چهارم، تشکیل دیواره و حفره های قلبی و مرحله پنجم، توسعه و تکوین سیستم هدایت قلب و عروق کرونری. ایجاد عدم تقارن چپ-راست محور بدن و ساختار قلب نیز برای تکوین نرمال قلب بسیار مهم است (۲). نقایص مادرزادی قلبی^۱ (CHD) شایع ترین نقایص مادرزادی هستند که یک درصد از کل تولدها را تحت تأثیر قرار می دهند. CHD یک بیماری پیچیده چندعاملی است که عوامل محیطی و ژنتیکی متعددی، در ایجاد آن نقش دارند، مانند اختلالات کروموزومی و اختلالات تک ژنی، ترانژنهای محیطی و عوامل پیچیده و چندعاملی (۳-۷). از عوامل محیطی شناخته شده ای که در طی رشد جنین، احتمال ایجاد CHD را افزایش می دهند، عبارت اند از عفونت های داخل رحمی، بیماری سرخجه، ترانژنهای شیمیایی مانند اسیدرتینوئیک، آفت کش ها، لیتیوم و هیدروکربن های هالوژنه و همچنین ابتلای مادر به برخی بیماری ها از جمله دیابت، اعتیاد به الکل و لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) (۸). CHD تمام قسمت های قلب، اعم از دهلیزها، بطن ها و عروق قلبی را درگیر می کند. شایع ترین نقایص ساختاری قلب، با توجه به قسمت آسیب دیده آن، بصورت زیر دسته بندی می شوند: ترانژوژی فالوت (TOF)^۲، تنگی دریچه شریانی آئورت (AS)^۳، تنگی دریچه شریانی ریوی (PS)^۴، کوآرکتاسیون آئورت (COA)^۵، مجرای شریانی باز

¹ Congenital Heart Defects

² Tetralogy of fallot

³ Aortic stenosis

⁴ Pulmonary stenosis

(PDA)^۶، نقص دیواره بین دهلیزی (ASD)^۷، نقص دیواره بین بطنی (VSD)^۸، آنژی تریکوسپید (TA)^۹ و جابه جایی شریان های بزرگ (TGA)^{۱۰} (۹، ۱۰). ترانژوژی فالوت (TOF) یکی از شایع ترین انواع بیماری های قلبی مادرزادی است که تخمین زده می شود که در ۳/۳ از هر ۱۰۰۰۰ تولد زنده رخ دهد و ۶/۸ درصد از کل بیماری های مادرزادی قلبی را تشکیل دهد (۱۱). در اکثر موارد، جهش های نقطه ای در ژن هایی ایجاد می شوند که به طور مستقیم یا غیرمستقیم در مورفوژن قلب نقش دارند. مکانیسمی که تغییرات ژنی می توانند رشد و تکوین قلب را مختل کنند، شامل عدم کفایت هاپلوئیدی (Haploinsufficiency) یا کاهش دوز و بیان پروتئین های کد شده توسط این ژن ها است (۱۲). قلب اولین عضوی است که خط تقارن دو جانبه جنین در حال رشد را می شکند. روابط متقابل و هماهنگی مکانی و زمانی در بین مسیرهای سیگنالینگ سلولی، مانند Notch، Nodal، Hedgehog، FGF^{۱۱} و BMP^{۱۲} در ایجاد تقارن چپ و راست در طی جنین زایی اولیه نقش دارند، بنابراین، جهش ها و تغییرات نوکلئوتیدی در ژن های این مسیرهای سلولی، با نقایص قلبی عروقی جنین همراه است (۱۳). مژک (Cilia) های اولیه، اندامک های حسی متصل به غشا و مبتنی بر میکروتوبول ها هستند که در طیف گسترده ای از مسیرهای مختلف سیگنالینگ و هومئوستازی بافت ها با هم هماهنگ می شوند. نقص در عملکرد یا مونتاژ این ساختارهای آنتن مانند، با بیماری ها و اختلالات رشدی به نام سیلوپاتی (Ciliopathies) همراه است (۱۴). نمونه ای از این مژک ها، مژه های اولیه گره ای و قلبی اند که در هماهنگی تکوین قلب جنین نقش دارند، به گونه ای که نقص در این مژک ها، با اختلالات مادرزادی قلب همراه است. در طی رشد قلب جنین، انواع مختلف مژک ها با آرایش زمانی خاصی برای کنترل این فرایند بیان می شوند

⁵ Coarctation of the aorta

⁶ Patent ductus arteriosus

⁷ Atrial septal defect

⁸ Ventricular septal defect

⁹ Tricuspid Artesia

¹⁰ Transposition of the great arteries

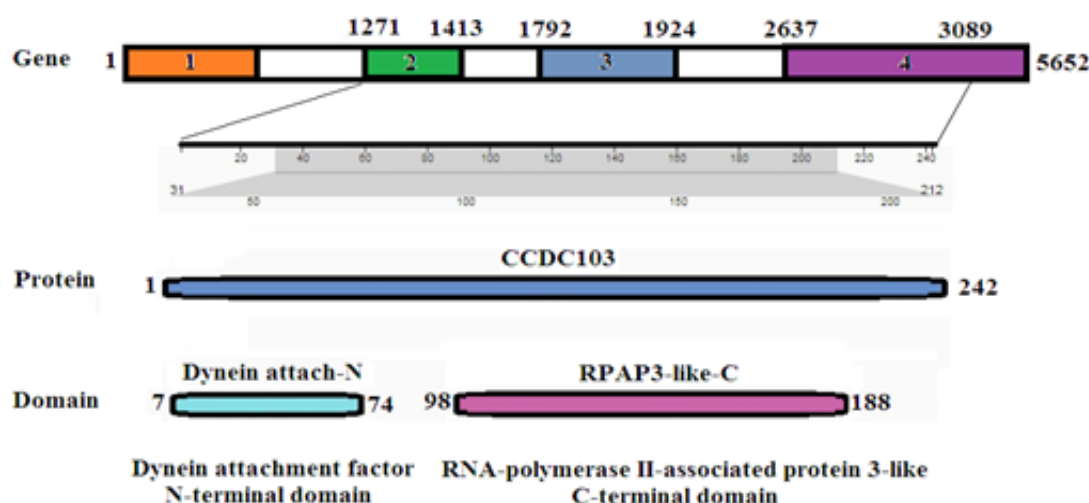
¹¹ Fibroblast growth factor

¹² Bone Morphogenetic Protein

و در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی، در تمایز تدریجی، مورفوژنز و بلوغ قلب مؤثر هستند (۱۵). در گاسترولاسیون، مژک‌های حرکتی و حسی در گره جنینی، نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سیگنالینگ موردنیاز برای ایجاد عدم تقارن چپ و راست قلب دارند، فرایندی که مراحل اولیه مورفوژنز قلب و اتصال عروق به آن را کنترل می‌کند. در نتیجه، نقص در سیگنالینگ‌های دخیل در ایجاد این عدم تقارن، منجر به انواع نقایص قلبی مادرزادی می‌شود (۱۶).

ژن *CCDC103* (Coiled-coil domain-containing protein 103) در موقعیت کروموزومی 17q21.31 قرار دارد و یک پروتئین با دامین مارپیچی الیگومریک را کد می‌کند که به بازوهای داینئین آکسونوم مژه‌ای متصل می‌شود و منجر به تسهیل حرکت تاژک‌ها و مژک‌ها می‌گردد (یک فاکتور چسبندگی داینئین است که برای تحرک مژه موردنیاز است). پروتئین *CCDC103* یک پروتئین کوچک با خواص بیوفیزیکی غیرمعمول است که مونتاژ بازوهای داخلی و خارجی داینئین آکسونوم‌های مژگانی، تعیین تقارن چپ/راست محور بدن و ایجاد شکل حلقوی قلب را کنترل می‌کند (۱۷). مطالعات آزمایشگاهی نیز نشان داده‌اند که *CCDC103* الیگومرهای خودسازماندهی را تشکیل می‌دهد که به‌طور دوره‌ای به میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود و می‌تواند پایداری میکروتوبول‌های مونتاژشده را افزایش دهد و همچنین میانجی انواع عملکردهای بیولوژیکی، از جمله انتقال مواد درون سلولی، تنظیم و کنترل قطبیت سلولی، ترکیب اسکلت سلولی، شناسایی مولکولی و مسیر انتقال سیگنالینگ هستند (۱۷). جهش‌های ژن *CCDC103* اولین بار در سال ۲۰۱۲ در بیمارانی با از دست‌دادن بازوی داینئین (بیماری Primary Ciliary Dyskinesia) گزارش شد. با توالی‌یابی این ژن، یک جهش C>T در نوکلئوتید ۷۹ ژن مشخص شد که منجر به کدون خاتمه زودرس می‌گردد (Q27Stop). این بیماران با نقص عدم تقارن چپ به راست، هیدروسفالی و فنوتیپ‌های غیرطبیعی قلب و کلیه گزارش شدند (۱۸). همچنین در مطالعه

دیگری، جهش‌های هموزیگوت از دست‌دادن عملکرد، در شش فرد مبتلا از سه خانواده پاکستانی، مرتبط با کروموزوم ۱۷ (c.383-384insG) مشاهده شد که یک تغییر چارچوب و خاتمه زودرس ترجمه را پیش‌بینی می‌کرد (p.Gly128fs25). والدین این بیماران، برای این جهش، هتروزیگوت بودند که مطابق با الگوی توارث اتوزومال مغلوب جهش‌های این ژن است (۱۹). در یک خانواده آلمانی نیز، یک جهش هموزیگوت (c.A461C) شناسایی شد که در اسیدآمینه ۱۵۴، هیستیدین به پرولین (p.His154Pro) تبدیل شده بود. بررسی‌های بیوانفورماتیکی این مطالعه نشان داد که این جهش در ناحیه‌ای در کنار یک دامین بسیار حفاظت‌شده از پروتئین *CCDC103* رخ داده است و نرم‌افزار Polyphen-2 نیز امتیاز آسیب‌زایی ۰/۹۷۲ را برای این جهش پیش‌بینی کرد که حاکی از اهمیت بالای بیماری‌زایی آن است (۲۰). طول ژن *CCDC103*، ۵۶۶۲ جفت باز است و چهار اگزون دارد. این ژن یک پروتئین کوچک ۲۴۲ اسیدآمینه‌ای را کد می‌کند که از یک دامین مرکزی به نام RPAP3_C تشکیل شده است که توسط ساختارهای کوئل N- و C-ترمینال احاطه شده است. وزن این پروتئین ۲۷/۲ کیلودالتون گزارش شده است (شکل ۱). این پروتئین برای تثبیت میکروتوبول‌های سیتوپلاسمی در برابر دپلیمیزاسیون سرمایی، طی یک آزمایش invitro کشف شد (۲۱). ژن *CCDC103* از نظر تکاملی بسیار محافظت شده است و در گونه‌های متعددی از مهره‌داران و بی‌مهرگان نیز دیده می‌شود (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Pongo pygmaeus*, *Gorilla gorilla*, *Lemur catta*, *Pan paniscus*, *Cebus albifrons*, *Strongylocentrotus droebachiensis* و *Caenorhabditis elegans*). مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات نوکلئوتیدی در ژن *CCDC103* و ارتباط آن با نقایص قلبی مادرزادی از نوع TOF انجام شد.



شکل ۱- ساختار ژن *CCDC103* با ۵۶۵۲ نوکلئوتید و چهار گزون و سه ناحیه کدینگ، توالی پروتئین و دو دامین عملکردی آن

روش تحقیق

بیماران مورد مطالعه

جامعه پژوهش در این مطالعه مورد-شاهدی، شامل ۸۵ نوزاد و کودک بیمار مبتلا به TOF غیرخوشاوند (۴۷ پسر و ۳۸ دختر) با علایم مشخص تترالوژی فالوت بودند. شرکت کنندگان پس از تشخیص TOF توسط متخصص جراح قلب کودکان، با استفاده از اکوکاردیوگرافی، کاتتریزاسیون قلب یا جراحی قلب باز انتخاب شدند. بیماران مورد بررسی علایم زیر را نشان می دادند: نقص سپتوم بطنی از نوع ناهماهنگی قدامی^۱ (۲۵٪ بیماران)، هیپوپلازی سپتوم مخروطی^۲ (۱۷٪)، نقص سپتوم بطنی عضلانی^۳ (۱۵٪)، نقص سپتوم دهلیزی ثانویه^۴ (۱۴٪)، فقدان دریچه ریوی^۵ (۱۱٪)، قوس آئورت راست^۶ (۹٪)، شریان نابجای ساب کلاوین چپ^۷ (۵٪) و تنه براکیوسفالیک مشترک^۸ (۴٪). شرح حال کامل پزشکی و خانوادگی بیماران، توسط مشاور ژنتیک گرفته شد. بیمارانی با اختلالات و

ناهنجاری های کروموزومی و یا علایم سندرم های سیتوژنتیکی، از مطالعه حاضر حذف شدند. میانگین سنی بیماران مطالعه شده، از ۱۵ روز تا ۱۰ سال (میانگین سنی: $3/5 \pm 2/9$) بود. نمونه خون وریدی، از مرکز قلب افشار یزد، طی دوره زمانی مهر ۱۳۹۸ تا دی ماه ۱۴۰۲ اخذ شد. همه والدین بیماران، در جریان مطالعه قرار گرفتند و رضایت نامه از آن ها به دست آمد. گروه کنترل نیز شامل ۵۶ کودک سالم، بدون سابقه خانوادگی اختلالات قلبی-عروقی یا ناهنجاری های کروموزومی بودند که جهت چکاپ به همان مرکز مراجعه کرده بودند (۳۱ پسر و ۲۵ دختر؛ میانگین سنی: $4/1 \pm 1/9$). این کودکان از منطقه جغرافیایی یکسانی با گروه بیماران انتخاب شدند و از نظر سن و جنسیت، تفاوت معنی داری با گروه بیماران نداشتند (به ترتیب $P = 0/73$ و $P = 0/69$). مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه یزد (شناسه تأیید: IR.YAZD.REC.1402.048) تأیید شد و بر اساس اصول اخلاقی بیانیه تجدیدنظر شده هلسینکی انجام شد. پس از اخذ رضایت آگاهانه از والد هر بیمار، نمونه خون از هر فرد در یک لوله حاوی EDTA جمع آوری گردید. برای استخراج DNA کامل ژنومی، از روش نمک زدایی با کیت استاندارد استخراج DNA (شرکت کیاژن، ایران) استفاده شد و سپس کیفیت و کمیت DNA

¹ Anterior malalignment-type ventricular septal defect

² Conal septal hypoplasia

³ Muscular ventricular septal defect

⁴ Secundum atrial septal defect

⁵ Absent-valve syndrome

⁶ Right aortic arch

⁷ Aberrant left subclavian artery

⁸ Common brachiocephalic trunk

استخراج شده توسط طیف‌سنج نانودراپ (NanoDrop™ Lite: Cat. ND-LITE) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی ژنومی

برای ارزیابی جهش‌های نقطه‌ای و تغییرات نوکلئوتیدی در ناحیه ژنومی ژن *CCDC103* (NG_032792.1)، مناطق کدگذاری ژن (۳۰۸۹-۲۶۳۷، ۱۹۲۴-۱۷۹۲، ۱۴۱۳-۱۲۷۱) (CDS) با روش Touchdown PCR تکثیر و سپس با توالی‌یابی Sanger مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، توالی‌های اختصاصی پرایمرها، توسط نرم‌افزار طراحی Primer3 و ابزار اختصاصی طراحی شدند (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۷۰-۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، 1X بافر PCR (Qiagen)، ۱/۵ میلی مولار از هر dNTP، ۴ میکرومول از هر پرایمر اختصاصی، ۱/۵-۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و ۰/۷ U Taq پلیمراز (Qiagen) انجام شد. شرایط

Touchdown PCR برای تکثیر قطعات DNA به شرح زیر است: ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشتگی اولیه)، ۵ سیکل ابتدایی شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۷-۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، با کاهش ۱ درجه سانتی‌گراد به ازای هر سیکل و گسترش توالی‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه. سپس ادامه واکنش‌های PCR طی ۳۰ چرخه، شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت، انکوبه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. قطعات DNA تکثیرشده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه UV ترانسلومیناتور مشاهده شد و پس از تعداد اندازه و کیفیت باند، برای توالی‌یابی مستقیم به شرکت پیشگام (تهران) ارسال شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی برای نوک کدینگ ژن *CCDC103* و توالی‌های احاطه کننده آن‌ها

موقعیت توالی	اندازه قطعه	توالی پرایمر	نام پرایمر	CDS
۱۲۳۴-۱۲۵۳	۱۹۱ bp	3'-CTGACATGTATTCCTTTGC-5'	F1	۱
۱۴۴۴-۱۴۶۳		3'-CTATAATCCACCATAACAGG-5'	R1	
۱۷۵۲-۱۷۷۲	۱۸۲ bp	5'-GCATTAAGTCCATTGCCTAA-3'	F2	۲
۱۹۷۴-۱۹۵۴		5'-GCTTTAGGGCAGAGAATCCTG-3'	R2	
۲۶۲۴-۲۶۰۴	۵۰۹ bp	3'-CTCCTGACTCCCTTTCCTTCC-5'	F3	۳
۳۱۱۳-۳۰۹۵		3'-GGACCTCTGAGGGTAGCTTG-5'	R3	

نتایج تعیین توالی و آنالیزهای بیوانفورماتیک

پس از دریافت نتایج تعیین توالی، به‌منظور تجزیه و تحلیل نتایج و پیش‌بینی تاثیر تغییرات نوکلئوتیدی بر روی ساختار و عملکرد پروتئین، از نرم‌افزارها و همچنین پایگاه‌های اینترنتی متعددی استفاده شد. برای شناسایی موقعیت هر جهش، از ابزارهای آنالیزی نظیر BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)، Benchling (<https://www.benchling.com>) و MutationTaster

(<https://www.genecascade.org/MutationTaster2021>) استفاده شد. جدید بودن هر جهش از طریق پایگاه‌های داده (gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>), NCBI dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), ExAC (<https://exac.broadinstitute.org>), Clinvar و 1000Genomes Project ارزیابی گردید. برای ارزیابی تغییرات قطبیت و آگزیزی هر اسیدآمین در پروتئین

تحلیل آماری

ارزیابی متغیرهای طبقه‌بندی بین دو گروه بیمار و کنترل، با استفاده از آزمون دقیق فیشر و آزمون χ^2 پیرسون انجام شد. از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) برای انجام آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. مقدار و ارزش $P < 0.05$ برای تعیین یک تفاوت آماری معنی‌دار اندازه‌گیری شد.

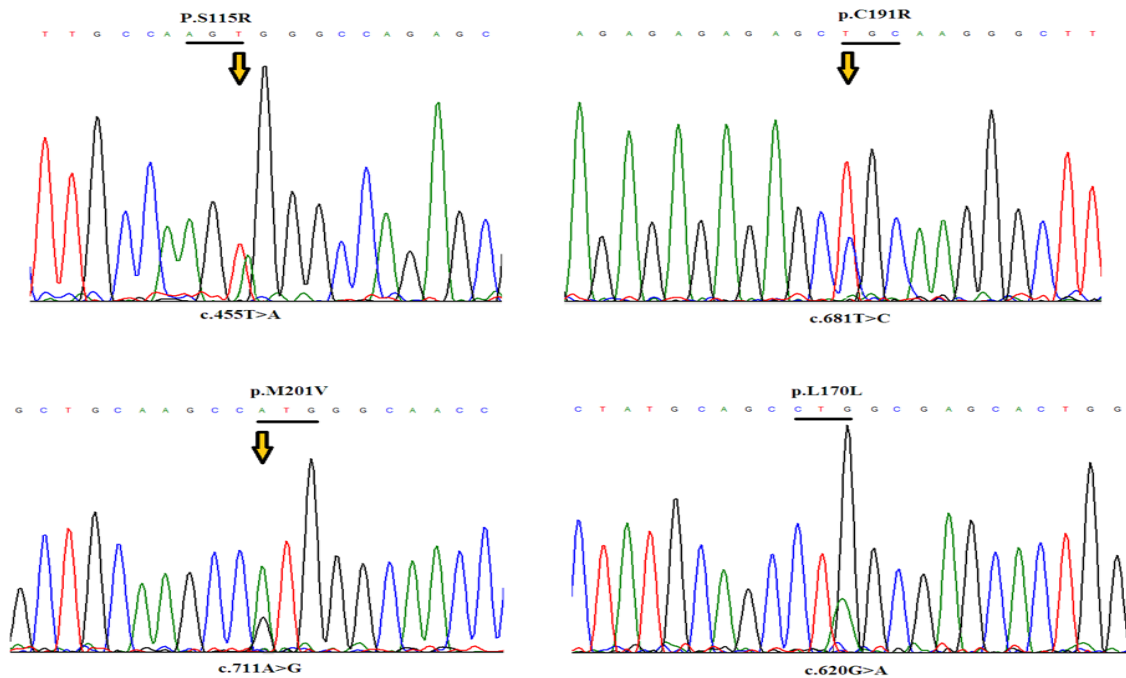
یافته‌ها

در این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام می‌شود، برای یافتن جهش‌های نقطه‌ای یا تغییرات توالی در ژن *CCDC103*، توالی‌های کدکننده و ناحیه 3'-UTR این ژن با استفاده از روش Touchdown PCR و توالی‌یابی مستقیم DNA، در ۸۵ کودک مبتلا به CHD و ۵۶ کودک سالم مورد بررسی قرار گرفت. هیچ‌گونه تغییرات ژنومی از نوع حذف (Deletion) یا درج‌شدگی (Insertion) توالی در لوکوس این ژن، در میان نمونه‌های بیماران مورد مطالعه مشاهده نشد، با این‌حال، در مجموع ۵ تغییر تک‌نوکلئوتیدی به‌صورت هتروزیگوت، با توالی‌یابی Sanger در این ژن شناسایی شد (سه جهش بدمعنی یا missense، یک تغییر همان‌ یا Synonymous و یک تغییر نوکلئوتیدی در ناحیه 3'-UTR) (شکل ۲). این تغییرات تک‌نوکلئوتیدی هتروزیگوت در ۸ بیمار غیروخوشاوند TOF (۹۴٪ شناسایی شدند و طبق بررسی به عمل آمده توسط نویسندگان، برای اولین بار در ارتباط با نقایص قلبی TOF گزارش می‌شوند. هیچ‌کدام از ۵ تغییر تک‌نوکلئوتیدی مشاهده‌شده در نمونه‌های کنترل، دیده نشدند. سه جهش بدمعنی (p.M201V و p.C191R، p.S115R) منجر به جایگزینی اسیدهای آمینه در نواحی حفاظت‌شده پروتئین شدند (شکل ۳) که دو مورد از آنها (p.M201V و p.S115R) جدید بودند و قبلاً در هیچ‌کدام از پایگاه‌های داده ژنومی بزرگ، گزارش نشده بودند. سومین تغییر اسیدآمینه (p.C191R) که در ۳ بیمار غیروخوشاوند، در مطالعه حاضر شناسایی شد، قبلاً در سایت ClinVar به‌عنوان rs2051580311 و در بیماران Ciliary dyskinesia گزارش شده بود ولی اهمیت آن نامعلوم و بدون شواهد مطالعاتی ثبت شده

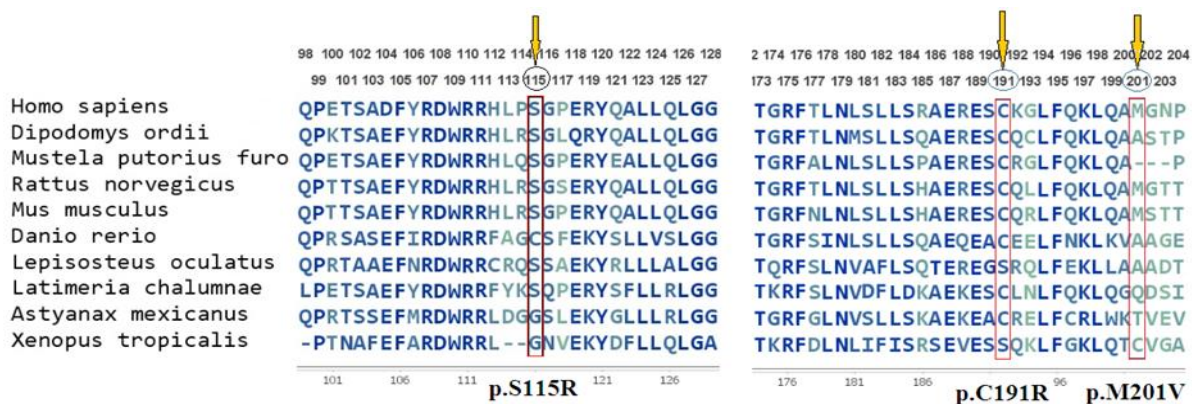
CCDC103، از نرم‌افزارهای UniProt، Expasy /Protscale و ProtParam استفاده شد. مکانیسم مولکولی *CCDC103* و رابطه سیگنالینگ این پروتئین، با استفاده از سرور SIGNOR (<https://signor.uniroma2.it>) مطالعه گردید. برای تعیین اینکه کدام پروتئین با *CCDC103* تعامل و برهمکنش دارد، از پایگاه‌های STRING و IntAct استفاده شد. علاوه بر این، تأثیرات عملکردی و ساختاری جایگزینی‌های نوکلئوتیدی و تغییرات اسیدآمینه‌ای در ناحیه کدکننده پروتئین و همچنین میزان درجه حفاظت‌شدگی تکاملی SNP‌های ناحیه کدینگ و تغییرات پایداری پروتئین ($\Delta\Delta G$) توسط چندین ابزار بیوانفورماتیک، شامل PredictSNP، PANTHER، MutPred2، Meta-SNP، I-SuSPect، Mupro، MutationAssessor، Mutant PolyPhen-، FATHMM، M-CAP، SIFT، SNPs&GO، 2، MutaFrame، PROVEAN، PON-P2، DUET و Bayestab (<http://www.bayestab.com>) ارزیابی گردید. همچنین از سرورهای mirTarBase Release 9.0 (<https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/>) و mirDB (<https://mirdb.org>)، TargetScan، Mimap و Psipred (<http://bionf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) از سرورهای NetsurfP استفاده شد. از آنجایی که ساختار پروتئین *CCDC103* در پایگاه داده PDB موجود نبود، ساختار سه‌بعدی پروتئین کامل با استفاده از AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) به دست آمد. برای هر نوع جهش تغییر اسیدآمینه، ساختار جهش‌یافته با استفاده از FireProtDB (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotodb>) بررسی شد. سپس ساختارهای سه‌بعدی هر کدام از موتانت‌های پروتئین با استفاده از PyMol آنالیز شدند.

پیش‌بینی شد که توالی جهش‌یافته که در هفتمین نوکلئوتید ابتدای ناحیه 3'-UTR ژن رخ داده است، جایگاه اتصال هیچ miRNA شناخته‌شده‌ای نیست و بنابراین احتمالاً نمی‌تواند منجر به تغییر در تنظیم بیان ژن *CCDC103* شود.

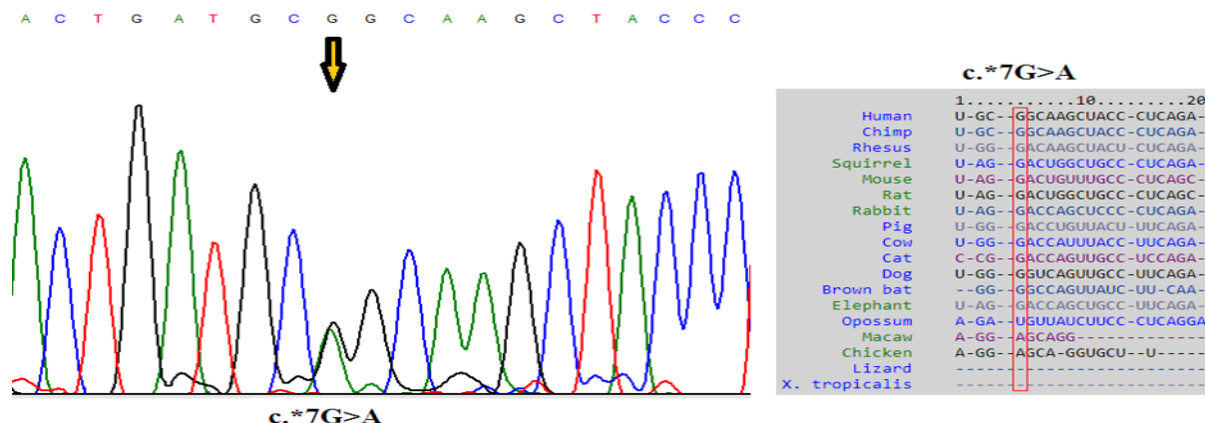
بود. یک تغییر نوکلئوتیدی هتروزایگوت نیز در ناحیه 3'-UTR (c.*7G>A) در یک پسر ۱۷ ماهه مبتلا مشاهده شد که بررسی‌های هم‌ردیفی نشان داد که این تغییر نیز در توالی حفاظت‌شده‌ای در بین مهره‌داران رخ داده است (شکل ۴). اما با بررسی سه پایگاه داده TargetScan، Mirmap، و mirDB،



شکل ۲- نتایج تعیین توالی ژن *CCDC103* در بیماران TOF مورد مطالعه، چهار تغییر نوکلئوتیدی هتروزایگوت را در ناحیه کدینگ ژن مشخص کرد که سه جهش بدمعنی (منجر به تغییر اسیدآمینه) و یک تغییر هم به‌صورت همانم (بدون تغییر اسیدآمینه) بودند.



شکل ۳- بررسی میزان حفاظت‌شدگی تکاملی برای سه جهش بدمعنی (p.S115R، p.C191R و p.M201V) در بین موجودات مختلف. موقعیت جهش‌ها با فلش مشخص شده است.



شکل ۴- نتیجه تعیین توالی ژن *CCDC103* در یک بیمار مبتلا به TOF، یک تغییر نوکلئوتیدی هتروزیگوت (c.*7G>A) را در ناحیه ۳'-UTR نشان می‌دهد که هم‌ترازی با توالی سایر موجودات نیز نشان‌دهنده درجه حفاظت‌شدگی تکاملی بالایی برای این نوکلئوتید است.

علاوه بر این، دو تا از این جهش‌ها، قبلاً در پایگاه‌های اطلاعاتی ژنومی گزارش نشده بودند و به عنوان جهش‌های نقطه‌ای جدید در این ژن، معرفی می‌شوند. با استفاده از هم‌ترازی توالی بصورت چندگانه با سایر ارگانیزم‌ها، در پایگاه داده NCBI و سرور ConSurf (سایت پیش‌بینی‌کننده مناطق حفاظتی و عملکردی) پیش‌بینی شد که هر سه جایگزینی اسیدآمینه مشاهده‌شده در این ژن، در اسیدهای آمینه با درجه بالایی از حفاظت‌شدگی رخ می‌دهد و دارای شاخص حفاظت تکاملی (Conservation Index: CI) قابل قبولی است ($CI \geq 75\%$). این نتیجه پیش‌بینی می‌کند که چنین تغییرات اسیدآمینه، برای عملکرد مناسب پروتئین آسیب‌رسان و مضر هستند.

مطالعات بیوانفورماتیکی و بررسی تأثیر جهش‌های تغییر اسیدآمینه بر ساختار و عملکرد پروتئین

سه جهش بدمعنی (p.S115R، p.C191R و p.M201V) به‌عنوان جهش‌های جایگزینی اسیدهای آمینه که در حالت هتروزیگوت در بیماران کودکان مبتلا به TOF مشاهده شدند، با استفاده از ابزارهای پیش‌بینی بیوانفورماتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۲). والدین این بیماران هیچ سابقه‌ای از علائم اختلالات قلبی نداشتند و نمونه خون هیچ عضو دیگری از خانواده، برای آزمایشات ژنتیک در دسترس نبود. برای بررسی بیشتر نقش بالقوه جهش‌های بدمعنی در ژن *CCDC103*، غربالگری جهش در ۵۶ کودک سالم نیز به‌عنوان کنترل انجام شد و نتایج ما نشان داد که هیچ یک از جهش‌های بدمعنی در افراد کنترل مشاهده نگردید.

جدول ۲- انواع تغییرات نوکلئوتیدی و جابجایی اسیدهای آمینه مشاهده شده در بیماران TOF، در مناطق کدینگ و غیرکدینگ ژن *CCDC103*

تغییر اسیدآمینه	تغییر کدینگ	تغییر ژنومی	اگزون	تغییر نوکلئوتیدی	جهش
p.S115R	c.455T>A	g.2705T>A	۴	Transversion	بدمعنی
p.C191R	c.681T>C	g.2831T>C	۴	Transition	بدمعنی
p.M201V	c.711A>G	g.2691A>G	۴	Transition	بدمعنی
p.L170L	c.620G>A	g.2870G>A	۴	Transition	همنام
-	c.*7G>A	g.3093G>A	3'-UTR	Transition	غیرکدینگ

برای پیش‌بینی اثر این سه جهش بدمعی بر پروتئین، از الگوریتم‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیکی متعددی استفاده شد. هر چه امتیاز کسب‌شده توسط جهشی بالاتر باشد، احتمال بیماری‌زایی آن نیز بیشتر است و ممکن است عملکرد پروتئین موردنظر را مختل کند. نتایج بررسی‌های سایت پیش‌بینی HOPE، نشان داد که در جهش p.S115R، اسیدآمینه موتانت از نظر اندازه، بزرگتر از نوع نرمال آن است، این امر ممکن است منجر به برآمدگی جزئی در پروتئین شود. بار الکتریکی اسیدآمینه نرمال، خنثی است ولی بار الکتریکی اسیدآمینه جهش‌یافته مثبت است، این می‌تواند منجر به دفع لیگاند‌ها یا اسیدهای آمینه دیگر با همان بار الکتریکی شود. همچنین اسیدآمینه نرمال نسبت به اسیدآمینه جهش‌یافته آبگریزتر است، بنابراین، روی فعل و انفعالات آبگریز، چه در مرکز پروتئین و چه در سطح آن، اثر دارد. همچنین نتایج این پایگاه داده پیش‌بینی می‌کند که اسیدآمینه نرمال ترجیحاً در ساختار ثانویه Turn قرار می‌گیرد ولی اسیدآمینه جهش‌یافته ترجیح می‌دهد در ساختار ثانویه دیگری باشد، بنابراین بطور موضعی، کنفورماسیون (تغییر شکل فضایی) پروتئین کمی بی‌ثبات می‌شود. علاوه‌براین، اسیدآمینه نرمال (S115) از نظر تکاملی، بسیار حفاظت‌شده است، اما در نتایج هم‌ردیفی، چند نوع اسیدآمینه دیگر نیز در این موقعیت مشاهده شد، با اینحال، اسیدآمینه جهش‌یافته (R115) در میان این اسیدهای آمینه گزارش شده نبود، ولی اسیدهای آمینه‌ای که برخی از خواص مشترک با اسیدآمینه جهش‌یافته را داشتند، در هم‌ردیفی توالی پروتئین مشاهده شدند. این بدان معنی است که جهش p.S115R ممکن است بدون آسیب‌رساندن به فعالیت و عملکرد پروتئین رخ داده باشد. در جهش p.C191R نیز اسیدآمینه نرمال بسیار حفاظت‌شده است و تاکنون هیچ اسیدآمینه دیگری با خواص مشابه اسیدآمینه موتانت، در این موقعیت و در سایر توالی‌های همولوگ گزارش نشده است. بر اساس امتیازات حفاظت‌شدگی، این جهش احتمالاً به پروتئین آسیب می‌رساند و بنابراین بیماری‌زا است. همچنین اسیدآمینه موتانت، از نظر اندازه بزرگتر از نوع نرمال آن است، این امر ممکن است منجر به برآمدگی جزئی در پروتئین شود. بار الکتریکی اسیدآمینه نرمال، خنثی است ولی بار الکتریکی

اسیدآمینه جهش‌یافته مثبت است، این می‌تواند منجر به دفع لیگاند‌ها یا اسیدهای آمینه دیگر با همان بار الکتریکی شود. همچنین اسیدآمینه نرمال (C191) نسبت به اسیدآمینه جهش‌یافته (R191) آبگریزتر است، بنابراین، روی فعل و انفعالات آبگریز تأثیر می‌گذارد. در مورد جهش p.M201V، اسیدآمینه جهش‌یافته کوچکتر از اسیدآمینه نرمال است، این ممکن است منجر به از دست‌دادن تعاملات و برهم‌کنش‌های قطبی یا غیرقطبی با سایر اسیدهای آمینه همسایه شود. همچنین اسیدآمینه نرمال که در انتهای C-terminal پروتئین قرار دارد، در موقعیتی با حفاظت‌شدگی بالا بین توالی‌های همولوگ مشاهده‌شده است، بنابراین جهش (M201V) ممکن است به پروتئین آسیب برساند.

علاوه‌براین، از چندین ابزار *in-silico* دیگر برای پیش‌بینی جهش‌های بیماری‌زا و مضر و یا خنثی و قابل‌تحمل در این ژن استفاده شد (جدول ۳). قریب به اتفاق سایت‌های بیوانفورماتیک پیش‌بینی کردند که یکی از جهش‌های بدمعی (p.C191R) بر اساس دستورالعمل‌های ACMG¹ (۲۲) و معیارهای بیماری‌زا یا خوش‌خیم‌بودن جهش، برای پروتئین CCDC103 بیماری‌زا و آسیب‌رسان است. سرورهای Mupro و I-Mutant2.0 برای بررسی تغییرات پایداری پروتئین برای هر سه جهش بدمعی، مورد استفاده قرار گرفت. پایداری پروتئین یک ویژگی شاخص است که بر فعالیت تنظیم‌شده، عملکرد و بیان پروتئین، در محیط سلولی تأثیر می‌گذارد. داده‌های این ابزارهای بیوانفورماتیکی، تغییرات پایداری پروتئین را با تخمین تغییرات انرژی آزاد گیبس ($\Delta\Delta G$) پیش‌بینی می‌کنند. نمرات مثبت، باعث افزایش ثبات ساختار پروتئین می‌شود، در حالی که نمرات منفی ساختار را بی‌ثبات می‌کند. این الگوریتم‌ها پیش‌بینی کردند که هر سه جهش بدمعی مشاهده‌شده در بیمار TOF، از نوع جهش‌های بی‌ثبات‌کننده هستند و بر پایداری پروتئین ($\Delta\Delta G$) تأثیر کاهشی می‌گذارند. بنابراین، هر سه جهش بدمعی، به‌عنوان غیرخنثی و موثر در عملکرد پروتئین CCDC103، پیش‌بینی شدند.

¹ American College of Medical Genetics

جدول ۳- پیش‌بینی بیماری‌زا یا خنثی بودن جهش‌های بدمعنی مشاهده شده در ژن *CCDC103* با استفاده از چندین ابزار پیش‌بینی بیوانفورماتیک

جهش ابزار بیوانفورماتیک	p.S115R	p.C191R	p.M201V
PolyPhen-2 (امتیاز)	خوش خیم (۰/۰۱۲)	احتمالا آسیب‌رسان (۰/۹۹۴)	خوش خیم (۰/۱۰۴)
I-Mutant2.0	کاهش پایداری	کاهش پایداری	کاهش پایداری
MUpro ($\Delta\Delta G$ kcal/mol)	کاهش پایداری (۰/۵۴۷۷۵۳۵۶)	کاهش پایداری (۰/۳۱۳۷۵۵۴۷۸)	کاهش پایداری (۰/۸۹۴۸۷۶۲)
PredictSNP (درصد احتمال)	خنثی (٪۶۳)	بیماری‌زا (٪۶۱)	خنثی (٪۷۴)
SIFT	احتمالا آسیب‌رسان (٪۵۳)	احتمالا آسیب‌رسان (٪۴۶)	خوش خیم (٪۷۶)
SNPs&GO (امتیاز)	خنثی (۰/۱۱۶)	خنثی (۰/۱۲۱)	خنثی (۰/۰۴۹)
PROVEAN (امتیاز)	خنثی (۰/۲۰۵)	بیماری‌زا (۰/۲۲۵)	خنثی (۰/۳۶۱)
Meta-SNP (امتیاز)	خنثی (۰/۱۵۶)	بیماری‌زا (۰/۶۲۵)	خنثی (۰/۰۶۰)
fathmm (امتیاز)	۱/۹۵	۰/۸۴	۱/۰۰
SuSPect	۱۶	۶۳	۱۲
dbNSFP (امتیاز)	۰/۲۱۰۸۷۵۱۲	۰/۶۷۳۳۳۸	۰/۱۲۱۸۶۸۴
PON-P2 (امتیاز)	ناشناخته (۰/۳۵۱)	ناشناخته (۰/۷۱۸)	خنثی (۰/۱۲۰)
PANTHER	ناشناخته	ناشناخته	ناشناخته
PhD-SNP (امتیاز)	خنثی (۰/۳۸۷)	بیماری‌زا (۰/۶۳۱)	خنثی (۰/۱۳۸)

PolyPhen-2: هرچه عدد به ۱ نزدیکتر باشد، احتمال بیماری‌زا بودن جهش بیشتر است.

SNPs&GO: هرچه عدد به ۱ نزدیکتر باشد، احتمال بیماری‌زا بودن جهش بیشتر است.

PROVEAN: امتیاز کمتر از ۰/۵- به معنای بیماری‌زا بودن جهش است.

Meta-SNP: عدد بیشتر از ۰/۵ به معنای بیماری‌زا بودن جهش است.

fathmm: عدد زیر ۱ به معنی ارتباط قوی‌تر با بیماری‌زایی می‌باشد.

SuSPect: هرچه عدد به ۱۰۰ نزدیکتر باشد، احتمال بیماری‌زا بودن جهش بیشتر است.

dbNSFP: هرچه عدد به ۱ نزدیکتر باشد، احتمال بیماری‌زا بودن جهش بیشتر است.

PON-P2: یک طبقه‌بندی‌کننده مجموعه‌ای است از ۲۰۰ پایگاه داده مستقل است. اگر حداقل ۹۵ درصد پایگاه داده‌ها یک واریانت را بیماری‌زا یا خنثی پیش‌بینی کنند، آن جهش به‌عنوان بیماری‌زا یا خنثی طبقه‌بندی می‌شود. اما اگر ۹۵ درصد پایگاه داده‌ها، در مورد یک جهش موافق نباشند، آن جهش به‌عنوان ناشناخته پیش‌بینی می‌شود.

PhD-SNP: عدد بیشتر از ۰/۵ به معنای بیماری‌زا بودن جهش است.

PANTHER: عدد بیشتر از ۰/۵ به معنای بیماری‌زا بودن جهش است.

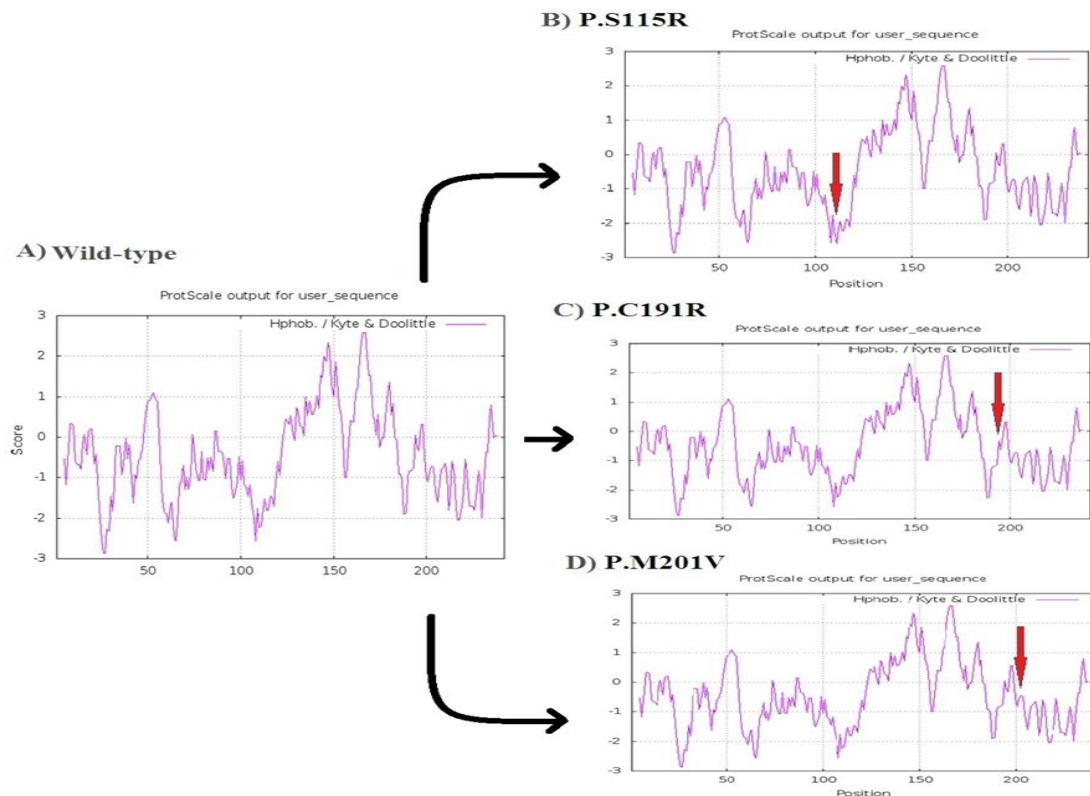
فعل و انفعالات آگزیز نیز نقش مهمی در رویدادهای بیوفیزیکی و بیوشیمیایی موثر در ساختار و عملکرد پروتئین دارند. برای بررسی تغییرات آگزیزی پروتئین، از مقیاس‌های آگزیزی محاسبه‌شده توسط ابزار Expasy برای هر سه جهش بدمعنی در مقایسه با پروتئین نرمال استفاده شد. این نرم‌افزار مقادیر آگزیزی و آب‌دوستی را در هر سه حالت پروتئین جهش‌یافته پیش‌بینی کرد (شکل ۵). جهش p.S115R، اسیدآمینه سرین را که یک اسیدآمینه

قطبی و خنثی (با نمره آگزیزی: ۰/۸-) است، به آرژنین که یک اسیدآمینه بازی و هیدروفیل (با امتیاز آگزیزی: ۴/۵-) است، تغییر می‌دهد. همچنین، جهش p.C191R، سیستئین قطبی و هیدروفوب (با نمره آگزیزی: ۲/۵) را به آرژنین که یک اسیدآمینه بازی و هیدروفیل (با امتیاز آگزیزی: ۴/۵-) است، تغییر می‌دهد. جهش p.M201V نیز متیونین را که یک اسیدآمینه آلفاتیکی و بسیار هیدروفوب (با امتیاز آگزیزی: ۱/۹) است، به اسیدآمینه هم گروه

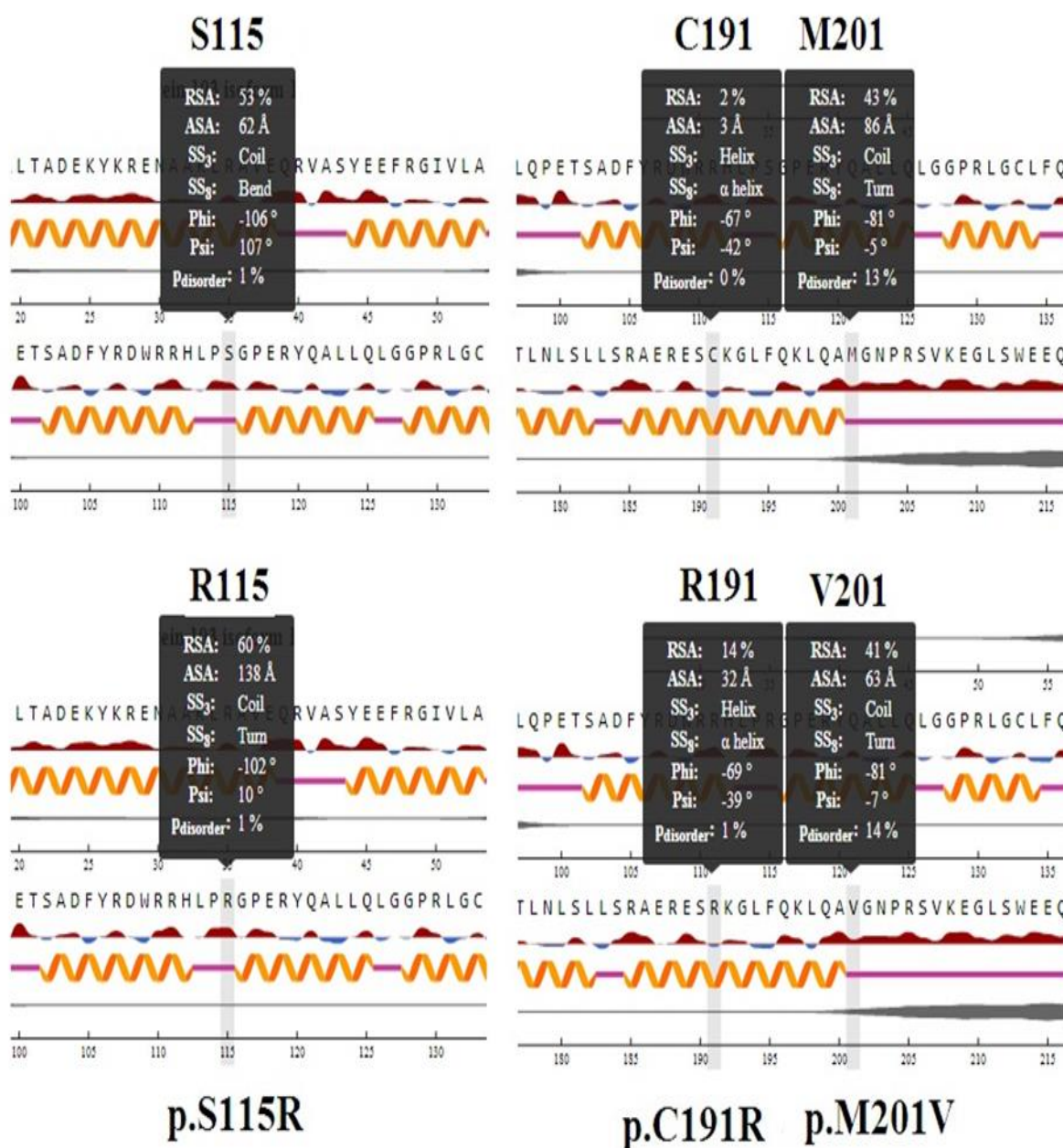
(RSA) برای دو جهش بدمعنی p.C191R و p.S115R تغییرات قابل توجهی را نشان می داد که می توان پیش بینی کرد که در فعل و انفعالات و ساختار فضایی پروتئین CCDC103 اثر داشته باشند (شکل ۶).

برای ارزیابی تأثیر بالقوه تغییرات اسیدآمینه بر ساختار سه بعدی پروتئین CCDC103، هر سه جهش بدمعنی با استفاده از نرم افزار PyMol و مدل سازی ساختاری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از آنجایی که ساختار پروتئین CCDC103 در پایگاه داده PDB موجود نبود، ساختار پروتئین کامل با استفاده از AlphaFold2 (https://alphafold.ebi.ac.uk) به دست آمد.

خود، والین که آن هم آلفاتیک و بسیار هیدروفوب (با امتیاز آبگریزی: ۴/۲) است، تغییر می دهد. بیشترین تغییر آبگریزی در میان این سه جهش بدمعنی، مربوط به p.C191R است و بنابراین احتمالاً بر ساختار پروتئین تأثیر می گذارد. تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه توسط سرورهای NetSurfP3.0 و Psipred نشان داد که به جز جهش p.C191R که در ناحیه آلفا-هلیکس پروتئین رخ داده است، دو جهش بدمعنی دیگر در مناطق Turn مشاهده می شود. نتایج بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که هیچ کدام از این تغییرات اسیدهای آمینه، منجر به تغییرات قابل توجهی در ساختار ثانویه پروتئین در مقایسه با پروتئین نرمال نشده اند. با این حال، پارامتر دسترسی به سطح (Relative Surface Accessibility):



شکل ۵- نمودارهای تغییرات هیدروفوبیسیته با بروز سه جهش بدمعنی درمقایسه با پروتئین نرمال. محل فلش ها، موقعیت جهش تغییر اسیدآمینه در پروتئین را مشخص می کند.

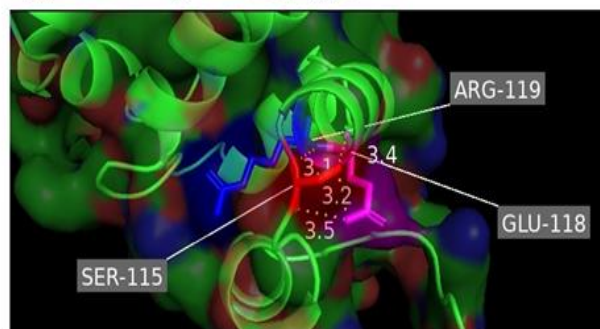


شکل ۶- بررسی ساختار ثانویه پروتئین و موقعیت جهش‌های بدمعنی مشاهده‌شده نشان می‌دهد که از بین پارامترهای ساختاری مورد مطالعه، پارامتر دسترسی به سطح (RSA) برای دو جهش بدمعنی p.S115R و p.C191R تغییرات قابل توجهی را نشان می‌دهد.

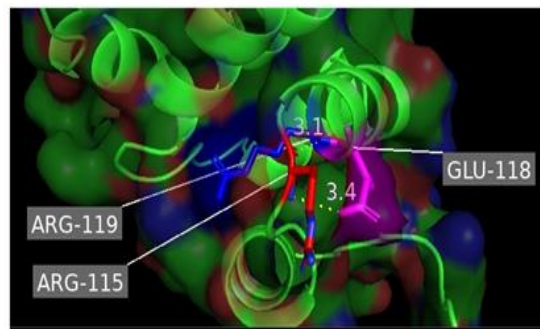
آمینو می‌شود، ولی دو جهش بدمعنی دیگر، منجر به تغییر در فاصله و تعداد برهمکنش‌های قطبی و هیدروژنی بین اسیدهای آمینو جهش‌یافته با دیگر اسیدهای آمینو پروتئین نشدند (شکل ۷).

بررسی‌های ساختاری نشان داد که تنها یکی از جهش‌های بدمعنی مشاهده‌شده در پروتئین CCDC103 (p.C191R) باعث تغییر برهمکنش‌های قطبی بین اسید آمینو جهش‌یافته با سایر اسیدهای

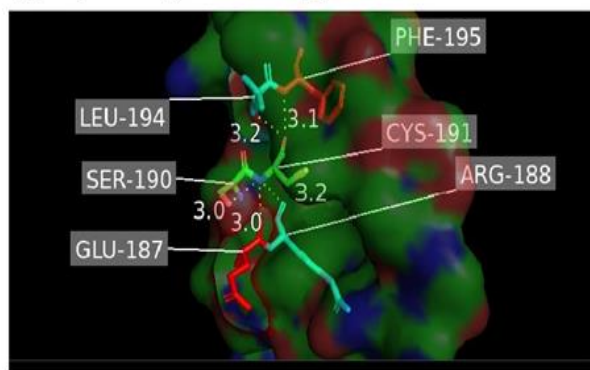
A) p. Ser115Arg Wild-type



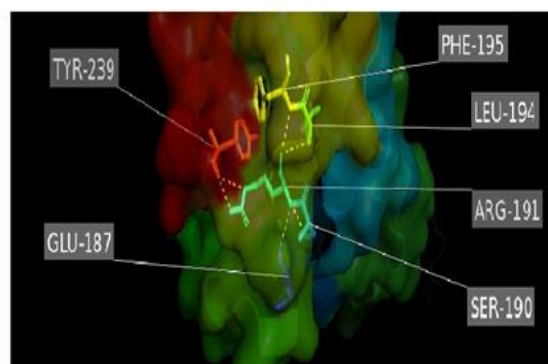
Mutant



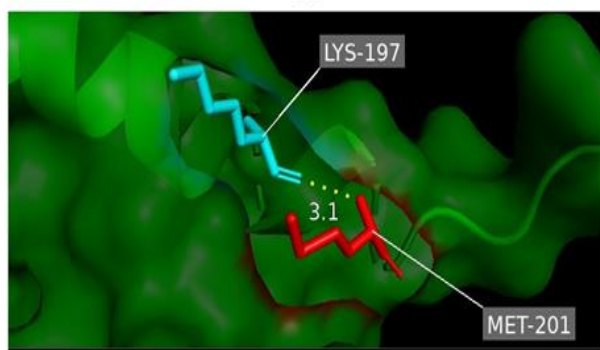
B) p. Cys191Arg Wild-type



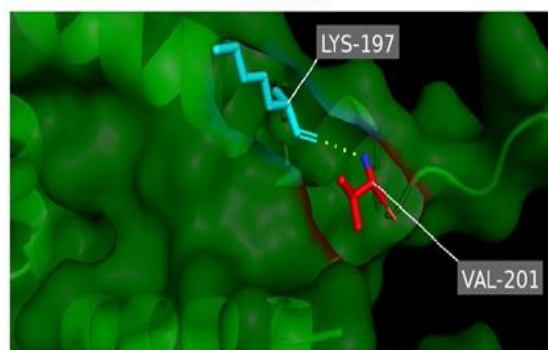
Mutant



C) p. Met201Val Wild-type



Mutant



شکل ۷- پیش بینی مدل ساختار سه بعدی برای حالت نرمال و سه حالت جهش یافته (p.M201V و p.C191R, p.S115R) نشان دهنده این است که تنها در جهش بدمعنی در p.C191R نوع پیوندهای قطبی با اسیدهای آمینه دیگر نسبت به پروتئین نرمال تغییر کرده است.

بحث

CHD از جمله شایع‌ترین نقایص مادرزادی است که هر سال حدود یک درصد از نوزادان متولدشده را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. با وجود اینکه اهمیت عوامل ژنتیکی در بروز حالات مختلف CHD تأیید شده است، با این حال، نقش اکثر ژن‌های مؤثر در آن، به صورت معمایی حل نشده باقی مانده است. ناهمگونی ژنتیکی، بیان متغیر ژن‌ها و نفوذ ناقص بیماری‌های مادرزادی قلبی نشان می‌دهد که یک مدل ژنتیکی پیچیده‌تر یا غیرمندی در بروز آن، دخیل است. شایع‌ترین فنوتیپ‌های نقایص قلبی مادرزادی عبارتند از: ¹CTD (چرخش غیرطبیعی مجرای خروجی قلب که شامل شرایطی مانند ترالوژی فالوت (ToF)، آنریزی ریوی با نقایص سپتوم بطنی (VSD)، قطع قوس آئورت، جابجایی تنه شریان‌های بزرگ و بطن راست دوخروجی یا DORV² است)، LVOTO³ یا انسداد مجرای خروجی بطن چپ، سندرم هیپوپلاستیک قلب چپ (HLHS⁴)، کوآرکتاسیون آئورت (CoA)، تنگی آئورت (AS)، دریچه آئورت دو لتی (BAV)، و قطع قوس آئورت. سایر نقایص مادرزادی قلبی نیز شامل نقص دیواره بین دهلیزی بطنی، بازگشت غیرعادی خون وریدی-ریوی، آنریزی ریوی، آنریزی سه‌لته، تنگی ریه و نقص تیغه دهلیزی است. چندین مطالعه آزمایشگاهی تاکنون، ارتباط بین ژن‌های دخیل در مژده‌زایی و شبکه قطبی سلولی و همچنین مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی با واسطه مژده‌ها را در بین ژن‌های ایجادکننده CHD تأیید کرده‌اند (۱۶، ۱۴). محققان نشان داده‌اند که ژن‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ مژک، مانند ژن *CELSR3* (پروتئین آن بخشی از ابرخانواده کادهرین است که در ارتباطات غشای پلاسمایی قرار دارند و گیرنده‌ای است که در ارتباطات تماسی، چسبندگی سلولی و تعامل گیرنده-لیگاند نقش دارد)، ژن *C20orf85* (ژنی ناشناخته روی کروموزوم ۲۰ و در مجاورت ژن شوک‌حرارتی *HSPD1*⁵)، و همچنین دو ژن مژک‌زایی جدید، *CCDC103* و *DNAF4* همگی با نقایص تکوین قلب جنین

¹ Cor triatriatum dexter

² Double Outlet Right Ventricle

³ Left Ventricular Outflow Tract Obstruction

⁴ Hypoplastic Left Heart Syndrome

⁵ Heat shock protein family D

مرتبط هستند و به‌طور قابل‌توجهی با CTD همراه هستند (۱۵). تحرک مژگانی در سلول‌های قلبی جنین، برای سازماندهی موقعیت سانتروزوم و قطبیت سلول مورد نیاز است و اختلال در این مسیر، تاکنون در نقایص قلبی همچون HLHS و LVOTO گزارش شده است (۲۳). همچنین تحقیقات نشان می‌دهند که واریانت‌های ژنی در دو ژن، *KIAA0586* (کدکننده یک پروتئین سانتروزومی حفاظت‌شده که در سیلیونز و مسیر سیگنالینگ Hedgehog: SHH نقش دارد) و *CCDC39* (پروتئین این ژن در تحرک مژک‌ها و تازک‌ها نقش دارد و برای تشکیل کمپلکس‌های بازوی تنظیمی و داخلی داینین ضروری است و ضربان مژگانی را تنظیم می‌کند)، در بروز اختلالات CHD نقش دارند. پروتئین کدشده توسط این ژن‌ها، از اعضای مسیر سیگنالینگ مژگانی هستند و برای فرایند جداسازی دهلیزی-بطنی مهم و حیاتی هستند. درواقع، حرکات مژگانی ممکن است مسئول ایجاد یک الگوی جریانی به سمت چپ در گره جنینی باشد که کلید تکوین یک سیستم قلبی-عروقی نامتقارن ولی منظم است. بنابراین، هرگونه اختلال در ژن‌های این مسیر با نقایص مادرزادی قلبی مرتبط است (۲۴).

طی مطالعاتی با بررسی جهش‌های ژن *CCDC103* و فاکتور تنظیم‌کننده آن، *Foxj1a*، ارتباط جهش‌های این ژن و بازوی داینین مشخص شد. این نتایج، *CCDC103* را به‌عنوان یک فاکتور چسبندگی بازوی داینین معرفی می‌کرد که در صورت جهش، باعث اختلال در مسیر سیگنالینگ مژگانی می‌شد (۱۸). همچنین گزارش شد که جهش‌های هموزیگوت *CCDC103* در افرادی با نقص جزئی در عملکرد بازوی داینین همراه است (۲۰). نتایج مطالعه دیگری نیز نشان داد که جهش‌های بیماری‌زا در ژن *CCDC103* منجر به عدم تشکیل کمپلکس‌های بازوی تنظیمی و داخلی داینین در آکسونم بافت‌های مختلفی، همچون قلب، تنفس و گنادهای تولیدمثلی طی تکوین جنین می‌شد (۱۷). با بررسی ارتباط سیلیوم اولیه و تکوین قلب مشخص شد که سیلیوم اولیه یک برآمدگی غشایی پلاسمایی مبتنی بر میکروتوبول است که از اجسام پایه‌ای در تقریباً همه انواع سلول‌های بدن پستانداران بیرون می‌زند. با مطالعه ارتباط ژن *CCDC103* با انواع رایج بیماری‌های قلبی

مادرزادی مشخص گردید که علاوه بر بزرگ شدن پریکاردیوم و از بین رفتن دیواره بطنی و دهلیزی، جهش‌های این ژن در تشکیل مجاری خروجی از جمله تنگنای شریانی و تغییر شکل قوس آئورت نقش دارند. همچنین جهش در این ژن، سبب اختلال در مسیرهای سیگنالینگ Hedgehog و BMP که دوتا از مسیرهای مهم در تکوین قلب هستند می‌شود (۲۵). با مطالعه بیماری افتادگی دریچه میترال و نقص در ژن‌های بیان‌کننده تاژک و مژک و مسیرهای تنظیمی آن‌ها مشخص شد که افتادگی دریچه میترال از هر ۴۰ نفر یک نفر را درگیر می‌کند ولی علت مشخصی ندارد. دانشمندان با آزمایش بر روی مدل‌های موشی دریافتند که نقص در ژن‌های مژک‌های اولیه و مسیرهای تنظیم شده آن‌ها می‌تواند باعث بروز افتادگی دریچه میترال غیرسندرومیک شود، چون از دست‌دادن مژک‌های اولیه در طی تکوین جنین، منجر به دژنراسیون میکسوماتوز دریچه میترال می‌شود. در ادامه، تیم‌های تحقیقاتی، شروع به بررسی علل ایجاد بیماری مادرزادی دریچه آئورت دوحفره‌ای (BAV¹) کردند و پی به ارتباط آن با مژک‌های اولیه بردند. بیماری نارسایی دریچه آئورت دوحفره‌ای، شایع‌ترین نقص مادرزادی قلب است که باعث مرگ و میر قابل‌توجهی در بیماران می‌شود (۲۶). داده‌های این محققان برای اولین بار نشان داد که مژک‌های اولیه در سلول‌های مزانشیمی دریچه آئورت، در طی رشد جنین بیان می‌شوند و با تمایز این سلول‌ها به سلول‌های فیبروبلاستیک ترشح‌کننده کلاژن، از بین می‌روند. عملکرد این مژک‌های اولیه با اختلالات ژنتیکی در ژن‌های مسیر مژک‌زایی، منجر به عدم تشکیل مژک‌های اولیه و افزایش تولید ماتریکس خارج سلول فیبروژنیک می‌شود. در نتیجه، مرزبندی ماتریکس خارج سلولی که به‌طور معمول در تشکیل دریچه آئورت نقش مهمی دارد، از بین رفته و فنوتیپ BAV از همان بدو تولد ایجاد می‌شود (۲۷). در سال‌های اخیر نیز، محققان با بررسی ارتباط بین نقایص جابه‌جایی شریان‌های بزرگ با ژن‌های بیان‌کننده تاژک و مژک پرداختند و ۱۹ ژن کاندید از جمله *CCDC103* را معرفی کردند که این ژن‌ها در بیان و تولید تاژک و مژک روی سلول‌های جنینی نقش دارند و به‌طور

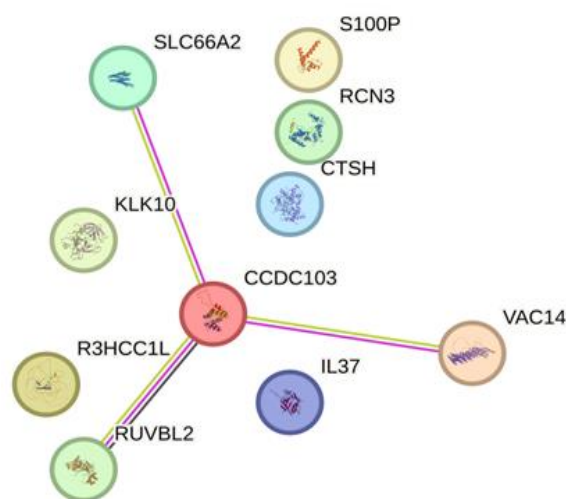
¹ Bicuspid aortic valve

بالقوه می‌توانند یک عامل پاتوژن در ایجاد نقایص مادرزادی قلبی باشند (۲۸).

اینگونه مطالعات نشان می‌دهند که در مسیر تکوین سیستم قلبی-عروقی، ژن‌های مسیر سیگنالینگ مژک، بخشی از یک شبکه تعاملی تنگاتنگ پروتئین-پروتئین را تشکیل می‌دهند، به‌گونه‌ای که هر نوع اختلال در این شبکه، منجر به بروز نقایص مادرزادی قلبی با علل چندژنی می‌گردد. از این رو، فرض محققین در مطالعه حاضر، این بود که یک مدل ژنتیکی پیچیده شامل تعاملات بین ژن‌های مژگانی، می‌تواند به پاتوژن *CHD* کمک کند. در اینجا، نقش تغییرات نوکلئوتیدی در ژن شناخته‌شده *CCDC103* که مرتبط با تشکیل مژه‌ها است، در گروهی متشکل از ۸۵ بیمار *TOF* (ترتالوژی فالوت: نوعی پیچیده و ترکیبی با علایم نقایص مادرزادی قلبی) و ۵۶ فرد کنترل، بدون هیچ نقص ساختاری قلبی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مشاهده واریانت‌های ژنی تنها در بیماران *TOF* و نه در افراد کنترل، بیانگر نقش مکانیسم‌های پیچیده در مسیر سیگنالینگ مژگانی در پاتوژن نقایص قلبی است. مشاهده این امر که تغییرات نوکلئوتیدی گزارش شده در این مطالعه، بیشتر در بیماران مبتلا به انسداد مجرای خروجی بطنی، قوس آئورت راست و نارسایی دریچه آئورت هستند، پیشنهاد می‌کند که علاوه بر ژن‌های متعدد شناخته‌شده و دخیل در بیماری‌زایی *TOF*، یک مدل ژنی کاندید در مسیر سیگنالینگ مژگانی نیز می‌تواند باعث ایجاد بیماری شود. همچنین این فرضیه مطرح می‌شود که ژن‌های مژگانی، به‌عنوان یک مدل تک‌ژنی می‌توانند مطرح شوند که با تعامل با سایر ژن‌های *CHD* و برهمکنش‌های ژن-ژن می‌توانند یک مدل ژنتیکی پیچیده برای هدایت فنوتیپ بیماری ایجاد کنند. این‌گونه مطالعات، شواهدی برای پاتوژن *CHD* ارائه می‌دهند که برای شناسایی ژن‌های نامزد جدید *CHD* در مطالعات آینده استفاده خواهند شد.

ژن *CCDC103* (OMIM: 614677) در انسان در موقعیت کروموزومی 17q21.31 قرار دارد و دارای ۴ اگزون و ۳ ناحیه کدینگ (CDS) است که یک پروتئین ۲۴۲ اسیدآمینوای را کد می‌کند. در مطالعه حاضر، ۵ تغییر نوکلئوتیدی هتروزیگوت در ژن

بالایی داشتند. با استفاده از پایگاه داده های Uniprot و STRING، برای نشان دادن تعاملات پروتئین-پروتئین مشخص شد که دامین RPAP3-like_C، به طور مستقیم با پروتئین RUVBL2 در تعامل است (شکل ۸). پروتئین RUVBL2 دارای فعالیت ATPase و هلیکازی است که تصور می شود که هگزامرشدنش برای هیدرولیز ATP ضروری باشد، به صورتی که ساختار حلقه مانند هگزامری آن، به فعالیت ATPase کمک می کند. این پروتئین همچنین قادر به همراهی با چاپرون های مولکولی (chaperon molecules) HSP70 و HSP90 نیز می باشد و در فعال کردن آن ها نقش دارد. همچنین پروتئین *CCDC103* از طریق دامین RPAP3-like_C خود می تواند به پروتئین VAC14 که یک پروتئین تنظیمی مسیر انتقال پیام فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K) است، متصل شود و به عنوان یک فعال کننده مثبت فعالیت کینازی PIKfyve عمل نماید. علاوه بر این، پروتئین *CCDC103* از طریق دامین RPAP3-like_C خود می تواند به پروتئین SLC66A2 نیز متصل شود که در انتقال فسفولیپید به گلژی نقش فعال دارد و جزء جدایی ناپذیر غشاء است.



شکل ۸- تجزیه و تحلیل شبکه ای تعاملات فیزیکی پروتئین-پروتئین بین پروتئین *CCDC103* و دیگر پروتئین های سلولی از طریق پایگاه داده STRING

CCDC103 در کودکان مبتلا به TOF شناسایی شدند. سه جهش بدمعی (p.S115R، p.C191R و p.M201V) و یک تغییر نوکلئوتیدی همانم (p.L170L) در اگزون چهارم ژن (موقعیت ژنومی اگزون چهارم: از نوکلئوتید ۲۶۳۷ تا ۳۰۸۹)، و یک واریانت ژنی (c.*7G>A) در ناحیه 3'-UTR یافت شد. هر سه جهش بدمعی که در هیچکدام از افراد کنترل مشاهده نشد، آمینواسیدهایی را تغییر می دهند که از نظر تکاملی در بین گونه های مختلف، حفاظت شده هستند و بنابراین، انتظار می رود که جهش هایی تأثیرگذار باشند. نتایج بررسی های بیوانفورماتیک برای ارزیابی اثرات بالقوه جهش های ژنی بر ساختار، عملکرد و پایداری پروتئین نیز نشان داد که از میان تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در بیماران، جهش بدمعی p.C191R بالاترین امتیاز بیماری زایی را کسب کرد و بنابراین پیش بینی می شود، به طور بالقوه در روند بیماری زایی تأثیرگذار باشد. با این حال، مطالعات عملکردی بیشتری برای تعیین مکانیسم دقیق تغییرات ژنتیکی *CCDC103* و تأثیر آنها بر فوتوپ TOF لازم است. اگرچه در مطالعه حاضر، جهش های مختلفی در ژن *CCDC103* شناسایی شد، اما جالب اینجاست که محل وقوع این جهش در بیماران، به طور تصادفی توزیع نشده است. به ویژه، بیشتر جهش های تغییر اسید آمینه در ناحیه C-ترمینال پروتئین مشاهده شد که برای تعاملات پروتئین-پروتئین *CCDC103* ضروری است. به نظر می رسد این مشاهدات از یافته های قبلی حمایت می کند که اسیدهای آمینه واقع در دو انتهای N و C پروتئین بیشتر در معرض جهش قرار می گیرند (۱۹). بررسی ساختار پروتئین *CCDC103* نشان می دهد که این پروتئین حاوی دو دامین مهم و حیاتی است: دامین N ترمینال- فاکتور اتصال به داینئین (از اسید آمینه ۷ تا ۷۴) که برای موتاز و بسته بندی بازوی داینئین و تحرک مژه ها مورد نیاز است و دامین C ترمینال- پروتئین شبه ۳ مرتبط با RNA پلیمراز II (RPAP3-like_C) (از اسید آمینه ۹۸ تا ۱۸۸) که عمدتاً محل اتصال به پروتئین های تنظیمی است. هر سه جهش بدمعی مشاهده شده در این مطالعه، نیز در دامین C ترمینال- پروتئین شبه ۳ مرتبط با RNA پلیمراز II (RPAP3-like_C) واقع شده بودند، بنابراین احتمال بیماری زایی

از میان سه جهش بدمعنی مشاهده شده در بیماران TOF، تنها یکی از آن‌ها (p.S115R) داخل دامین RPAP3-like_C اتفاق می‌افتاد که نتایج بررسی‌های داکینگ مولکولی و بررسی الگوی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین، با استفاده از نرم‌افزارهای HADDOCK و AlphaFold2، بین دامین RPAP3-like_C با هر سه پروتئین باندشونده محتمل (RUVBL2، VAC14 و SLC66A2)، برای بررسی اثر جهش بدمعنی p.S115R نشان داد که امتیاز ipTM برای اتصال این دامین در حالت موتانت، درمقایسه با توالی دامین نرمال، تفاوت قابل توجهی ندارد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، طبق الگوهای داکینگ، جهش موردنظر، نقش مستقیمی در اتصال این دامین به پروتئین‌های هدفش ندارد. برای تعیین اثر تغییرات اسیدآمینه مشاهده شده روی ساختار پروتئین CCDC103، ساختارهای سه‌بعدی از پروتئین نرمال و حالات جهش‌یافته به‌طور جداگانه ساخته شد. به دلیل فقدان داده‌های کریستالوگرافی برای پروتئین CCDC103 در پایگاه Uniprot، با استفاده از سرورهای مدلینگ SWISS-MODEL و AlphaFold، مدل‌سازی همسانی ساختاری انجام شد و بهترین و مناسبترین ساختار سه‌بعدی انتخاب شد. در مدل نهایی تولید شده، در مجموع ۲۴۲ اسیدآمینه در پروتئین مدل‌سازی شد. با استفاده از نرم‌افزار PyMol، تغییرات ساختاری، جهت ارزیابی موقعیت و اثرات تغییرات بدمعنی قبل و بعد از رویداد جهش، بین CCDC103 نرمال و جهش‌یافته بررسی شد. نتایج ما نشان‌دهنده اثرات مضر و آسیب‌رسان جهش p.C191R بر ساختار سه‌بعدی پروتئین CCDC103 با تغییر برهمکنش‌های قطبی و هیدروژنیک آن است (شکل ۷). مشخص شده است که پایداری یک پروتئین به تعداد پیوندهای شیمیایی تشکیل شده بین اسیدهای آمینه آن مربوط می‌شود. نتایج PyMol نشان داد که Cys191 در پروتئین نرمال، دارای پنج برهمکنش قطبی با Glu187 (3.0 Å)، Arg188 (3.2 Å)، Ser190 (3.0 Å)، Leu194 (3.2 Å) و Phe195 (3.1 Å) است، در حالی که اسیدآمینه تغییر یافته Arg191 به جای برهمکنش قطبی با Arg188 (3.2 Å)، فعل و انفعالات جدیدی با اسیدآمینه Tyr239 (3.0 Å) برقرار می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین جهش‌یافته در مقابل حالت

نرمال، تعاملات بین اسیدهای آمینه متفاوتی را ایجاد می‌کند. چنین تغییرات ساختاری موضعی ممکن است بر عملکرد نهایی پروتئین تأثیر بگذارد و در نتیجه ممکن است در روند بیماری‌زایی موثر باشد. توجه این امر می‌تواند جایگزینی سیستمین به‌عنوان یک اسیدآمینه قطبی و هیدروفوب با آرژنین، یک اسیدآمینه بازی و هیدروفیل باشد که منجر به اختلال در فعل و انفعالات آگزیز پروتئین می‌شود و می‌تواند به‌طور بالقوه بر فعالیت پروتئین تأثیر بگذارد و در نتیجه حساسیت به بیماری را افزایش دهد. با این حال، این مشاهدات نیاز به بررسی بیشتر برای ارزیابی نقش چنین تغییرات مضر و آسیب‌رسانی در بیماران TOF دارد.

نتیجه‌گیری

درک بیشتر علل نقایص مادرزادی قلبی از جمله، TOF، به دلیل ناهمگونی ژنی آن و این واقعیت که مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز آن، در بسیاری از بیماران هنوز ناشناخته است، ضروری به نظر می‌رسد. این تحقیق برای اولین بار، جهش‌های بالقوه بیماری‌زای ژن CCDC103 را در کودکان مبتلا به TOF از نقایص مادرزادی قلبی، در یک جمعیت ایرانی بررسی نموده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که CCDC103 و مسیر سیگنالینگ مژگانی نقش مهمی در تکوین و رشد قلب و عروق جینی ایفا می‌کند. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پیامدهای ساختاری و عملکردی سه جهش بدمعنی در ژن CCDC103 انسانی نشان داد که جهش p.C191R ممکن است به عنوان جهشی پاتوژن در بروز نقایص قلبی از نوع TOF نقش داشته باشد. نتایج مطالعه حاضر، بهتر است در آینده، با حجم نمونه بزرگتر و مطالعه قومیت‌های بیشتر و همچنین همگام با دیگر ژنهای دخیل در بیماری‌زایی TOF مورد تایید قرار گیرد. در مجموع، این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژن CCDC103، به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی جدید و یک هدف دارویی احتمالی، ممکن است نقش مهمی در تشخیص و درمان نقایص مادرزادی قلبی داشته باشد. تعیین مکانیسم مولکولی دقیق و زیربنایی نقایص مادرزادی قلبی، متخصصان را قادر می‌سازد تا پیامدهای بیماری را پیش‌بینی کرده و عوارض بیماری و میزان مرگ‌ومیر اطفال را کاهش دهند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه‌ای تحت عنوان " بررسی آگزون‌های ژن *CCDC103* در بیماران مبتلا به نقایص قلبی مادرزادی"، با کد پروزال ۱۴۰۲-۰۴۸ در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه یزد اجرا شده است. از همکاری همه بیماران و والدین‌شان که در این پژوهش ما را یاری دادند، کمال تشکر را داریم. همچنین از پرسنل و کادر درمان که در جمع‌آوری نمونه‌ها کمک کردند، تشکر می‌کنیم.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه یزد انجام شده است.

سهم مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان این مقاله، سهم برابری در انجام مراحل آزمایشگاهی و نگارش مقاله داشته‌اند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر توسط شورای پژوهشی و کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه یزد (شناسه تأیید: IR.YAZD.REC.1402.048) تأیید شد و بر اساس اصول اخلاقی بیانیه تجدیدنظر شده هلسینکی انجام

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1. Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 2003; 258(1): 1-19. DOI: [10.1016/s0012-1606\(03\)00112-x](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00112-x)
2. Tan CMJ, Lewandowski AJ. The transitional heart: from early embryonic and fetal development to neonatal life. *Fetal Diagn Ther.* 2020; 47(5): 373-86. DOI: [10.1159/000501906](https://doi.org/10.1159/000501906)
3. Khatami M, Ghazinader D, Ahmadi F, Heidari MM, Hadadzadeh M, Namnabat M. Novel missense mutation in NKX2. 6 gene (c. 389 G> C, Arg130Pro) as a potentially pathogenic variant in pediatric patients with congenital heart disease. *Gene Rep.* 2023; 33: 101819. DOI: [10.1016/j.genrep.2023.101819](https://doi.org/10.1016/j.genrep.2023.101819)
4. Sun R, Liu M, Lu L, Zheng Y, Zhang P. Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 72(3): 857-60. DOI: [10.1007/s12013-015-0551-6](https://doi.org/10.1007/s12013-015-0551-6)
5. Dianatpour S, Khatami M, Heidari MM, Hadadzadeh M. Novel point mutations of CITED2 gene are associated with non-familial congenital heart disease (CHD) in sporadic pediatric patients. *Appl Biochem Biotechnol.* 2020; 190(3): 896-906. DOI: [10.1007/s12010-019-03125-8](https://doi.org/10.1007/s12010-019-03125-8)
6. Khatami M, Mazidi M, Taher S, Heidari MM, Hadadzadeh M. Novel point mutations in the NKX2. 5 gene in pediatric patients with non-familial congenital heart disease. *Medicina (Kaunas).* 2018; 54(3): 46. DOI: [10.3390/medicina54030046](https://doi.org/10.3390/medicina54030046)
7. Heidari MM, Khatami M, Kamalipour A, Kalantari M, Movahed M, Emmamy MH, et al. Mitochondrial mutations in protein coding genes of respiratory chain including complexes IV, V, and mt-tRNA genes are associated risk factors for congenital heart disease. *EXCLI.* 2022; 21: 1306-30. DOI: [10.17179/excli2022-5298](https://doi.org/10.17179/excli2022-5298)
8. Kučienė R, Dulskienė V. Selected environmental risk factors and congenital heart defects. *Medicina (Kaunas).* 2008; 44(11): 827-32. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19124958/>
9. Rao PS. Management of congenital heart disease: state of the art—part II—cyanotic heart defects. *Children.* 2019; 6(4): 54. DOI: [10.3390/children6040054](https://doi.org/10.3390/children6040054)
10. Khatami M, Heidari MM, Kazeminasab F, Bidaki RZ. Identification of a novel non-sense mutation in TBX5 gene in pediatric patients with congenital heart defects. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2018; 10(1): 41-5. DOI: [10.15171/jcvtr.2018.07](https://doi.org/10.15171/jcvtr.2018.07)

11. Shah G, Singh M, Pandey T, Kalakheti B, Bhandari G. Incidence of congenital heart disease in tertiary care hospital. Kathmandu Univ Med J (KUMJ). 2008; 6(1): 33-6. PMID: [18604112](#)
12. Audain E, Wilsdon A, Breckpot J, Izarzugaza JM, Fitzgerald TW, Kahlert A-K, et al. Integrative analysis of genomic variants reveals new associations of candidate haploinsufficient genes with congenital heart disease. PLoS Genet. 2021; 17(7): e1009679. DOI: [10.1371/journal.pgen.1009679](#)
13. Williams K, Carson J, Lo C. Genetics of congenital heart disease. Biomolecules. 2019; 9(12): 879. DOI: [10.3390/biom9120879](#)
14. Klena NT, Gibbs BC, Lo CW. Cilia and ciliopathies in congenital heart disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017; 9(8): a028266. DOI: [10.1101/cshperspect.a028266](#)
15. Djenoune L, Berg K, Brueckner M, Yuan S. A change of heart: new roles for cilia in cardiac development and disease. Nat Rev Cardiol. 2022; 19(4): 211-27. DOI: [10.1038/s41569-021-00635-z](#)
16. Gabriel GC, Young CB, Lo CW, editors. Role of cilia in the pathogenesis of congenital heart disease. Semin Cell Dev Biol. 2021; 110: 2-10. Elsevier. DOI: [10.1016/j.semcd.2020.04.017](#)
17. Pereira R, Oliveira M, Santos R, Oliveira E, Barbosa T, Santos T, et al. Characterization of CCDC103 expression profiles: further insights in primary ciliary dyskinesia and in human reproduction. J Assist Reprod Genet. 2019; 36(8): 1683-700. DOI: [10.1007/s10815-019-01509-7](#)
18. Panizzi JR, Becker-Heck A, Castleman VH, Al-Mutairi DA, Liu Y, Loges NT, et al. CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. Nat Genet. 2012; 44(6): 714-9. DOI: [10.1038/ng.2277](#)
19. Zubair M, Khan R, Ma A, Hameed U, Khan M, Abbas T, et al. A recurrent homozygous missense mutation in CCDC103 causes asthenoteratozoospermia due to disorganized dynein arms. Asian J Androl. 2022; 24(3): 255-9. DOI: [10.4103/aja2021122](#)
20. Shoemark A, Moya E, Hirst RA, Patel MP, Robson EA, Hayward J, et al. High prevalence of CCDC103 p. His154Pro mutation causing primary ciliary dyskinesia disrupts protein oligomerisation and is associated with normal diagnostic investigations. Thorax. 2018; 73(2): 157-66. DOI: [10.1136/thoraxjnl-2017-209999](#)
21. Falkenberg L. The role of CCDC103 in the cytoskeletal dynamics, metabolic regulation, and functional maturation of zebrafish and human neutrophils [Ph.D. dissertation], University of Cincinnati; 2022, pp: 161-205. URI: [http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=ucin165953355279737](#).
22. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. Genet Med. 2008; 10(4): 294-300. DOI: [10.1097/GIM.0b013e31816b5cae](#)
23. Gabriel GC, Lo CW, editors. Left-right patterning in congenital heart disease beyond heterotaxy. Am J Med Genet C Semin Med Genet; 2020; 184(1): 90-96: Wiley Online Library. DOI: [10.1002/ajmg.c.31768](#)
24. Williams KA. Ciliary genes contribute to a complex genetic model of congenital heart disease [Ph.D. dissertation], University of Pittsburgh; 2021, pp: 10-103. URI: [http://d-scholarship.pitt.edu/id/eprint/42057](#).
25. Willaredt MA, Gorgas K, Gardner HA, Tucker KL. Multiple essential roles for primary cilia in heart development. Cilia. 2012; 1(1): 23. DOI: [10.1186/2046-2530-1-23](#)
26. Toomer KA, Yu M, Fulmer D, Guo L, Moore KS, Moore R, et al. Primary cilia defects causing mitral valve prolapse. Sci Transl Med. 2019; 11(493): eaax0290. DOI: [10.1126/scitranslmed.aax0290](#)
27. Pérez Matos AJ, Oomen T, van Tintelen JP. The Genetics of Mitral Valve Prolapse. Clin Genet. 2020; 72(4): 431-7. DOI: [10.1111/j.1399-0004.2007.00865.x](#)
28. Liu C, Cao R, Xu Y, Li T, Li F, Chen S, et al. Rare copy number variants analysis identifies novel candidate genes in heterotaxy syndrome patients with congenital heart defects. Genome Med. 2018; 10(1): 1-13. DOI: [10.1186/s13073-018-0549-y](#)