



## اهمیت تمایز قلبی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در شناسایی بیومارکرهای مرتبط با بیماری‌های قلبی

**اکرم قلی پور:** دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
**فرشاد شاکریان:** استاد، مرکز تحقیقات قلب و عروق شهید رجایی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات مداخلات قلبی و عروقی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
**علی زاهدmehr:** دانشیار، مرکز تحقیقات مداخلات قلبی و عروقی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
**شیوا ایرانی:** دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

**مهشید ملکوتیان:** دانشیار، مرکز تحقیقات قلب و عروق شهید رجایی، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (\*)  
نویسنده مسئول (Malakootian@rhc.ac.ir)

**سید جواد مولی:** استاد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی، تهران، ایران (\*) (نویسنده مسئول) (sjmowla@yahoo.com)

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمایز سلول‌های عضله قلبی،  
بیماری‌های قلبی،  
سلول‌های بنیادی

**زمینه و هدف:** توانایی سلول‌های بنیادی پرتوان برای تمایز به سمت رده قلبی، خصوصاً در زمینه پزشکی بازساختی (Regenerative Medicine) توجه زیادی را به خود جلب کرده است. با این حال، هدف نهایی برای ترمیم قلب در بیماری‌ها، چالش برانگیز است. سلول‌های قلبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی که تا به امروز توصیف شده‌اند، ویژگی‌های عملکردی و ساختاری نسبتاً نابالغی را نشان می‌دهند. بنابراین توسعه استراتژی‌ها برای رسیدن به درجه بالاتری از بلوغ سلول‌های قلبی در شرایط *in vitro* اهمیت زیادی دارد. هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های دارای تفاوت بیان در تمایز به سلول‌های قلبی و بررسی اهمیت آن‌ها در شناسایی بیومارکرهای بیماری‌های قلبی است.

**روش کار:** ابتدا فایل‌های خام حاصل از RNA-sequencing نمونه‌های سلول‌های بنیادی و سلول‌های قلبی تمایز یافته از آن، از دیتاست با شماره GSE76523 بدست آمده و مراحل آنالیز نمونه‌ها انجام شد. ژن‌های دارای تفاوت بیان در زبان برنامه نویسی R و با پکیج DESeq2 جداسازی شد. سپس، آنالیز عملکردی ژن‌ها از جمله مسیرهای سیگنالینگ، فرآیندهای بیولوژیکی و بیماری‌های قلبی و موقعیت‌های کروموزومی تأثیرپذیر از ژن‌های دارای تفاوت بیان در مسیر تمایز مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد ۱۴۶۳ ژن در بین نمونه‌های موردنظر دارای افزایش بیان و ۱۶۸۲ ژن نیز کاهش بیان داشتند. علاوه بر بررسی آنالیزهای عملکردی مشخص شد ژن‌هایی مانند TTN, MYBPC3, TNNC1, MYH6, MYH7 از جمله ژن‌هایی هستند که هم در تمایز سلول‌های قلبی و هم در کاردیومیوپاتی اتساعی و کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک نقش خواهند داشت و همچنین موقعیت‌های کروموزومی chr5p11, chr4q, chr11q21, chr11p1 به ترتیب جزء موقعیت‌های کروموزومی مهم در بین ژن‌های دارای تفاوت بیان بودند.

**نتیجه گیری:** در نهایت، بررسی‌های مولکولی دقیقتر منجر به دستیابی به ژن‌های قابل اعتماد برای شناسایی بیومارکرهای قلبی خواهد شد که برای تحقیقات زیست‌پزشکی، توسعه دارو و کاربردهای بالینی ضروری است.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** مرکز آموزشی تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی

شیوه استناد به این مقاله:

Gholipour A, Shakerian F, Zahedmehr A, Irani S, Malakootian M, Mowla SJ. The Importance of Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Identifying Biomarkers Associated with Heart Disease. Razi J Med Sci. 2021;28(12):153-165.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



Original Article

## The Importance of Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Identifying Biomarkers Associated with Heart Disease

**Akram Gholipour:** PhD Student, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Farshad Shakerian:** Professor, Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Cardiovascular Intervention Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Ali Zahedmehr:** Associate Professor, Cardiovascular Intervention Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Shiva Irani:** Associate Professor, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Mahshid Malakootian:** Associate Professor, Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (\* Corresponding author) Malakootian@rhc.ac.ir

**Seyed Javad Mowla:** Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (\* Corresponding author) sjmowla@yahoo.com

### Abstract

**Background & Aims:** An adult heart has limited regenerative potential, resulting in many problems such as ischemic heart disease and diseases in which heart muscle cells (cardiomyocytes) become defective, leading to heart failure. Since therapies for heart disease and heart transplants are limited due to the small number of heart donors, the ability of pluripotent stem cells to differentiate into heart disease, especially in regenerative medicine, has received considerable attention. Recently, stem cells can be induced to produce functional cardiomyocyte cells using a variety of methods (1-3). As a result, the formation of heart muscle cells from stem cells requires a deep understanding of the molecular processes involved in the evolution of myocardial cells(7). The aim of this study was to investigate genes with differential expression between embryonic stem cells and differentiated cardiomyocyte cells by bioinformatics analysis. Furthermore, we show the importance of these genes in the development of heart disease in order to utilize this model to achieve more appropriate biomarkers for heart diseases which are effective in both cardiac differentiation and heart disease.

**Methods:** RNA-sequencing samples of embryonic stem cells (hESC) and differentiated cardiomyocyte cells were obtained from the dataset number GSE76523 (14). FastQC software was used to check the quality of the raw data reads. Adapter sequences and low quality sequences were removed using Trimmomatic software, version 0.36. Using HISAT2 software, version 2.1.0, the sequences were aligned with the genome, and using the annotation reference obtained from the UCSC database and HTSeq software, version 0.9.1, the reading count of each gene was obtained and using DESeq2 Package in the R program. Genes with differential expression between stem cell samples and differentiated cells were isolated. To evaluate the functional analysis of genes with differences in expression between the two groups, the KEGG and Enrichr databases were used to examine important pathways and biological processes in which genes with differential expression were involved. In the ClinVar and DisGeNET databases, it was determined which genes with differential expression would play a role in heart diseases. In addition, using the database of chromosomal location, important chromosomal positions of genes with differential expression between the two groups were analyzed.

**Results:** Our results showed that between the two groups, 1463 and 1682 genes had increased and decreased expression, respectively. Functional analysis and examination of disease databases demonstrated genes with differential expression had essential roles in

### Keywords

Cardiomyocyte cells differentiation, Heart disease, Stem cells

Received: 04/10/2021

Published: 22/02/2022

dilated cardiomyopathy (DCM), hypertrophic cardiomyopathy (HCM), arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), adrenergic signaling in myocardial cells, myocardial contraction, and myocardial infarction. Moreover, chr5p11, chr4q, chr11q21 and chr11p1 locations correspondingly were important chromosomal positions among genes with differential expression. Interestingly, it was found that genes involved in the differentiation of cardiomyocyte cells can also be involved in heart diseases as well. Among the genes with differential expression that were examined in different functional analyzes, genes including TTN, MYBPC3, TNNC1, TPM1, ACTC1, MYL2, TNNT2, MYH6, and MYH7 were important genes in both cardiac differentiation and heart diseases, especially different types of cardiomyopathies.

**Conclusion:** As the prevalence of cardiac disorders such as cardiomyopathies is increasing and due to the limitations of existing experimental models, suitable progress in treatment strategies for these disorders has not been encountered. One of the important factors in the development of cell-based models in heart disease is the existence of reliable methods for the production of heart cells from stem cells (17,18). In the present study, by investigating the signaling pathways and database, it was found that genes with differential expression in the differentiation of stem cells into heart cells can play a role in causing various heart diseases, especially dilated DCM and HCM. Better understanding of the underlying pathological mechanisms of these diseases will help prevent disease progression (24).

In addition, we introduced genes which are involved in both cardiac cell differentiation and cardiomyopathy via bioinformatics analysis. Among them, TTN, MYBPC3, TNNC1, TPM1, ACTC1, MYL2, TNNT2, MYH6 and MYH7 genes were found to be involved in patients with dilated cardiomyopathy as well as hypertrophic cardiomyopathy. All of these genes were expressed in cardiac cells resulting from stem cell differentiation. Studies have shown that heterozygous mutations in the sarcomeronein T (TNNT2) protein, which were produced by induced stem cells, impaired calcium control and decreased contraction (27,28). Other stem cell models have examined the effect of LMNA encoding genes (LMNA A / C) and TTN on cardiomyopathy, and have found that TTN mutations are associated with heart disease, especially dilated cardiomyopathy (31). Other studies have shown sarcomere protein mutations,  $\beta$ -myosin heavy chain mutations, and MYH7 genes are associated with hypertrophic cardiomyopathy (32).

In this disease stem cell models with mutations in MYH7 and MYBPC3, showed many of the features of the disease, such as cell enlargement, sarcomere disorder and contraction, as well as altered gene expression in calcium administration (33,34). Mutations in the TNNC1 gene also play a central role in the development of hypertrophic cardiomyopathy (38). A study of a large family with familial hypertrophic cardiomyopathy showed that a mutation in the TPM1 gene was associated with the clinical features of cardiac hypertrophy (39). Studies highlight an important role for MYL2 phosphorylation as an important contractile protein in the adult heart. These studies further show that the disappearance of mediated phosphorylation mechanisms in this gene causes dilated cardiomyopathy. Further studies have shown that in the model of hypertrophic cardiomyopathy using human cell-derived stem cells (hiPSC-CMs), the presence of cardiac actin E99K-ACTC1 mutation causes abnormal phenotypes in the produced hiPSC-CMs (40,41). In this study, important chromosomal positions including chr5p11, chr4q, chr11q21 and chr11p1 were introduced, which suggested that these positions may play a role in heart diseases, especially cardiomyopathies. Studies have not yet addressed the role of these chromosomal positions in heart diseases. Therefore, more detailed study and attention to tissue origin genes as well as studies of important chromosomal positions will be needed to achieve more specific biomarkers for the heart diseases and clarify the mechanisms of the heart diseases as well as cardiomyocyte differentiation.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Rajaie Cardiovascular, Medical and Research Center

#### Cite this article as:

Gholipour A, Shakerian F, Zahedmehr A, Irani S, Malakootian M, Mowla SJ. The Importance of Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Identifying Biomarkers Associated with Heart Disease. Razi J Med Sci. 2021;28(12):153-165.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

اولین رویداد در ارگانل زایی در طی تکامل جنین، ایجاد قلب است. اگرچه دانش بدست آمده از مکانیسم مولکولی ایجاد قلب در انسان هنوز در مراحل اولیه است (۱). قلب بالغ پتانسیل باز ساختی محدودی دارد بنابراین کمبود سلول‌های عضله قلبی (کاردیومیوسیت‌ها) در بیماری‌های ایسکمی قلبی غیر قابل برگشت بوده و در نتیجه منجر به heart failure (نارسایی قلب) می‌شود. جایگزینی‌های درمانی نیز در بیماری‌های قلبی محدود است؛ زیرا پیوند قلب به دلیل کمبود تعداد افراد اهداکننده قلب به اندازه محدودی انجام می‌شود، اگرچه چندین clinical trials (کارآزمایی بالینی) به سمت استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان برای بازسازی عضله قلب بعد از حمله قلبی مورد بررسی قرار گرفته است؛ اما یکی از روش‌های دیگر، استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی (Human embryonic stem cells hESC) است که از جمله سلول‌های بنیادی همه توان می‌باشند. پیوند سلول‌های قلبی اگروژنوس می‌تواند باعث ایجاد سلول‌های قلبی دارای عملکرد شده در نتیجه استراتژی درمانی قابل اعتمادتری را برای جایگزینی بافت قلبی آسیب دیده و بازگردانی عملکرد قلب فراهم کند. (۲،۳). امروزه تکنولوژی سلول‌های بنیادی این امید را ایجاد کرده است که درمان‌های جدیدی را برای آسیب بافتی قلب فراهم آورد (۱). جداسازی موفق سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESCs) و همچنین تولید سلول‌های بنیادی القایی (Human induced pluripotent stem cells hiPSCs) از جمله رویدادهای جدید دارای الویت برای تحقیقات در زمینه درمان بیماری‌های قلبی عروقی است (۴،۵). سلول‌های بنیادی همه توان، توانایی نامحدودی در self-renewal (خودبازسازی) دارند و همچنین می‌توانند به سه لایه زاینده، تمایز یافته و انواع سلول‌های بدن را ایجاد کنند (۶). سلول‌های قلبی انسانی می‌توانند از بیوپسی قلبی جدا شوند، اما دستیابی به آن‌ها محدود بوده و ضمن اینکه مراحل این جداسازی پیچیده بوده و امکان بدست آوردن سلول‌های با کیفیت هم بسیار اندک است. در نتیجه به دست آوردن مدل‌های in vitro (در شرایط آزمایشگاه) جهت دستیابی به سلول‌های قلبی بسیار مهم است (۷). امروزه

سلول‌های قلبی می‌توانند از سلول‌های بنیادی همه توان به صورت (۱) تمایز Embryoid body (EB) خودبخودی در سوسپانسیون، (۲) Co-culture با سلول‌های موشی شبه اندودرم (END-2cells) یا (۳) تمایز قلبی توسط فاکتورهای رشد مشخص در سوسپانسیون یا در کشت تک لایه بدست آیند (۸). بعلاوه تاکنون تنها سلول‌های بنیادی همه توان بودند که در in vitro به صورت مؤثری به سلول‌هایی شبیه سلول‌های قلبی دارای ضربان خودبخودی تمایز یافته‌اند (۹، ۱۰). همچنین مشخص شده است که تکنولوژی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی هم می‌توانند منبع اضافه‌ای برای تمایز سلول قلبی در in vitro باشند (۱۱، ۱۲). مطالعات نشان داده است که سلول‌های قلبی که از سلول‌های بنیادی همه توان مشتق می‌شوند، می‌توانند ابزارهای مهمی برای انجام تست‌های ایمنی داروها باشند (۸).

ایجاد سلول‌های پیش ساز قلبی و سلول‌های عضله قلبی از سلول‌های بنیادی همه توان، نیازمند درک عمیق از فرآیندهای درگیر در مسیر تکامل سلول‌های عضله قلبی است تا بتواند به عنوان الگویی برای تمایز in vitro از سلول‌های بنیادی قرار بگیرد (۱۳). هدف از انجام این مطالعه این است که توسط آنالیزهای بیوانفورماتیکی به بررسی ژن‌های دارای تفاوت بیان در بین سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های قلبی تمایز یافته از آن پرداخته و اهمیت این ژن‌ها را در ایجاد بیماری‌های قلبی نشان دهیم تا بتوانیم با استفاده از این مدل in vitro، به بیومارکرهای مناسب‌تری برای بیماری‌های قلبی و تأثیرپذیر از تمایز قلبی دست پیدا کنیم.

## روش کار

**بدست آوردن دیتاست و نمونه‌های مورد بررسی:** دیتاست استفاده شده در مطالعه حاضر، از پایگاه داده NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) دانلود شد. نمونه‌های RNA-sequencing سلول‌های بنیادی جنینی (hESC) و سلول‌های عضله قلبی تمایز یافته از آن (Cardiomyocytes: CMs)، هر کدام با سه تکرار، از دیتاست با شماره GSE76523 بدست آمد (۱۴).

گرفت. همچنین با استفاده از پایگاه داده Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) فرآیندهای بیولوژیکی (BP: Biological Process) مورد آنالیز قرار گرفت.

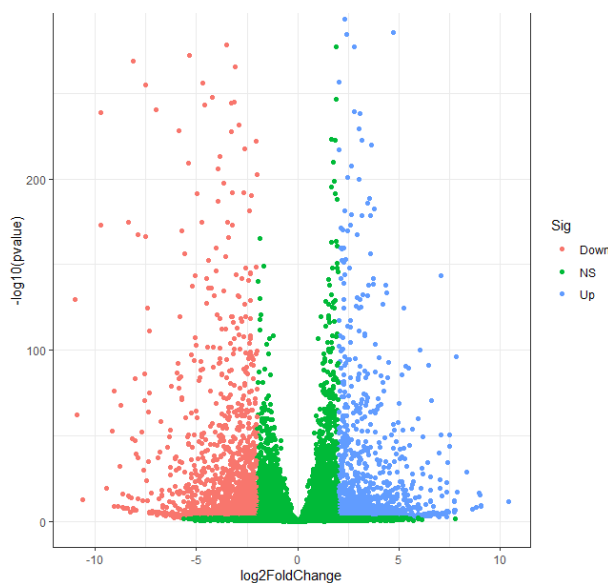
**بررسی ژن‌های با تفاوت بیان در ایجاد بیماری‌های قلبی و موقعیتهای کروموزومی مهم آن:** در ادامه ژن‌های دارای تفاوت بیان بین دو گروه hESC و CM، در پایگاه داده ClinVar (<https://www.clinicalgenome.org>) و DisGeNET (<https://www.disgenet.org>) مورد بررسی قرار گرفتند تا مشخص شود ژن‌های دارای تفاوت بیان در تمایز، در ایجاد کدام یک از بیماری‌های قلبی نقش خواهند داشت. همچنین با استفاده از پایگاه داده (موقعیت یا جایگاه کروموزومی) chromosome location، موقعیتهای مهم کروموزومی ژن‌های دارای تفاوت بیان بین دو گروه در تمایز، مورد آنالیز قرار گرفت.

### یافته‌ها

**ژن‌های دارای تفاوت بیان در نمونه‌های hESC و CM:** نتایج نشان داد که ۱۴۶۳ ژن در بین نمونه‌های hESC و CM دارای افزایش بیان و ۱۶۸۲ ژن نیز کاهش بیان داشتند. نمودار آتشفشانی در شکل ۱

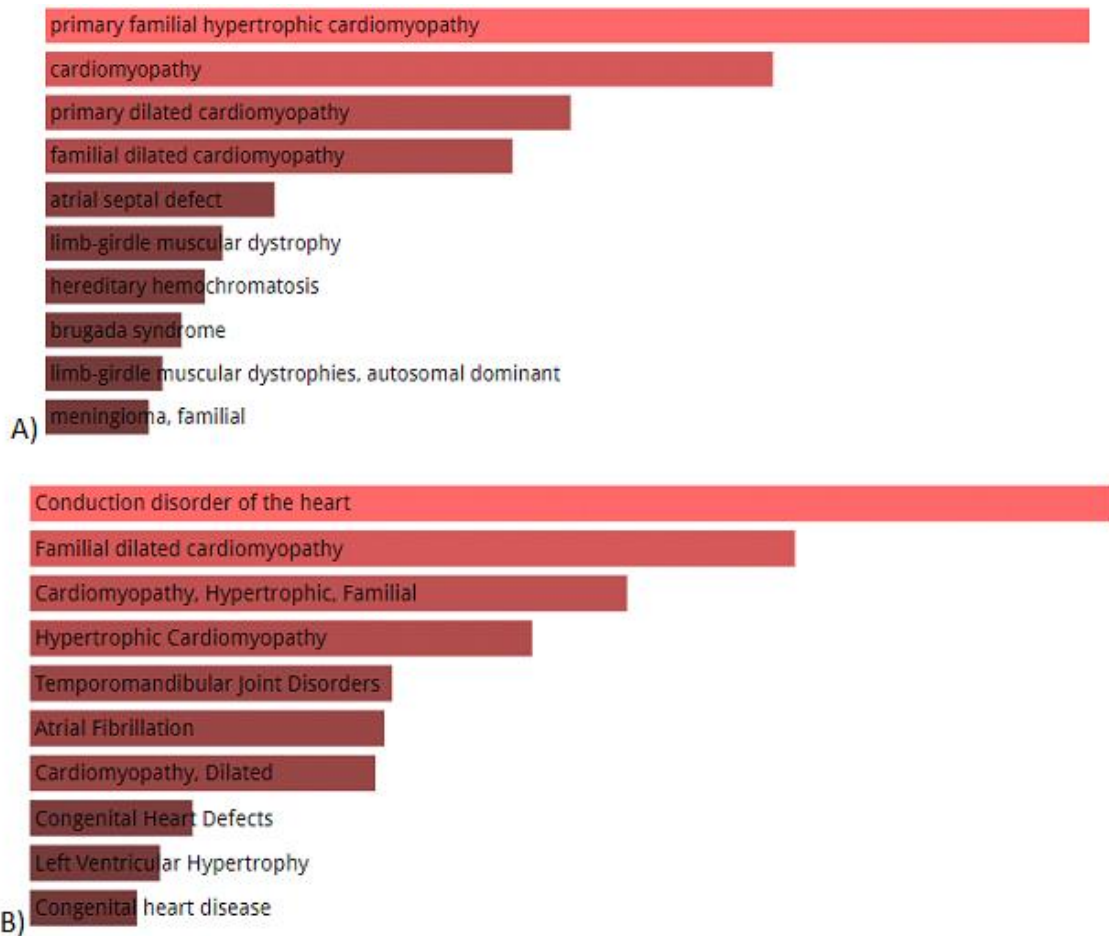
**آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌های خام نمونه‌ها:** در ابتدا فایل‌های خام داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار FastQC مورد بررسی قرار گرفت تا از نظر کیفیت خوانش‌ها بررسی شوند. سپس برای از بین بردن توالی‌های آداپتور و خوانش‌های نامناسب از Trimmomatic, version 0.36 استفاده شد. همچنین بعد از این مرحله نیز، کیفیت خوانش‌ها با نرم‌افزار FastQC بررسی و تأیید شد. هم‌ردیف کردن توالیها با ژنوم hg38 توسط HISAT2, version 2.1.0 انجام گرفت. در ادامه، RefSeq بدست آمده از پایگاه داده UCSC، به عنوان رفرنس annotation برای ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. میزان خوانش هر ژن نیز با HTSeq, version 0.9.1 آنالیز شد. با استفاده از پکیج DESeq2 در زبان برنامه نویسی R، ژن‌های دارای تفاوت بیان بین نمونه‌های hESC- CM، با در نظر گرفتن دو پارامتر  $\log_2\text{FoldChanges} \neq 2$  و  $P \text{ values} < 0.05$ ، مشخص شدند تا در ادامه‌ی آنالیزها، از آن‌ها استفاده شود.

**آنالیز عملکردی برای ژن‌های دارای تفاوت بیان:** با استفاده از پایگاه داده (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) مسیره‌های مهمی که ژن‌های دارای تفاوت بیان بین نمونه‌های hESC و CM در آن دخیل بودند مورد بررسی قرار



**شکل ۱- نمودار آتشفشانی ژن‌های دارای تفاوت بیان.** نقاط قرمز نشان دهنده ژن‌های دارای کاهش بیان و نقاط آبی نشان دهنده ژن‌های با افزایش بیان هستند. نقاط سبز رنگ نیز ژن‌هایی هستند که تفاوت بیان خاصی را از لحاظ پارامتر  $\log_2\text{FoldChange}$  نشان نمی‌دهند.

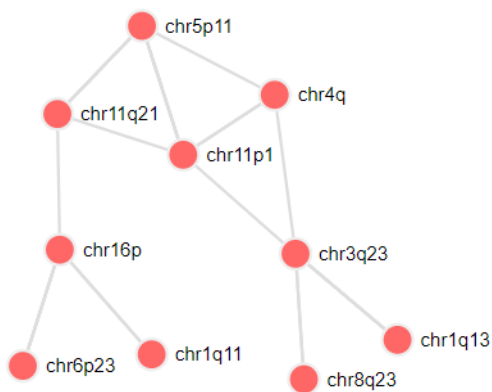




**شکل ۳- A)** پایگاه داده (B.ClinVar). **شکل ۳- B)** پایگاه داده DisGenET. در هر دو پایگاه داده بیماری‌های قلبی که ژنهای دارای تفاوت بیان بین نمونه‌های سلولهای بنیادی و سلولهای عضله قلبی تمایز یافته می‌توانند ایجاد کنند، مشخص شده است که بیشتر بیماریهای عضله قلبی را نشان می‌دهند.

### بحث

اگرچه روش‌های درمانی مبتنی بر سلول‌های بنیادی



**شکل ۴-** موقعیتهای مهم کروموزومی در بین ژنهای دارای تفاوت بیان بین نمونه‌های سلولهای بنیادی و سلولهای قلبی حاصل از تمایز آنها که به صورت شبکه ای نشان داده شده است.

تفاوت بیان بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های قلبی تمایز یافته از آن و هم در انواع بیماری‌های کاردیومیوپاتی نقش داشتند. بعلاوه، با بررسی پایگاه داده chromosome location، موقعیتهای کروموزومی مهم در بین ژنهای دارای تفاوت بیان در بین نمونه‌های ذکر شده، مشخص شده است. همانطور که در شکل ۴ مشخص شده است موقعیتهای کروموزومی جزء موقعیتهای کروموزومی مهم در بین ژنهای دارای تفاوت بیان بودند. در نتیجه می‌توان این نتیجه را نیز گرفت که احتمالاً ژن‌های درون این موقعیت‌ها، می‌توانند هم در تمایز و هم در ایجاد بیماری‌های قلبی نقش داشته باشند.

**جدول ۱-** فرآیندهای بیولوژیکی (BP) مهمی که ژنهای دارای تفاوت بیان بین نمونه سلولهای بنیادی جنینی و سلول قلبی تمایز یافته نشان می‌دهند. نام هر فرآیند و p-value آن در جدول مشخص شده است.

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio	Combined score
1	Heart development (GO:0007507)	3.583e-10	9.142e-7	2.38	51.70
2	Cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055008)	2.960e-10	0.000001510	4.08	89.60
3	Heart contraction (Go:0060047)	4.842e-8	0.00006177	3.34	56.28
4	Myofibril assembly (GO:0030239)	4.038e-8	0.00006868	3.27	55.67
5	Cardiac muscle cell development (GO:0055013)	1.521e-7	0.0001552	3.96	62.17
6	Circulatory system development (GO:0072359)	1.951e-7	0.0001659	2.33	35.99
7	Cardiac myofibril assembly (GO:0055003)	3.658e-7	0.0002074	4.72	69.91
8	Muscle contraction (GO:0006936)	3.261e-7	0.0002080	2.15	32.05
9	Sarcomere organization (GO:0045214)	2.914e-7	0.0002125	3.66	55.14
10	Cardiac muscle contraction (GO:0060048)	8.065e-7	0.0003741	3.34	46.88
11	Striated muscle contraction (GO:0006941)	7.665e-7	0.0003911	2.74	38.56
12	Ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis (GO:0055010)	0.000001634	0.0006948	3.34	44.52
13	Response to muscle stretch (GO:0035994)	0.000001948	0.0007645	5.94	78.10
14	Collagen fibril organization (GO:0030199)	0.000003908	0.001424	3.46	43.04
15	Cardiac muscle tissue development (GO:0048738)	0.000004459	0.001517	3.16	38.88
16	Ventricular cardiac muscle tissue development (GO:0003229)	0.000009648	0.003077	3.82	44.10
17	Cardiac ventricular morphogenesis (GO:0003208)	0.00001887	0.005665	2.80	30.43

بنابراین شناخت ژنهای مهم دخیل در فرآیند تمایز سلول قلبی و همچنین ایجاد بیماری‌های قلبی، ما را به درک بهتر در بررسی مدل‌های *in vitro* نزدیک خواهد کرد (۱۷ و ۱۸).

تعداد زیادی از بیماری‌های قلبی با از دست دادن حاد یا پیشرونده سلول‌های عضله قلبی مشخص می‌شوند که ظرفیت احیا کننده مشخصی ندارد (۱۹). تولید سلول‌های عضله قلبی برای جایگزینی این سلول‌های از دست رفته منجر می‌شود تا سلول‌های عضله قلبی جدید در قلب گنجانیده شوند و همچنین تکثیر سلول‌های درون زا در قلب را تحریک می‌کنند. تولید سلول‌های عضله قلبی از سلول‌های بنیادی، این امیدواری را ایجاد کرده است که این سلول‌ها برای درمان‌های جایگزینی سلولی مناسب باشند (۲۰). در یک مدل خوکچه هندی، این سلول‌ها توانستند آریتمی قلبی را سرکوب کنند (۲۱). علاوه بر این، مناسجه و همکاران نخستین کارآزمایی بالینی سلول‌های عضله

شامل پیوند سلول برای برخی از بیماریها به واقعیت تبدیل می‌شوند. اما برای بسیاری از شرایط، از جمله انفارکتوس میوکارد، موانع قابل توجهی هنوز وجود دارد که برای رسیدن به چنین درمانهایی باید برطرف شوند (۱۵، ۱۶). شیوع اختلالات قلبی مانند آریتمی اولیه، کاردیومیوپاتی در حال افزایش است؛ اما پیشرفت متناسب در استراتژی‌های درمان این اختلالات تا حدودی به دلیل محدودیت‌های مدل‌های تجربی موجود، برآورده نشده است. اگرچه مدل‌های حیوانی سهم عمده‌ای در شناخت ما از بیماری‌های قلبی عروقی دارند، اما تفاوت‌های بینابینی در سطح ژنتیکی و فیزیولوژیکی، توانایی ما در ترجمه این یافته‌ها به درمان‌های مختلف برای انسان را دچار اشکالاتی می‌کند. یکی از موارد مهم در توسعه مدل‌های مبتنی بر سلول در بیماری‌های قلبی، وجود روش‌های قابل اعتماد برای تولید سلول‌های قلبی از سلول‌های بنیادی همه توان و ارزیابی فنوتیپ‌های قلبی، در بیماری است؛

به پیشرفت درمان‌های قلبی برای جلوگیری از پیشرفت بیماری کمک خواهد کرد. در این راستا پیش بینی می‌شود که مدل‌های کاردیومیوپاتی hPSC-CM بسیار مفید باشند (۱۸، ۲۶). DCM یکی از شایع‌ترین زیرگروه‌های کاردیومیوپاتی است. شیوع DCM خانوادگی بین ۱ در ۲۵۰ و ۱ در ۲۵۰۰ فرد تخمین زده شده است. بیش از ۳۰ ژن درگیر در مسیرهای ژنتیکی مختلف، از جمله تشکیل و انقباضات سارکومر و سیتواسکلت، پایداری پاکت هسته‌ای، پردازش و رونویسی ژن‌ها و تنظیم کلسیم در DCM شناسایی شده‌اند (۲۶). تا به امروز، جهش‌ها در شش ژن با استفاده از مدل‌های سلول‌های همه‌توان برای DCM مورد مطالعه قرار گرفته است. جهش هتروزایگوس بدمعنی (R173W) در پروتئین سارکومروپونین T (TNNT2) با سلول‌های بنیادی همه‌توان القایی تولید شده و مورد مطالعه قرار گرفت (۲۷). ویژگی‌های اصلی این بیماری، از جمله اختلال در کنترل کلسیم، کاهش انقباض و مهار SERCA2a، در مدل ساخته شده مشاهده شد (۲۸). سایر مدل‌های بدست آمده از سلول‌های بنیادی برای این بیماری، ژن‌های رمزگذاری لمین (LMNA A / C) و TTN را بررسی کرده‌اند (۲۹، ۳۰). هینسون و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از مدل سلول‌های بنیادی DCM، مشخص کردند که جهش‌های کوتاه‌کننده در محدوده باند A عضله قلب باعث نقص انقباضی بیشتر در مقایسه با باند I می‌شوند (۳۱).

بعلاوه، HCM همچنین یک زیرگروه رایج دیگر کاردیومیوپاتی است که شیوع آن ۱ در ۵۰۰ نفر است. جهش در ۲۳ ژن رمزگذار پروتئین سارکومر، جهش‌های زنجیره سنگین MYH7- $\beta$ -myosin به HCM مرتبط است (۳۲). مدل‌های سلول‌های بنیادی همه‌توان در بیماری HCM، با جهش در MYH7 و MYBPC3 می‌تواند تا حدودی بسیاری از ویژگی‌های این بیماری، مانند بزرگ شدن سلولی، بی‌نظمی سارکومر و انقباض و همچنین بیان ژن تغییر یافته در اداره کلسیم را نشان دهد (۳۳، ۳۴). همچنین با استفاده از انتقال ژن آدنوویروسی، نشان داده شد که بیان نوع وحشی ژن MYBPC3 در رده سلولی hESC حامل MYBPC3 در طی تمایز اولیه کاردیومیوسیتها، از بروز

قلبی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را در بیماران با اختلال عملکرد سیستولیک بطن چپ بررسی کرده‌اند. سلولها به قسمت اپیکاردیوم محل انفارکتوس پیوند داده شدند و کارایی آن در موشهای مدل بررسی شد (۲۲)؛ بنابراین مطالعات بر تکثیر و تمایز سلول‌های عضله قلبی در هنگام ترمیم قلب با استفاده از مدل‌های مختلف حیوانات متمرکز شده‌اند. این مطالعات منجر به کشف بسیاری از عوامل تنظیم‌کننده‌های چرخه سلولی و فاکتورهای رشد شده است که می‌توانند تکثیر سلول‌های عضله قلبی را ارتقاء داده و از مکانیسم‌هایی رونمایی کنند که ممکن است زمینه ساز احیای قلب در بیماریها باشد. با این وجود همچنان محدودیت‌هایی در ارتباط با استفاده از سلول‌های بنیادی در تمایز قلبی وجود دارد که از جمله آن قدرت تکثیر و تمایز بالای آن‌ها است، بنابراین باید جلوی تمایز ناخواسته و تصادفی آن‌ها گرفته شود تا تبدیل به بافت‌های دیگر نشوند و از ناهمخوانی بین بافت قلب و بافت ترمیم شده جلوگیری کرد (۲۳).

در مطالعه حاضر نیز، با بررسی مسیرهای سیگنالینگ و پایگاه‌های داده موجود در بررسی بیماری، مشخص شد که ژن‌های دارای تفاوت بیان در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی، می‌توانند در ایجاد انواع بیماری‌های قلبی، خصوصاً کاردیومیوپاتی اتساعی (DCM) و کاردیومیوپاتی هاپرتروفیک (HCM) نقش داشته باشد.

کاردیومیوپاتی‌ها گروهی از اختلالات قلبی هستند که بر روی عضله قلب تأثیر می‌گذارند. تغییرات سلول‌های عضله قلبی و پاسخ مداوم آن‌ها در سطح سلولی با مرگ ناگهانی و سایر مشکلات قلبی ارتباط دارد (۲۴). در نتیجه مطالعه بر روی ژن‌های تمایز سلول‌های قلبی می‌تواند در بررسی ژن‌های ایجادکننده‌ی این بیماری بسیار مهم باشد. جهش در بیش از ۵۰ ژن، مرتبط با کاردیومیوپاتی‌های DCM، HCM و arrhythmogenic (ACM) است (۲۵). بیشتر این اختلالات با تغییر در سازماندهی سارکومر مشخص می‌شوند که می‌تواند منجر به کاهش عملکرد میوکارد و نارسایی بالقوه قلبی شود. شناخت مکانیسم‌های پاتولوژیک اساسی این بیماری‌ها و به ویژه ترمیم قلب که اغلب قبل از آشکار شدن علائم بالینی رخ می‌دهد،

فوتوتیپی ساختاری و عملکردی HCM جلوگیری می کند (۳۵).

در نتیجه مدل‌های بیماری با استفاده از سلول‌های بنیادی همه توان می‌توانند از نظر ژنتیکی کاملاً مطابق با مبتلایان به بیماری باشد. از آنجا که می‌توان این نوع سلولها را به تعداد بسیار زیادی گسترش داد و در انواع مختلفی از سلولها که مربوط به بیماری‌های قلبی هستند، تمایز داد اهمیت مطالعه حاضر نیز این موضوع را تأکید می‌کند که شناخت بهتر ژن‌های منشا بیماری، به بررسی دقیق تر بیماری قلبی و مطالعه بر روی آن کمک می‌کند.

همچنین در مطالعه حاضر ژنهایی معرفی شد که از نظر بیوانفورماتیکی هم در تمایز سلول‌های قلبی و هم بیماری‌های کاردیومیوپاتی نقش داشتند. از این بین مشخص شد ژن‌های TTN، MYBPC3، TNNT2، MYH6، MYH7 در بیماران کاردیومیوپاتی اتساعی و همچنین کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک نقش دارند. تمامی این ژن‌ها در سلول‌های قلبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی، افزایش بیان داشتند.

پروتئین تیتین توسط ژن TTN رمزگذاری می‌شود که بزرگترین پروتئین در بدن است و یک عنصر اساسی سارکومر است. تیتین به عنوان یک چشمه بیولوژیکی، نیمی از sarcomere را پوشش می‌دهد. جهش‌های TTN با بیماری‌های قلبی، به ویژه کاردیومیوپاتی اتساعی (DCM) همراه است (۳۶).

در بررسی که توسط پارابهودایال و همکاران انجام شد مشخص شد که جهش در MYBPC3 شایعترین علت کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک (HCM) است. این جهش‌ها پروتئین ناکارآمدی تولید می‌کنند که به سرعت تخریب شده و در میوفیلامت‌ها گنجانیده نشده است. بررسی پروتئین و میزان بیان mRNA، کاهش معنی دار سطح cMyBP-C در بیماران MYBPC3mut نشان داد (۳۷).

در بررسی که توسط لندستروم و همکارانش انجام شد مشخص شد که جهش‌هایی که در ژن TNNT2 رخ می‌دهد در ایجاد HCM نقش مرکزی دارند (۳۸). در بررسی یک خانواده بزرگ دارای کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک خانوادگی، اولین بار با استفاده از تجزیه و

تحلیل پیوستگی و غربالگری ژن رمزگذاری آلفا-تروپومیوزین (TPM1)، نشان داده شد که جهش در ژن TPM1 با خصوصیات بالینی هایپرتروفی قلب همراه است (۳۹). در بررسی توسط اسمیت و همکارانش انجام شد، مدل کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک با استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان سلول‌های بنیادی مشتق از سلول‌های انسانی (hiPSC-CMs) به دست آمد و مشخص شد که وجود جهش اکتین قلبی E99K- ACTC1 فوتوتیپ‌های غیرنرمالی در hiPSC-CM‌های تولید شده ایجاد شده بود (۴۰).

میوزین زنجیره ای سبک ۲ (MYL2) یک پروتئین سارکومری ۱۹ کیلو دالتونی است که ماهیچه‌های پستانداران وجود دارد. مطالعات نقش مهمی برای فسفوریلاسیون MLC2v به عنوان یک پروتئین انقباضی مهم در قلب بزرگسالان برجسته می‌کند. این مطالعات بیشتر نشان می‌دهد که از بین رفتن مکانیسم‌های فسفوریلاسیون واسطه ای در این ژن باعث ایجاد کاردیومیوپاتی اتساعی می‌شوند (۴۱).

در ادامه نیز در مطالعات مشخص شد که جهش در هر یک از پروتئین‌های سارکومر قلبی میوزین زنجیره سنگین (MYH7 و MYH6) و تروپونین قلبی T (TNNT2) باعث کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک غالباً موروثی می‌شود و بیماران مبتلا به جهش در این ژن دارای ویژگی‌های بالینی مشخصی هستند. کسانی که جهش MYH7 دارند، هایپرتروفی قلب قابل توجه و یکنواخت تر و فرکانس متغیر مرگ ناگهانی را نشان می‌دهند. بیماران مبتلا به جهش TNNT2 عموماً هایپرتروفی قلبی خفیف یا بدون علامت دارند، اما فرکانس بالایی از مرگ ناگهانی در سنین پایین دارند (۴۲). در نتیجه می‌توان به اهمیت بررسی ژن‌های مسیر تمایزی در ایجاد بیماری‌های قلبی پی برد.

در ادامه، در این مطالعه موقعیتهای کروموزومی مهمی شامل chr4q، chr5p11، chr11q21 و chr11p1 معرفی شدند که ژن‌های دارای تفاوت بیان در تمایز سلول‌های قلبی، بیشتر در این موقعیتهای قرار داشتند در نتیجه می‌توان گفت این موقعیتهای می‌توانند در بیماری‌های قلبی خصوصاً کاردیومیوپاتی‌ها نقش داشته باشند. مطالعه ای تا کنون به نقش این موقعیتهای کروموزومی در بیماری‌های قلبی نپرداخته است؛ اما

Human Somatic Cells. *Science*; 2007. 318: 1917-1920.

6. Ameen A, Strehl R, Bjorquist P, Lindahl A, Hyllner J, Sartipy P. Human Embryonic Stem Cells: Current Technologies and Emerging Industrial Applications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008; 65: 54-80.

7. Meyer Th, Sartipy P, Blind F, Leisgen Ch, Guenther, E. New cell models and assays in cardiac safety profiling. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2007; 3: 507-517.

8. Vidarsson H, Hyllner J, Sartipy, P. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes for in Vitro and in Vivo Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2010; 6: 108-120.

9. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Amira Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001; 108: 407-414.

10. Mummery Ch, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endodermlike cells. *Circulation*. 2003; 107: 2733-2740.

11. Zhang J, F. Wilson G, G. Soerens A, H. Koonce Ch, Yu J, P. Palecek S, et al. Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res*. 2009;104: 30-41.

12. Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH, et al. Cardiomyocyte Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation*. 2009;120: 1513-1523.

13. Parikh A, Wu J, M. Blanton R, Tzanakakis, E.S. Signaling Pathways and Gene Regulatory Networks in Cardiomyocyte Differentiation. *Tissue engineering*. 2015;21.

14. D. Tompkins J, Jung M, Chen Ch, Lin Z, Ye J, Godatha S, et al. Mapping Human Pluripotent-to-Cardiomyocyte Differentiation: Methylomes, Transcriptomes, and Exon DNA Methylation "Memories". *EBioMedicine*. 2016; 4: 74-85.

15. Kimbrel EA, Lanza R. Current Status of Pluripotent Stem Cells: Moving the First Therapies to the Clinic. *Nat Rev Drug Discov*. 2015; 14: 681-692.

16. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2015;17: 11-22.

17. Davis RP, W van den Berg C, Casini S, Braam SR, Mummery CL. Pluripotent Stem Cell Models of Cardiac Disease and Their Implication for Drug Discovery and Development. *Trends Mol Med*. 2011; 17: 475-484.

18. Brandao KO, Tabel VA, Atsma DE, L Mummery Ch, Davis RP. Human Pluripotent Stem Cell Models of Cardiac Disease: From Mechanisms to Therapies. *Dis Model Mech*. 2017; 10: 1039-1059.

یکی از موقعیتهای مهم کروموزومی در بیماری قلبی عروقی chr9p21 است که مطالعات، ارتباط گسترده ژنومی این موقعیت را با بیماری عروق کرونری (CAD: Coronary artery disease) شناسایی کرده اند که به درک مسیرهایی که ممکن است بر حساسیت به CAD تأثیر بگذارد، کمک کرده است (۴۳)؛ بنابراین بررسی ارتباط موقعیتهای کروموزومی به بیماری قلبی دارای اهمیت می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، در این مطالعه ژن‌های دارای تفاوت بیان بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های قلبی تمایز یافته از آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که ژن‌های دخیل در تمایز می‌توانند در ایجاد بیماری‌های قلبی نیز نقش داشته باشند و برای بررسی دقیق‌تر بیماری‌های قلبی، توجه به ژن‌های منشأ بافت و همچنین بررسی‌های موقعیتهای کروموزومی مهم در آن، در دستیابی به بیومارکرهای اختصاصی‌تر بسیار حائز اهمیت خواهد بود.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان از دکتر علی شریفی زارچی بخاطر کمکهای علمی خود در هنگام تجزیه و تحلیل داده‌ها تشکر می‌کنند. این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی مرکز آموزشی تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهیدرجایی با کد (۹۴۱۱۱) پشتیبانی شد.

### References

1. Kristiina R, Mari PM, Aalto-Setälä K. Cardiac Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2011.
2. Solloway MJ, Harvey RP. Molecular Pathways in Myocardial Development: A Stem Cell Perspective. *Cardiovasc Res*. 2003;58(2): 264-277.
3. Chen K, Wu L, Wang, Z.Z. Extrinsic regulation of cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2008;104: 119-128.
4. Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Nat Protocol*. 2008;3: 1180-1186.
5. Yu J, A. Vodyanik M, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, L. Frane J, Tian Sh, et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from

19. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science*; 2009. 324: 98-102.
20. Burridge PW, Sharma A, Wu JC. Genetic and Epigenetic Regulation of Human Cardiac Reprogramming and Differentiation in Regenerative Medicine. *Annu Rev Genet*. 2015; 49: 461-484.
21. Shiba Y, Fernandes S, Zhu W, Filice D, Veronica Muskheli V, Kim J, et al. Human ES-cell-derived Cardiomyocytes Electrically Couple and Suppress Arrhythmias in Injured Hearts. *Nature*. 2012; 489: 322-325.
22. Menasche Ph, Vanneau V, Fabreguettes JR, Bel A, Tosca L, Garcia S, et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J*. 2015; 36: 743-750.
23. Cui M, Wang Zh, Bassel-Duby R, Olson EN. Genetic and epigenetic regulation of cardiomyocytes in development, regeneration and disease. *Development*. ;2018; 145.
24. A. Harvey P, Leinwand LA. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol*. 2011; 194: 355-365.
25. A M Wilde A, Behr ER. Genetic Testing for Inherited Cardiac Disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013; 10: 571-583.
26. E Hershberger RE, Hedges DJ, Morales, A. Dilated Cardiomyopathy: The Complexity of a Diverse Genetic Architecture. *Nat Rev Cardiol*. 2013; 10: 531-547.
27. Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Veronica Sanchez-Freire V, Abilez OJ, et al. Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Sci Transl Med*. 2012; 4.
28. Greenberg B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Butler J, Felker GM, Voors AA, et al. Design of a Phase 2b Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Advanced Heart Failure: The CUPID 2 Trial (Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease Phase 2b). *JACC Heart Fail*. 2014; 2: 84-92.
29. C Y Ho J, Zhou T, Lai WH, Huang Y, Chan Y, Li X, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines From 3 Distinct Laminopathies Bearing Heterogeneous Mutations in Lamin A/C. *Aging (Albany NY)*. 2011; 3: 380-390.
30. Siu Ch, Lee YK, Chung-Yee Ho J, Lai WH, Chan Y, Ng KM, et al. Modeling of Lamin A/C Mutation Premature Cardiac Aging Using Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4: 803-822.
31. T. Hinson J, Chopra A, Nafissi N, J. Polacheck W, C. Benson C, Swist S, et al. Titin mutations in iPSC cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science*. 2015; 349: 982-986.
32. Frey N, Luedde M, Katus, H.A. Mechanisms of Disease: Hypertrophic Cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 9: 91-100.
33. Han L, Li Y, Tchao J, D. Kaplan A, Lin B, Li Y, et al. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res*. 2014; 104: 258-269.
34. Lan F, S Lee A, Liang P, Sanchez-Freire V, K Nguyen P, Wang L, et al. Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12: 101-113.
35. Monteiro da Rocha A, Guerrero-Serna G, Helms A, Luzod C, Mironov S, Russell M, et al. Deficient cMyBP-C Protein Expression During Cardiomyocyte Differentiation Underlies Human Hypertrophic Cardiomyopathy Cellular Phenotypes in Disease Specific Human ES Cell Derived Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2016; 99: 197-206.
36. Bozkurt B, Colvin C, Cook J, T. Cooper L, Deswal A, C. Fonarow G, et al. Current Diagnostic and Treatment Strategies for Specific Dilated Cardiomyopathies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2016; 134: 579-646.
37. Parbhudayal RY, Garra AR, Gotte MJW, Michels M, Pei J, Harakalova M, et al. Variable Cardiac Myosin Binding protein-C Expression in the Myofilaments Due to MYBPC3 Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 123: 59-63.
38. Landstrom AP, Parvatiyar MS, Pinto JR, Marquardt ML, Bos JM, Tester DJ, et al. Molecular and Functional Characterization of Novel Hypertrophic Cardiomyopathy Susceptibility Mutations in TNNC1-encoded Troponin C. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 45: 281-288.
39. Jongbloed RJ, Marcelis CL, Doevendans PA, Schmeitz-Mulkens JM, Van Dockum WG, Geraedts JP, et al. Variable Clinical Manifestation of a Novel Missense Mutation in the Alpha-Tropomyosin (TPM1) Gene in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2003;. 41: 981-986.
40. G.W. Smith J, Owen Th, R. Bhagwan J, Mosqueira D, Scott E, Mannhardt I, et al. Isogenic Pairs of hiPSC-CMs with Hypertrophic Cardiomyopathy/LVNCAssociated ACTC1 E99K Mutation Unveil Differential Functional Deficits. *Stem Cell Rep*. 2018; 11: 1226-1243.
41. Sheikh Sh, Ouyang K, Campbell SG, Lyon RC, Chuang J, Fitzsimons D, et al. Mouse and Computational Models Link Mlc2v Dephosphorylation to Altered Myosin Kinetics in

Early Cardiac Disease. *J Clin Invest*; 2012. 122: 1209-1221.

42. Wa H, J. Mckenna W, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O.Donoghue A, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Eng J Med*.1995; 1058-1064.

43. Pilbrow AP, Folkersen F, Pearson JF, M Brown Ch, McNoe L, M Wang N, et al. The Chromosome 9p21.3 Coronary Heart Disease Risk Allele Is Associated With Altered Gene Expression in Normal Heart and Vascular Tissues. *PLoS One*. 2012; 7.