

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Hodnocení významu genetických variant detekovaných
sekvenováním nové generace pro identifikaci dědičných
poruch způsobujících kardiomyopatie**

Diplomová práce

Bc. Lenka Vysloužilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Ing. Rastislav Slavkovský, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Rastislava Slavkovského, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Podpis

SOUHRN

Kardiomyopatie je onemocnění srdečního svalu spojené s poruchou srdeční funkce. Nejčastějším typem je dilatační kardiomyopatie, která je ve 30-50 % případů dědičná. S nástupem technologie sekvenování nové generace se zvýšil počet genetického testování při identifikaci tohoto onemocnění. V klinické praxi může diagnostika genetickým testováním pomoci určit včasnou diagnózu i prognózu a může vést k preventivním opatřením, zejména u asymptomatických rizikových pacientů. V současné době je však interpretace výsledků této analýzy velmi náročná.

Teoretická část diplomové práce je proto zaměřena na problematiku kardiomyopatie, zejména dilatační kardiomyopatie, a její identifikace využitím sekvenování nové generace. Dále je zde popsána analýza sekvenačních dat, především tedy interpretace genových variant a také problematika funkčních testů spojených s molekulárními mechanismy kardiomyopatií.

V experimentální části práce byla provedena příprava DNA knihovny 12 vzorků pacientů s diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií a následná analýza sekvenováním nové generace zahrnující 174 genů asociovaných se srdečními poruchami. Z nalezených variant bylo vybráno 20 kandidátních variant, které by mohly být potenciálně patogenní a souviset s rozvojem dilatační kardiomyopatie. Pro jednoznačné potvrzení patogenity však bylo k dispozici málo informací a důkazů. Tyto vybrané varianty by proto měly být předmětem dalšího výzkumu.

SUMMARY

Cardiomyopathy is an illness of myocardium connected to its dysfunction. One of the most common type is dilated cardiomyopathy, which is in 30-50 % cases inherited. With the initiation of next-generation sequencing technology, the number of genetic testing has increased in identifying this disease. In clinical practice, diagnosis by genetic testing can help determine early diagnosis and prognosis, and can lead to preventative measures, especially in asymptomatic risk patients. However, currently the interpretation of the results of this analysis is very demanding.

The theoretical part of the thesis is therefore focused on the issue of cardiomyopathy, especially dilatation cardiomyopathy, and its identification by using the next-generation sequencing. There is also described a sequencing data analysis, particularly the interpretation of gene variants, and problems of functional tests associated with molecular mechanisms of cardiomyopathy.

In the experimental part, DNA library of 12 patient samples with diagnosed dilated cardiomyopathy was prepared, followed by a next-generation sequencing, including 174 genes associated with cardiac disorders. Of the found variants, 20 candidate variants were selected which could be potentially pathogenic and related to the development of dilatation cardiomyopathy. However, lack of information and evidence was available to confirm pathogenicity. Therefore, these selected variants should be the subject of further research.

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala panu Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny za pomoc a spolupráci v laboratoři a celé mojí rodině za morální podporu během studia.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	KARDIOMYOPATIE	3
3.1	Dilatační kardiomyopatie.....	3
3.1.1	Genetika dilatační kardiomyopatie.....	4
3.2	Identifikace familiární dilatační kardiomyopatie.....	12
3.2.1	Rodinná anamnéza	12
3.2.2	Kardiologické vyšetření příbuzných prvního stupně	12
3.2.3	Molekulární genetické testování	12
3.2.4	Využití sekvenování nové generace v diagnostice DCM.....	14
4	ANALÝZA SEKVENAČNÍCH DAT	18
4.1	Doporučený postup interpretace variant	19
4.1.1	Databáze	21
4.1.2	Výpočetní (<i>in silico</i>) prediktivní nástroje.....	23
4.1.3	Bioinformatické nástroje pro interpretaci variant	23
4.2	Interpretace genových variant u dilatační kardiomyopatie.....	24
5	FUNKČNÍ TESTY SPOJENÉ S MOLEKULÁRNÍMI MECHANISMY KARDIOMYOPATIÍ	28
5.1	Experimentální <i>in vitro</i> modely	30
5.1.1	Kardiomyocyty.....	30
5.1.2	Progenitorové buňky	31
5.1.3	Nekardiální buňky	32
6	MATERIÁL A METODIKA	33
6.1	Materiál.....	33
6.1.1	Biologický materiál	33
6.1.2	Použité soupravy a chemikálie	33
6.1.3	Přístrojová vybavení.....	33
6.2	Metodika	34
6.2.1	Izolace a příprava DNA.....	34
6.2.2	Příprava DNA knihovny.....	35
6.2.3	Sekvenace na přístroji MiSeq.....	42
6.2.4	Analýza sekvenačních dat	43
6.2.5	Navržení primerů a PCR amplifikace vybraných variant	43
7	VÝSLEDKY	45

7. 1	Kvalita sekvenačních dat	45
7. 2	Výsledky analýzy DNA	46
7. 2. 1	Variant Studio v3.0	47
7. 2. 2	BaseSpace Variant Interpreter.....	50
7. 2. 3	VarAFT	51
7. 2. 4	MOLDIMED	53
7. 2. 5	Cardio Classifier a ClinGen	54
7. 2. 6	Vybrané kandidátní genové varianty.....	54
7. 3	Navržení primerů a validace vybraných nalezených variant	56
8	DISKUZE	59
9	ZÁVĚR	66
10	LITERÁRNÍ ZDROJE	67
11	PŘÍLOHY	

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACM	Arrhythmogenic cardiomyopathy, arytmogenní kardiomyopatie
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	Association for Molecular Pathology
BAM	Binary Alignment/Map
BMC	Buccal mucosa cells, buňky bukální sliznice
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
ClinVar	Clinical Variants
CNV	Copy number variations, variabilita v počtu kopií
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
dbSNP	The Single Nucleotide Polymorphism Database
DCM	Dilated cardiomyopathy, dilatační kardiomyopatie
EHRA	European Heart Rhythm Association
ECHO	Echokardiografie
EKG	Elektrokardiografie
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FDC	Familial dilated cardiomyopathy, familiární dilatační kardiomyopatie
GME	Great Middle East
GMO	Geneticky modifikované mikroorganismy
GnomAD	The Genome Aggregation Database
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy, hypertrofická kardiomyopatie
hiPSC	Human induced pluripotent stem cells, lidské indukované pluripotentní kmenové buňky
HPLC	High-performance liquid chromatography, denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPO	The Human Phenotype Ontology
HRCR	The Haplotype Reference Consortium
HRM	High resolution melting, vysokorozlišovací analýza křivek tání
IDC	Familial idiopathic dilated cardiomyopathy, familiární idiopatická dilatační kardiomyopatie
IGV	Integrative Genome Viewer

iPSC	Induced pluripotent stem cells, indukované pluripotentní kmenové buňky
Kaviar	Known VARiants
LOVD	Leiden Open Variation Database
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
NCBI	National Center for Biotechnology
NGS	Next-Generation Sequencing, sekvenování nové generace
NHLBI EVS	National Heart, Lung, and Blood Institute - Exome Variant Server
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PACM	Pregnancy associated cardiomyopathy, kardiomyopatie asociovaná s těhotenstvím
PPCM	Peripartum cardiomyopathy, peripartální kardiomyopatie
SAM	Sequencing Alignmetn/Map
SNV	Single Nucleotide Variant, jednonukleotidová varianta
tnC	Troponin C
TTNtv	Truncating variants in the TTN gene, zkrácené varianty titinu
UCSC	University of California, Santa Cruz, genom browser
UMD	Universal Mutation Database
VarAFT	Variant Annotation and Filter Tool
VCF	Variant Call Format
VEP	Variant Effect Predictor
VUS	Variants of uncertain significance, varianty s nejistým významem

1 ÚVOD

Kardiomyopatie představují skupinu onemocnění srdečního svalu vedoucí k poruchám srdeční funkce. Na základě původu svého vzniku a klinických projevů je rozlišováno pět typů: kardiomyopatie dilatační, hypertrofická, restriktivní, arytmogenní a skupina neklasifikovaných kardiomyopatií. Nejčastějším typem je dilatační kardiomyopatie, která je ve 30-50 % případů dědičná. V současné době je známo velké množství mutací v několika různých genech asociovaných s tímto onemocněním.

S nástupem technologie sekvenování nové generace je v dnešní době stále více k identifikaci dědičných kardiomyopatií využíváno genetické testování. V klinické praxi může diagnostika genetickým testováním pomoci určit jak včasnou diagnózu, tak i prognózu. Může tak vést k preventivním opatřením zejména u asymptomatických rizikových pacientů. Samotná interpretace výsledků genetického testování je však v současné době velmi náročná, a to hlavně z důvodu velkého množství sekvenačních dat, které sekvenování nové generace poskytuje, a poměrně vysoké frekvence vzácných benigních změn v populaci. Dalším významným důvodem jsou nesrovnalosti v klasifikaci variant mezi různými klinickými laboratořemi.

2 CÍLE PRÁCE

1. Sepsat řešerši na téma dilatační kardiomyopatie, se zaměřením na genetiku tohoto onemocnění, řešerši zaměřenou na analýzu sekvenačních dat a interpretaci genových variant a řešerši o *in vitro* funkčních testech, které zkoumají důsledky nukleotidových variant v genech souvisejících s kardiomyopatiemi.
2. Připravit sekvenační knihovnu DNA pomocí Illumina Trusight Cardio Sequencing kitu, sekvenovat vzorky pacientů s dilatační kardiomyopatií a pokusit se v kooperaci se spolupracovníky identifikovat patogenní mutace potenciálně související s onemocněním.
3. Navrhnout komplexní systém pro vyhodnocení významu detekované varianty a validovat vybrané varianty alternativní metodou sekvenace amplikonů. Nastínit návrhy klonování vybraných detekovaných variant do vhodných expresních vektorů.

3 KARDIOMYOPATIE

Kardiomyopatie představují strukturální nebo funkční onemocnění srdečního svalu, kdy tato srdeční patologie není vysvětlená ischemickou chorobou srdeční, arteriální hypertenzí, chlopenní či vrozenou srdeční vadou (Elliott *et al.*, 2008). Často jsou tyto abnormality spojeny s vysokým rizikem život ohrožujících arytmií a prvním projevem onemocnění mnohdy bývá náhlá smrt. Pojem kardiomyopatie zahrnuje 5 typů onemocnění, které se liší svým původem a projevy. Hovoříme o dilatační, hypertrofické, restriktivní, arytmogenní kardiomyopatii a skupině neklasifikovaných kardiomyopatií. Nejčastějším typem je právě dilatační kardiomyopatie, která je ve většině případů dědičná.

3.1 Dilatační kardiomyopatie

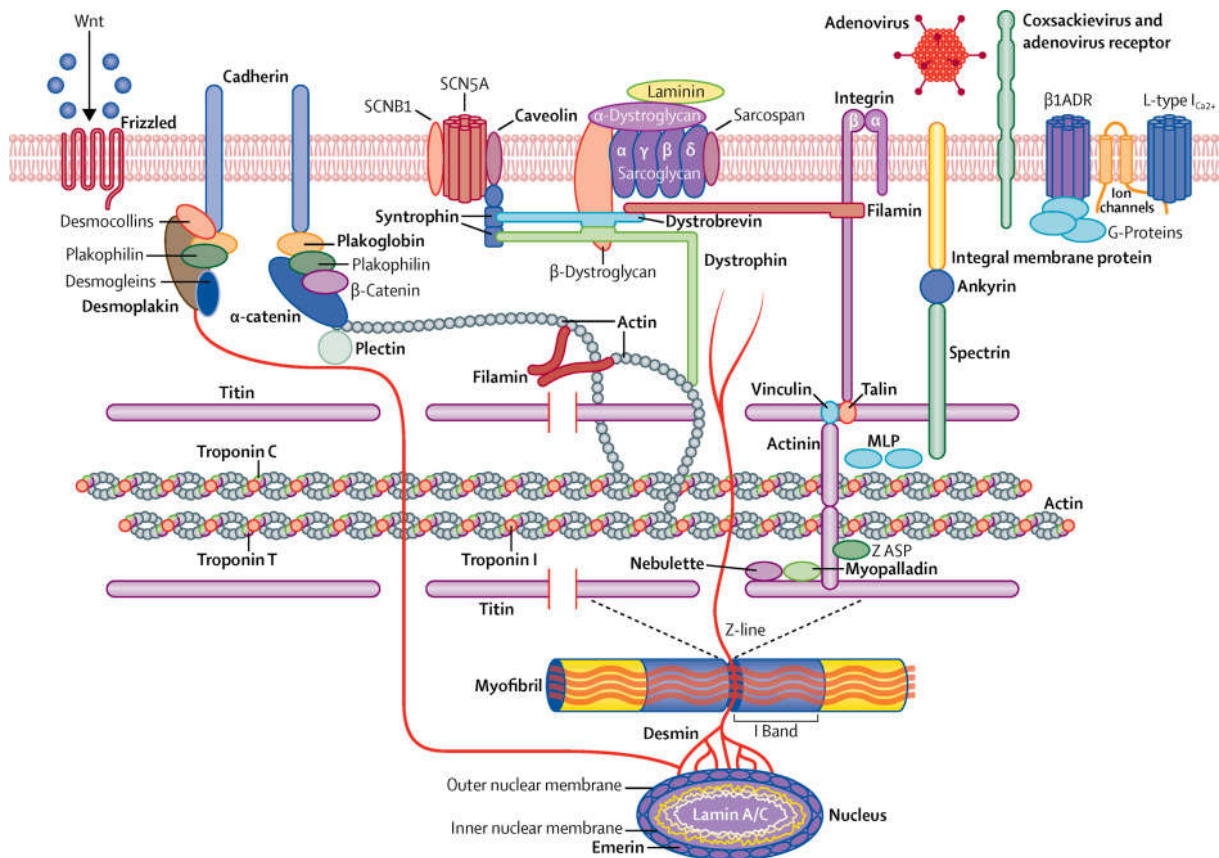
Dilatační kardiomyopatie (DCM) představuje závažný zdravotní problém jak u dospělých, tak u dětské populace (Elliott *et al.*, 2008). Je charakterizována dilatací srdečního svalu, komorové stěny se ztenčují a vzniká systolická porucha levé nebo obou komor. Prevalence onemocnění je 1 : 2500 a roční incidence je uváděna 5-8 případů na 100 000 obyvatel, přičemž častěji bývají postiženi muži než ženy (3:1) a vzhledem k rasové a národní příslušnosti to jsou častěji Afroameričané. U dětské populace je DCM převládajícím typem kardiomyopatie s výskytem 0,57 na 100 000 případů (Kirk *et al.*, 2009; den Boer *et al.*, 2015). DCM má vysokou míru morbidity, mortality a je nejčastější příčinou srdečního selhání u mladých lidí (Sugrue, 1992). Podle nejnovějších publikovaných zdrojů je DCM definována jako systolická dysfunkce a dilatace levé nebo obou komor, která není vysvětlena abnormálními zatěžovacími podmínkami nebo koronárním onemocněním (měřeno zejména echokardiografií nebo magnetickou rezonancí srdce), a to s ohledem na to, že u dilatace levé komory je end-dyastolický objem nebo průměr $>2SD$ (pozn. z-skóre je větší než 2 standartní odchylky) od normálu podle normogramů upravených podle plochy povrchu těla a věku, nebo plochy povrchu těla a pohlaví (Pinto *et al.*, 2016). Tyto patologické změny potom mohou vést k srdečnímu selhání nebo k předčasné smrti pacienta. Možností pacienta je tak transplantace srdce, která je však vzhledem k omezené dostupnosti dárcovských orgánů a komplikovanému řízení klinického průběhu, volena jako poslední (Lund *et al.*, 2015). Moderní genetické testování urychlilo identifikaci prediktivních biomarkerů, zatímco pokročilé zobrazovací technologie rozšířily chápání o etiologii vedoucí k DCM.

Během posledních dvaceti let bylo postupně díky zlepšování klinického a genetického základu DCM identifikováno několik faktorů představujících příčinu DCM, jako jsou infekční

agens vedoucí k myokarditidě, některé chemické látky, jako jsou léky nebo toxiny, peripartální období, nutriční nedostatky, autoimunitní poruchy nebo kombinace některých těchto prvků (Pinto *et al.*, 2016). Nicméně, ve velkém počtu případů zůstává etiologie nevyřešena nebo je choroba nazývána idiopatickou. Ve skupině idiopatických DCM 30-50 % případů postihuje celé rodiny a jedná se tedy o onemocnění s genetickým původem. V případě, že dva nebo více členů rodiny splňují diagnostická kritéria, je DCM označována jako familiární (McCartan *et al.*, 2012).

3. 1. 1 Genetika dilatační kardiomyopatie

V současné době bylo identifikováno více než 400 patogenních variant u téměř 60 genů souvisejících s rozvojem DCM. Tyto geny kódují různé proteiny jádra, sarkomery, cytoskeletu nebo membrány a ve všech případech genetická změna indikuje strukturální a funkční důsledky, které narušují vytváření a přenos síly myokardu a životaschopnost buněk. DCM může vykazovat dědičnost autozomálně dominantní, autozomálně recesivní, nebo X-vázanou a v některých případech byly pozorovány určité chromozomální abnormality, a dokonce byly hlášeny případy s mitochondriální dědičností (Hershberger *et al.*, 2013). Genetické příčiny DCM jsou různé a mechanicky zahrnují geny kódující proteiny sarkomery, cytoskeletu, jaderného obalu, transkripční dráhy a proteiny mitochondriální (viz **Obrázek č. 1**) (Towbin, 2010).



Obrázek č. 1: Genetické příčiny dilatační kardiomyopatie (Towbin, 2010): Souhrnné schéma proteinů jejichž geny jsou asociovány s DCM; β1ADR = β1ADR adrenergní receptor; MLP = svalový LIM protein; Wnt = signální dráha Wnt; Frizzled = membránový receptor; SCN1B = beta-1 podjednotka sodného kanálu; SCN5A = alfa-5 podjednotka sodného kanálu.

Téměř 60 % rodinných případů DCM vykazuje jakoukoli genetickou změnu v jednom z více než 60 genů spojených s DCM, a to především s autosomální dědičností. Nedávné studie uvádějí, že nejčastěji jsou za familiární DCM odpovědné patogenní varianty v genu *TTN* (Haas *et al.*, 2015; Hinson *et al.*, 2015) a tzn., že téměř 30-35 % rodin diagnostikovaných dilatační kardiomyopatií vykazuje jakoukoli změnu v tomto genu. Druhým nejčastějším genem, jehož mutace zapříčiňují DCM, je *LMNA* zodpovědný za 10-15 % případů. **Tabulka č. 1** shrnuje další geny asociované s DCM a jejich frekvence výskytu. S případy DCM byly také spojeny jiné genetické změny jako je variabilita v počtu kopií (copy number variations – CNV), které se však vyskytují s nízkou frekvencí (Pérez-Serra *et al.*, 2015). V roce 2017 bylo na více než sedmatisících případech klinické kardiomyopatie zjištěno, že u některých genů, které byly dříve označovány jako významné příčiny dané kardiomyopatie, nejsou vzácné varianty klinicky informativní, protože zde existuje velmi vysoká pravděpodobnost falešně pozitivní interpretace (Walsh *et al.*, 2017). Nedávná studie také ukázala, že řada variant uvedených v databázi

ClinVar je nesprávně klasifikována, a že úroveň důkazů v této databázi, které podporují patogenní povahu variant, klesá (Shah *et al.*, 2016).

Tabulka č. 1: Geny asociované s dilatační kardiomyopatií a jejich procentuální výskyt: zahrnuty pouze geny s výskytem větším než 1 % (Pérez-Serra *et al.*, 2016, doplněno Walsh *et al.*, 2017, upraveno).

Gen	Lokalizace	Protein	Frekvence [%]
<i>TTN</i>	Sarkomera	Titin	30-35
<i>LMNA</i>	Jádro	Lamin A/C	10-15
<i>MYH7</i>	Sarkomera	Těžký řetězec β -myosinu	5-10
<i>MYH6</i>	Sarkomera	Těžký řetězec α -myosinu	5-10
<i>TNNT2</i>	Sarkomera	Srdeční troponin T	5-10
<i>ACTC1</i>	Sarkomera	Srdeční aktin	5-10
<i>BAG3</i>	Ko-chaperon	Athano-gen 3	1-5
<i>DSP</i>	Desmozom	Desmoplakin	1-5
<i>MYBPC3</i>	Sarkomera	Myosin vazebný protein C	1-5
<i>RBM20</i>	Regulátor sestřihu mRNA	RNA vazebný protein 20	1-5
<i>SCN5A</i>	Iontový kanál	Sodíkový kanál	1-5
<i>TPM1</i>	Sarkomera	α -tropomyosin	1-5
<i>VCL</i>	Cytoskelet	Vinculin	1-5
<i>TCAP</i>	Sarkomera	Telethonin	1-5

V roce 2013 byla provedena studie (Li *et al.*), v rámci které bylo zjištěno, že polymorfismus v genu *ZBTB17* určitým způsobem indukuje citlivost k DCM u čínské populace. Dalším podobným případem je souvislost mezi DCM a polymorfismem intronu v genu *CTLA4*. Tato varianta zapříčiňuje citlivost ke kardiomyopatii, ale pravděpodobně nenarušuje průběh onemocnění (Ruppert *et al.*, 2010).

Je také zajímavé, že se genetický a patofyziologický podklad dědičných kardiomyopatií ve velké míře překrývá s podstatou dědičných forem srdečních arytmií, tzv. kanalopatií, kde je zařazován např. Brugada syndrom, syndrom časně repolarizace, ale také některé případy syndromu náhlého úmrtí kojence (Ackerman *et al.*, 2011; Tfelt-Hansen *et al.*, 2011).

Chromosomální abnormality

Dosud bylo zaznamenáno několik případů variability v počtu kopií zapříčiňující rozvoj DCM (Gupta *et al.*, 2010). V těchto případech se jednalo o delecii několika exonů v genu *LMNA*,

kteřá způsobuje abnormality jaderné membrány ohrožující normální funkci laminu a snižující jeho hladinu v buňce. Podobně také velké delece v genu *BAG3* byly spojeny s familiární DCM (Norton *et al.*, 2011).

Autozomálně dominantní dědičnost DCM

Většina familiárních případů DCM je způsobena patogenními variantami s autosomálně dominantní dědičností. Tyto patogenní varianty byly identifikovány v několika genech kódujících proteiny s různými funkcemi, jako jsou například iontové kanály, transkripční faktory, sarkomerické, desmozomální a jaderné proteiny (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

Iontové kanály

Ionové kanály představují komplexy membránových proteinů, jejichž funkcí je usnadnit difúzi iontů přes biologické membrány, například právě v myocytech. Patogenní varianty proteinů srdečních iontových kanálů vedou ke zhoršení svalové kontrakce. V současnosti jsou s DCM spojeny tři geny: *SCN5A*, *KCNQ1* a *ABCC9* (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

Gen *SCN5A* kóduje napětově řízený sodíkový kanál, který se u kardiomyocytů podílí na rychlé depolarizaci myokardu a má důležitou roli při udržování impulzního vedení (Rook *et al.*, 2012). Sodíkové kanály jsou zodpovědné za rychlou depolarizaci myokardu a jsou rozhodující pro udržení srdečního impulsu (Ruan *et al.*, 2009). Patogenní varianty genu *SCN5A* modifikují elektrickou excitabilitu sodíkového kanálu, což způsobuje nerovnováhu v proudění různých iontů zapojených do kontrakce kardiomyocytů. Tímto způsobem vyvolává remodelaci komor a tím rozvoj DCM. První patogenní varianta v genu *SCN5A* spojená s DCM byla zaznamenána v roce 2004 (McNair *et al.*, 2004) a dosud bylo identifikováno 12 patogenních variant (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

Dalším asociovaným genem je *KCNQ1* kódující draslíkový kanál, jehož identifikované patogenní varianty spojené s DCM vyvolávají ztrátu funkce potřebnou pro repolarizaci srdečního akčního potenciálu (Xiong *et al.*, 2015).

Transkripční faktory

Transkripční faktory, které aktivují transkripci souboru genů exprimovaných během srdečního vývoje a strukturální přestavby, jsou kódovány geny: *TBX5*, *TBX20* a *NKX2-5*. U pacientů s DCM způsobenou patogenními variantami těchto genů dochází ke snížení transkripční aktivity genů důležitých při kardiogenezi (Kirk *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015).

Sarkomerické proteiny

Sarkomera je kontraktilní jednotka svalového vlákna ohraničená dvěma Z-liniemi. Interakce mezi tenkými a tlustými vlákny ve spojení s titinem, tropomyosinem a jinými proteiny vyvolává svalovou kontrakci. Patogenní varianty genů pro sarkomerické proteiny jsou spojeny s poklesem kontraktilní funkce (Kamisago *et al.*, 2000). Dosud bylo s familiární DCM asociováno několik sarkomerických genů: *ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPMI* a *TTN* (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

Gen *MYBPC3* kóduje srdeční izoformu myosin vazebného proteinu C, který je spojen s myosinem v A-pruhu myofibrily. Dodnes bylo identifikováno 56 patogenních variant toho genu zapříčiňujících rozvoj DCM (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

MYH6 je gen kódující těžký řetězec α -myosinu a *MYH7* těžký řetězec β -myosinu. Myosin je protein vázající se na aktin a spolu s dalšími proteiny je zodpovědný za svalový stah. Myosin srdečního svalu je hexamer složený ze dvou podjednotek těžkého řetězce, dvou podjednotek lehkého řetězce a dvou regulačních podjednotek. Změny relativního množství tohoto proteinu korelují s rychlostí kontrakce srdečního svalu. V genu *MYH6* bylo identifikováno 11 patogenních variant a v genu *MYH7* celkem 99 patogenních variant spojených s DCM (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

Další důležitou součástí srdečního svalu je troponin T typu 2, který je kódován genem *TNNT2*. Tento protein reguluje svalovou kontrakci v reakci na změny koncentrace vápenatých iontů v buňce. K vyrovnání změn v influxu vápníku je senzitivita k vápníku regulována troponinovým komplexem, který se skládá z troponinu T, troponinu C (tnC) a troponinu I a zprostředkovává vazbu srdečního aktinu a proteinu MHC. Bylo prokázáno, že mutace v genu pro troponin T jsou asociovány se sníženou citlivostí k vápníku a s poruchou kontraktilní funkce (Du *et al.*, 2007). Celkem bylo nalezeno 38 patogenních variant tohoto genu asociovaných s DCM (Pérez-Serra *et al.*, 2016). S troponinovým komplexem je vázán α -tropomyosin kódovaný genem *TPMI*, který reguluje interakce aktinu a myosinu (Lakdawala *et al.*, 2010). *TPMI* byl asociován jak s dilatační, tak s hypertrofickou kardiomyopatií (HCM), přičemž dosud bylo identifikováno 20 patogenních variant (Zimmerman *et al.*, 2010).

Gen *TTN*, kódující titin, je nejčastěji mutovaným genem v DCM. Titin je nejdelším známým lidským proteinem. Je složen ze 34 350 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 3 816 030 Da. Titin se rozkládá od Z-disků přes pásmo I a A až po M-linie v sarkomeře a vytváří tak lešení, které interaguje jak s tenkými, tak tlustými vlákny a umožňuje správné fungování při sestavování sarkomery a při její aktivaci (Li *et al.*, 2016). Titin tak hraje zásadní roli během

kontrakce. Zajišťuje pasivní sílu a elasticitu pro zachování diastolické a systolické funkce. V současné době bylo s DCM spojeno až 37 patogenních variant titinového genu, z nichž většina (25 %) jsou zkrácené varianty titinu (*TTNtv*) (Herman *et al.*, 2012; Fatkin *et al.*, 2017). Penetrance známých mutací *TTNtv* je variabilní a může záviset na umístění mutace v dlouhé molekule titinu (Herman *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2015). Navíc je v případě *TTNtv* mutací onemocnění agresivnější často s nežádoucími účinky u mužů v mladších věkových kategoriích (Herman *et al.*, 2012). Bylo také zjištěno, že některé patogenní *TTNtv* mutace vedou k nedostatečné kontrakci kardiomyocytů. Tyto mutace produkují sice stabilní proteiny, ale nemohou správně interagovat se sarkomerní proteinovou sítí, což vede ke klinicky detekovatelné dysfunkci (Hinson *et al.*, 2015). Zajímavé je také zjištění, že peripartální kardiomyopatie (PPCM) sdílí genetickou etiologii s DCM. Tento fakt naznačuje, že těhotenství může působit jako modifikátor k odhalení fenotypu kardiomyopatie s *TTNtv* (Ware *et al.*, 2016).

Další významným genem, který souvisí se sarkomerními proteiny, je *RBM20*, kódující regulátor sestřihu mRNA. Snížená účinnost tohoto proteinu způsobuje změny exprese sarkomerních proteinů, mezi které patří například i titin, a tím modifikuje strukturu a funkci srdce (Guo *et al.*, 2013). Jeho regulační aktivita je spojena s cestou, která reguluje morfologii srdeční hmoty v DCM (Pérez-Serra *et al.*, 2016). Všechny patogenní varianty sarkomerních genů nějakým způsobem modulují srdeční kontrakci a tím funkci srdce jako takového.

Desmozomální proteiny

Desmozom je struktura myocytů zodpovědná za mechanické mezibuněčné spojení. V kombinaci s adheriny a mezerovými spoji (gap junction) propojují buňky myokardu a udržují mechanickou a elektrickou integritu srdce. Desmozomální geny jsou spojeny zejména s arytmogenní kardiomyopatií, ale byly nalezeny patogenní varianty 4 genů asociovaných s dilatační kardiomyopatií – *DSP*, *DSG2*, *DSC2* a *PKP2*. U nalezených patogenních variant genu *DSP*, kódujícího protein desmoplakin, byla pozorována zejména autosomálně recesivní dědičnost, ale v menší míře i dědičnost dominantní. V současné době je s DCM spojeno 12 patogenních variant tohoto genu (Pérez-Serra *et al.*, 2016). Dalším významným genem, který je však asociován zejména s arytmogenní kardiomyopatií, je *JUP*, kódující protein plakoglobin (Li *et al.*, 2011).

Jaderné proteiny

V jádře kardiomyocytů spolu interagují proteiny, které hrají roli jak v organizaci chromatinu, tak v transkripční aktivitě. V současné době jsou s DCM asociovány 3 jaderné

geny: *LMNA*, *EMD* a *TMPO*. Nicméně, pouze varianty genů *LMNA* a *TMPO* vykazují autosomálně dominantní dědičnost, zatímco varianty genu *EMD* X-vázanou dědičnost.

Gen *LMNA* kódující lamin A/C je druhým nejčastěji mutovaným genem v rámci DCM. *LMNA*, kódující intermediální filamenta, podporuje strukturu jaderné membrány a hraje důležitou roli ve struktuře chromatinu a expresi genů. Lamin A/C je lokalizován v jaderné lamině představující vláknitou strukturu, která je základem vnitřní jaderné membrány. Laminové filamenty jsou složeny ze tří polypeptidů typu lamin A, lamina B a lamina C (Lin *et al.*, 1993).

Patogenní varianty v genu *LMNA* představují 6 % všech případů DCM (Hershberger *et al.*, 2011), u 7,5 % se jedná o familiární typy a 11 % představuje sporadické formy DCM (Taylor *et al.*, 2003). Mutace v tomto genu jsou spojeny s vysokým výskytem náhlé smrti (Fatkin *et al.*, 1999; Becane *et al.*, 2000). Stejně jako u mutací titinu je srdeční fenotyp spojený s mutacemi *LMNA* vysoce variabilní. Předpokládá se, že dysfunkce laminu A/C má za následek buď dezorganizaci chromatinu vedoucí k poruchám transkripce genu a nesprávné translaci a distribuci proteinů, a/nebo akumulaci prelaminu A v jádře, která vede k toxicitě (Tesson *et al.*, 2014). V současné době bylo nalezeno 114 patogenních variant spojených s rozvojem DCM (Pérez-Serra *et al.*, 2016).

Obvykle má DCM způsobená patogenní variantou *LMNA* nejhorší prognózu a závažné kardiovaskulární problémy. Velmi často také pacienti s těmito variantami podstupují transplantaci srdce (Pérez-Serra *et al.*, 2016). Fenotyp těchto pacientů je navíc extrémně variabilní (Fatkin *et al.*, 2002) a penetrace je velmi vysoká (Pérez-Serra *et al.*, 2015).

Další geny asociované s DCM

Dalším genem spojeným s DCM je *CRYAB*, kódující protein α B-krystalin, který patří do rodiny malých heat shock proteinů a je silně exprimován v srdečním a kosterním svalstvu. α B-krystalin se chová jako molekulární chaperon, jehož funkcí je udržení proteinů ve velkých rozpustných agregátech, autokinázová aktivita a účast na intracelulární architektuře. S dilatační kardiomyopatií byly spojeny 3 patogenní varianty tohoto genu (Inagaki *et al.*, 2006; Pérez-Serra *et al.*, 2015)

Gen *LAMA4* kóduje α 4 podjednotku lamininu. Lamininy patří do rodiny extracelulárních matricových glykoproteinů, které jsou hlavní nekolagenní složkou bazálních membrán. Tyto proteiny jsou zapojeny do široké škály biologických procesů, včetně buněčné adheze, diferenciaci, migrace a signalizace. Dosud byly identifikovány 3 patogenní varianty (Pérez-Serra *et al.*, 2015).

Stejně jako u HCM je nesprávné hospodaření s Ca^{2+} spojeno s DCM. Správná svalová kontrakce spočívá v uvolňování vápenatých iontů ze sarkoplazmatického retikula prostřednictvím kanálu RYR2 a následně v opětovném příjmu Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula pomocí pumpy zvané SERCA. Mutace v genu *PLN*, kódujícím protein phospholamban, negativní regulátor proteinu SERCA, vedou k rozvoji letální DCM prostřednictvím nesprávného zpětného příjmu Ca^{2+} a rozvoji ventrikulární arytmie (Haghighi *et al.*, 2006).

S DCM bylo asociováno velké množství dalších genů kódujících například proteiny komplexu gamma-sekretázy, proteiny sarkoplazmatického retikula a další proteiny, které se vážou na sarkomeru.

Autozomálně recesivní dědičnost

V současné době bylo zaznamenáno málo případů DCM s autozomálně recesivní dědičností. Hlavním rysem ve většině případů je časný projev nemoci v novorozeneckém a dospívajícím věku (Mestroni *et al.*, 1999a; Mestroni *et al.*, 1999b; Seliem *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2004). Mezi geny DCM s autosomálně recesivní dědičností patří například *TNNI3*, *DES*, *DOLK*, *DSP* a *SDHA* (Perez-Serra *et al.*, 2015).

X-vázaná dědičnost

V rámci DCM byly popsány X-vázané patogenní varianty zahrnující progresivní degeneraci srdečního svalu. Tyto změny u pacientů způsobují dilataci s následnými funkčními srdečními komplikacemi. Často tyto patogenní varianty zapříčiňují smrt v mladém věku zejména u mužů a jedinou variantou mnohdy bývá transplantace srdce. V současné době byly identifikovány patogenní varianty v genech: *DMD*, *TAZ*, *EMD*, *CLIC2* a *LAMP2* (Perez-Serra *et al.*, 2015).

Dilatační kardiomyopatie a další patologie

Existuje velká skupina genů, která je asociována s různými patologiemi spojenými s typickými příznaky DCM. V těchto případech však není jasné, zda je mutace striktně zodpovědná za rozvoj tohoto onemocnění, nebo zda je srdeční porucha samotným důsledkem, nebo vedlejším poškozením jiné choroby. Příkladem je mutace v genu *ALMS1*, který je asociován s Alströmovým syndromem, ale také s rozvojem DCM popsáným jako komplikace tohoto syndromu (Bond *et al.*, 2005).

3. 2 Identifikace familiární dilatační kardiomyopatie

Doporučené nástroje pro identifikaci nebo potvrzení familiární dilatační kardiomyopatie (FDC) je stanovení rodinné anamnézy, kardiologické vyšetření příbuzných prvního stupně a molekulární genetické testování. Tento přístup identifikace je obzvláště důležitý, a to zejména proto, že osoba trpící DCM může být po mnoho let asymptomatická (Hershberger *et Morales*, 2007).

3. 2. 1 Rodinná anamnéza

Pro posouzení možnosti FDC by měla být poskytnuta rodinná anamnéza tří až čtyř generací zaměřená na kardiovaskulární onemocnění včetně srdečního selhání, DCM, transplantace srdce, nevysvětlitelné náhlé smrti, nevysvětlitelného onemocnění srdečního vedení a/nebo arytmie nebo nevysvětlitelné mrtvice nebo jiného tromboembolické onemocnění. Diagnostika FDC se provádí v případě, že minimálně dvěma blízkce příbuzným členům rodiny byla diagnostikována DCM. Do vyhodnocení se zahrnují všechny možné vzorce dědičnosti (Hershberger *et al.*, 2015).

Obě strany rodiny by měly být považovány za možné příčiny podílející se na rozvoji familiárního onemocnění. Bylo však ukázáno, že v některých případech, bez ohledu na zřejmý dědičný vzor v rodině, mohou předpoklady týkající se mateřské, nebo otcovské dědičnosti patogenních variant v genech způsobujících FDC být nespolehlivé a potenciálně zavádějící. Byla také zaznamenána i bilineární rodina, ve které obě linie, otce a matky, přispívají k patogenním variantám v genech *LMNA* a *PLN* (Liu *et al.*, 2015).

3. 2. 2 Kardiologické vyšetření příbuzných prvního stupně

Kardiologické vyšetření je doporučeno pro zjištění jakýkoliv srdečních abnormalit, které by mohly podporovat diagnostiku DCM. Vzhledem k tomu, že penetrance DCM je závislá na věku, měla by být v pravidelných intervalech prováděna opakovaná kardiovaskulární vyšetření příbuzných pacienta. Diagnostiku FDC významně podporuje tzv. kaskádová metoda, tzn. pokračování ve vyšetřeních příbuzných nově identifikovaných osob s idiopatickou dilatační kardiomyopatií (IDC), včetně anamnézy, fyzikálního vyšetření, echokardiografie (ECHO) a elektrokardiografie (EKG) (Hershberger *et al.*, 2009).

3. 2. 3 Molekulární genetické testování

Význam molekulárně-genetického vyšetření u pacientů s různými typy kardiomyopatií a jejich příbuzných v poslední době výrazně vzrůstá. V klinické praxi může diagnostika

genetickým testováním pomoci určit včasnou diagnózu, ale i prognózu, a může vést k preventivním opatřením, jak u ohrožených, tak asymptomatických rizikových pacientů, zejména k prevenci náhlého srdečního selhání. Umožňuje také identifikovat osoby, které nejsou nosiči patogenní genové varianty, a vyhnout se tak nákladům spojeným s klinickým sledováním. Některým jednotlivcům tak pomůže vyhnout se i psychickému stresu. U převládajícího autozomálně dominantního typu dědičnosti, kdy je riziko přenosu na potomky 50 %, se doporučuje vyšetření všech příbuzných probanda z první, druhé i třetí generace. U těchto rodinných příslušníků by mělo být také provedeno kardiologické vyšetření, které zahrnuje fyzikální vyšetření, ECHO, EKG, a v předepsaných případech i další pomocné metody. V případě odhalení variant odpovědných za dané onemocnění je potom možné i u příbuzných zahájit včasnou profylaktickou léčbu. I přesto, že se analyzuje velké množství genů spojených s kardiomyopatií, se u některých pacientů nepodaří najít patologickou variantu asociovanou s onemocněním. Je to dáno velkou genetickou heterogenitou a také možností výskytu mutace v genech, které nejsou do vyšetřovacího panelu zařazeny (Skutková *et al.*, 2016). V souladu se současnými klinickými pokyny je genetické testování doporučeno jako součást diagnózy v rodinných případech (Mestroni *et al.*, 1999a; Priori *et Blomström-Lundqvist*, 2015).

Možnost genetického testování může být nabídnuto jednotlivcům s IDC, FDC, PPCM nebo kardiomyopatií spojenou s těhotenstvím (PACM).

Vzácné patogenní genetické varianty jsou většinou hodnoceny a také prokázány zejména v případě rodinného výskytu, zatímco genetické varianty pouze s jediným výskytem v rodině nebývají ve velkých výzkumných studiích testovány a patogenitu je v těchto případech těžké prokázat. Některá data však naznačují podobnost frekvence patogenních variant mezi familiárními a jednotlivými případy (Hershberger *et al.*, 2010). I když diagnóza FDC zřídka začíná identifikací genetické mutace, je rozumné genetické testování zahrnout (Michels *et al.*, 1992; Burkett *et Hershberger*, 2005; Hershberger *et Siegfried*, 2011).

Před deseti lety byla detekce mutací dědičných kardiovaskulárních chorob prováděna z velké části technikami založenými na PCR, denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (high-performance liquid chromatography – HPLC) nebo pomocí vysokorozlišovací analýzou křivek tání (high resolution melting – HRM), a to jak v oblasti výzkumu, tak v klinické praxi (Tester *et al.*, 2006; Fackenthal *et al.*, 2013). Nicméně jejich citlivost rozpoznávání variant je v rozmezí od 95 % do 80 % a je vysoce závislá na adekvátní optimalizaci technik (Wittwer, 2009). Ačkoli byly tyto metody v minulých letech široce používány ke genetickému testování, zejména při stanovení dědičných kardiomyopatií

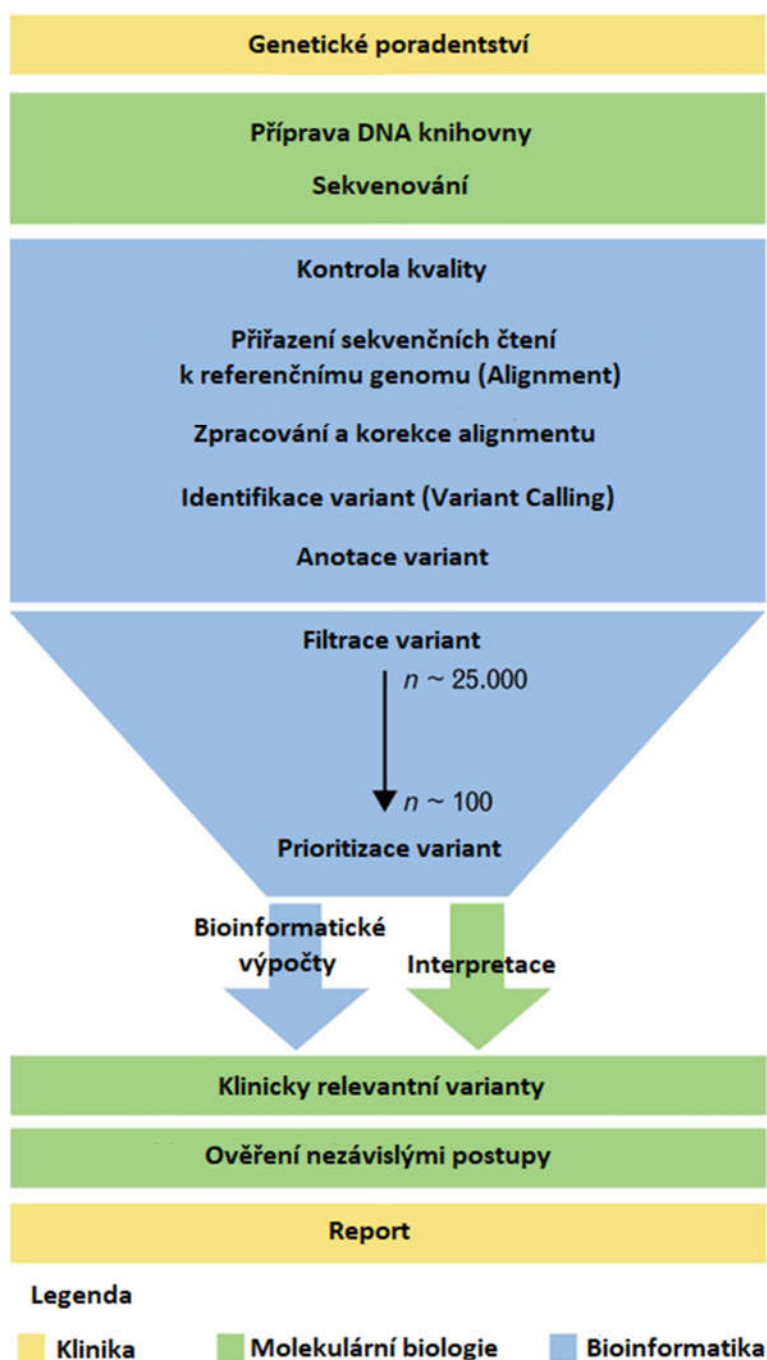
(Frisso *et al.*, 2009; Millat *et al.*, 2009; Millat *et al.*, 2010) dnes jsou z velké části nahrazovány. Přímé sekvenování DNA je dnes standartní metodou pro detekci genových mutací. Posledních 30 let bylo dominantním přístupem Sangerovo sekvenování (Bamshad *et al.*, 2011). Evropská společnost srdečního rytmu (European Heart Rhythm Association – EHRA) v roce 2011 označila Sangerovo sekvenování jako metodu s vysokou citlivostí, přesností a reprodukovatelností pro identifikaci mutací spojených s kardiomyopatií a kanálopatií (Ackerman *et al.*, 2011). Skenovací techniky, ani samotné sekvenování, však nejsou spolehlivé při identifikaci středních a velkých insercí nebo delecí. Proto je pro stanovení genové dávky nutné použít i dodatečné techniky, jako je kvantitativní PCR nebo metoda založená na ligaci dvou sond s následující amplifikací (multiplex ligation-dependent probe amplification – MLPA) (Schouten *et al.*, 2002; Chanavat *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2015). I přes svoje výhody je Sangerovo sekvenování pracné a časově náročné, zejména pro geneticky heterogenní onemocnění, jako jsou kardiomyopatie, a spolu s nákladovým omezením se jeho použití vylučuje pro rozsáhlá genomová sekvenování (Kircher *et al.*, 2010; Neveling *et al.*, 2013). V současné době tak sekvenování nové generace (next generation sequencing - NGS) započalo novou éru vysoce výkonné genomické analýzy.

3. 2. 4 Využití sekvenování nové generace v diagnostice DCM

Technika NGS způsobila revoluci klinického genetického screeningu, a to zejména proto, že dokáže analyzovat velký počet genů efektivním způsobem za nízké finanční náklady a v relativně krátké době (Sikkema-Raddatz *et al.*, 2013; Jamuar *et al.*, 2015). Ekonomická úspora je odvozena zejména z výpočtu rozdílu mezi náklady na genetické testy a náklady na zbytečné sledování zahrnující jak klinické, tak doplňkové testy, jako je EKG, ECHO a další (Ingles *et al.*, 2012). Především je dnes tento typ analýzy určen pro případy, kdy má odborný lékař jasné podezření na srdeční onemocnění a s tím spojené ohrožení příbuzných pacienta (Perez-Serra *et al.*, 2015). Techniky NGS se ukázaly jako přesné a účinné při detekci mutací jak ve výzkumu, tak v klinické praxi (D'Argenio *et al.*, 2014).

V současné době je známo množství genů asociovaných s DCM, což umožnilo vznik panelů několika desítek genů, které mohou být k diagnostice tohoto onemocnění použity. Zároveň tyto platformy umožnily zvýšit počet genů asociovaných s DCM (Harakalova *et al.*, 2015) a odhalit genetické překrytí mezi DCM a jinými kardiomyopatiemi, jako například hypertrofickou a arytmogenní kardiomyopatií (ACM) (Biswas *et al.*, 2014). S nástupem sekvenačních technologií bylo také zjištěno, že většina genetických variant je vzácná (Pan *et al.*, 2015).

Na **Obrázku č. 2** je zobrazen pracovní postup standartní genetické analýzy za použití NGS. Po přípravě DNA knihovny a samotném sekvenování se provádí bioinformatická analýza. Tato analýza dat zahrnuje mapování krátkých sekvenačních čtení na referenční genom (alignment) (Langmead *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009), zpracování a korekci alignmentu (Li *et al.*, 2009a; McKenna *et al.*, 2010), identifikaci variant (variant calling) (Li *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2009b; McKenna *et al.*, 2010) a genomickou a funkční anotaci variant (McLaren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Yandell *et al.*, 2011). Anotace je v podstatě sbírka všech dostupných informací k rozlišení klinicky významných variant od běžných nebo individuálních variant. Obvykle jsou exomovým sekvenováním u jediného pacienta nalezeny desítky tisíc genových variant a anotace představuje proces, který pomáhá genomovým analytikům a klinickým pracovníkům tato obrovská množství dat zpracovat pomocí genomových a funkčních informací shromážděných v biologických a/nebo klinických databázích a získat tak pouze ty nejdůležitější informace. Organizace American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) v roce 2015 zdůraznila nejdůležitější kritéria pro stanovení kauzality mutací vyvolávajících onemocnění, mezi která zahrnují populační frekvenci alely menší než 0,01 %, společný výskyt mutací s onemocněním, *in silico* skóre patogenity, rodinná kosegregace mutace a funkční testy (Richards *et al.*, 2015). Anotační nástroje dokáží identifikovat, které varianty jsou zaznamenány v databázích alelových frekvencí, které způsobují záměnu aminokyselin nebo generují stop kodon a které spadají do oblastí s variabilním počtem kopií DNA (MacDonald *et al.*, 2014). Anotační prostředky jsou také schopné předpovědět patogenitu variant pomocí bioinformačních nástrojů, jako jsou SIFT (Ng, 2003) a PolyPhen2 (Adzhubei *et al.*, 2010), a pomocí klinických databází, zahrnující například Human Gene Mutation Database (Stenson *et al.*, 2014) a ClinVar (Landrum *et al.*, 2014), s cílem zaměřit se na varianty, o kterých je známo, že jsou spojeny s určitým fenotypem nebo onemocněním. Existují také nástroje, které dokáží identifikovat v definovaném seznamu genů ty, které jsou s větší pravděpodobností spojeny s určitou nemocí, a to na základě literárních zdrojů, funkčních dat a jiných datových souborů. Mezi takové nástroje patří například eXtasy (Sifrim *et al.*, 2013) nebo ToppGene (Chen *et al.*, 2009). Podle těchto kritérií mohou být varianty klasifikovány jako patogenní, pravděpodobně patogenní, varianty s nejistým významem (variants of uncertain significance – VUS), benigní nebo pravděpodobně benigní.



Obrázek č. 2: Pracovní postup standardní genetické analýzy za použití NGS (Girolami *et al.*, 2018, upraveno)

Identifikace genetického základu dědičných forem DCM se ukázala jako náročná (Lakdawala *et al.*, 2012; McNally *et al.*, 2013). V souvislosti se sekvenování nové generace to představuje výzvu při rozlišování benigních variant DNA od těch, které jsou klinicky významné a skutečně přispívající k rozvoji onemocnění vzhledem k velkému počtu variant, které NGS poskytuje (Hershberger *et al.*, 2009). Samotná interpretace výsledků genetického testování je

v současné době velmi náročná, a to z důvodu poměrně vysoké frekvence vzácných benigních změn v populaci, a komplikuje ji i fakt, že u některých pacientů je identifikováno více než jedna vzácná varianta (Hershberger *et al.*, 2015).

I přesto, že pomocí technologie NGS bylo identifikováno v posledních letech několik nových genů, které pomáhají porozumět patofyziologickým cestám, zůstává DCM klasifikována jako komplexní onemocnění, zejména kvůli zvýšení počtu genů asociovaných s patologií a s různými typy dědičnosti. Pro odhalení nových příčin onemocnění by měly být provedeny další genotyp-fenotypové studie u velkých kohort rodin trpících DCM, které by tak přispěly k překlada genetických údajů do klinické praxe, což může pomoci lékařům zlepšit současné diagnostické nástroje a klinické terapie (Perez-Serra *et al.*, 2015).

4 ANALÝZA SEKVENAČNÍCH DAT

Nejdůležitější částí celého procesu sekvenování je transformace surových sekvenačních dat do smysluplných výsledků. Díky novým technikám, zejména NGS, generuje sekvenování velké objemy dat a požadovaná analýza se může zdát náročná. Dnes jsou již k dispozici analytické nástroje, které dokáží nahradit většinu manuální práce a analýzu tak výrazně usnadnit. Proces analýzy NGS dat zahrnuje primární, sekundární a terciární analýzu. Některé kroky jsou prováděny automaticky na sekvenačním přístroji, zatímco další kroky nastávají po dokončení sekvenování (Illumina, 2018).

Primární analýza zahrnuje generování hrubých dat a zhodnocení kvality. Nejprve dochází k převedení signálu na ACTG kód a poté k výpočtům ukazatele kvality. Většinou je výstupem soubor FASTQ s informacemi o kvalitě pro každou bázi, která je hodnocena tzv. Phred skóre, v zásadě jde o jistotu správného čtení. Tato analýza je prováděna samotným sekvenačním přístrojem a nelze do ní uživatelsky zasáhnout (Míka, 2018).

V sekundární analýze dochází k filtraci dat, kdy jsou odfiltrována zejména krátká čtení a data s nedostatečnou kvalitou. Vybraná čtení jsou následně tříděna podle barcodů. Jednotlivá čtení jsou seřazena na základě vzájemných přesahů a poté skládány pomocí BWA algoritmů na referenční sekvenci s tolerancí určitých rozdílů, podle kterých jsou určovány varianty, jejichž analýza je typicky cílem experimentu. Jedná se o vyhledávání odchylek mezi získanou a referenční sekvencí. Tyto rozdíly mohou být na úrovni jednotlivých nukleotidů, jako jsou substituce, kratší inserce a delece, nebo může jít o rozsáhlejší strukturní změny, například transverze a translokace. S určitou znalostí bioinformatiky lze určité parametry měnit a upravovat, ale velmi často je celý proces zcela automatizován. Výstupem jsou data ve formátu SAM/BAM s informací o pokrytí a hloubce čtení nebo soubory VCF formátu, které navíc obsahují informace o detekovaných variantách (Míka, 2018).

Posledním krokem je terciární analýza, která má za účel poskytnout takové výstupy, na jejichž základě je možné provádět vědecké závěry vyplývající z určitého experimentu. Tento krok celé analýzy je velmi variabilní a liší se v závislosti na dané studii. Je prováděna zejména hlubší analýza sekvencí a dochází k porovnávání výsledků více vzorků. Tento proces zpravidla nebývá automatizovaný, ale existuje velké množství softwarových programů specializovaných na určité experimenty. Vstupní data pro tyto aplikace jsou ve formátech BAM/SMA nebo VCF (Míka, 2018). Mezi tyto programy patří například VariantStudio (Illumina), Variant Interpreter (Illumina), Sequencher (Gene Codes Corporation), Alamut (Interactive Biosoftware) a VarAft (Aix Marseille University/INSERM).

4.1 Doporučený postup interpretace variant

S nástupem technologie NGS provádí klinické laboratoře stále více genetických testů zahrnujících jak jednotlivé geny a genové panely, tak celé exomy, genomy a transkriptomy. V důsledku toho je vyvíjen větší tlak na interpretaci nalezených genových variant. Mezi klinickými laboratořemi navíc často existují nesrovnalosti v klasifikaci variant (Amendola *et al.*, 2016; Pepin *et al.*, 2016). Tyto nesrovnalosti mohou vyplývat z metodologických rozdílů, zejména v přidělování rozdílné váhy určitým údajům. V reakci na tyto problémy zveřejnila v roce 2015 Americká akademie lékařské genetiky a genomiky (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG) a Asociace molekulární patologie (Association for Molecular Pathology – AMP) aktualizované normy a pokyny pro klinickou interpretaci sekvenčních variant s ohledem na lidské onemocnění na základě 28 kritérií, které umožňují klasifikovat varianty do pěti kategorií: patogenní, pravděpodobně patogenní, nejistého významu, pravděpodobně benigní a benigní. Výraz pravděpodobně ve spojení s patogenní nebo benigní variantou může znamenat vyšší než 90% jistotu, že je varianta buď patogenní nebo benigní (Richards *et al.*, 2015). V současné době navíc AMP vypracovává pokyny pro interpretaci variant somatických nádorových onemocnění s ohledem na dříve publikované postupy (van Allen *et al.*, 2014; Sukhai *et al.*, 2016).

Tento přístup klasifikace variant je možné použít v rámci všech genů asociovaných s onemocněním s Mendelovskou dědičností. Avšak je doporučeno, aby ti, kteří pracují ve skupinách zabývajících se konkrétními chorobami, nadále rozvíjeli cílenější postupy týkající se klasifikace variant v určitých genech, jelikož použitelnost a váha přiřazená k určitým kritériím se může lišit v závislosti na genu a nemoci. Tento postup není určen k interpretaci somatických variant, farmakogenomických variant nebo variant v genech spojených s multigenními komplexními poruchami (Richards *et al.*, 2015).

Nový přístup poskytl dvě sady kritérií, pro klasifikaci patogenních nebo pravděpodobně patogenních variant a druhá pro klasifikaci benigních nebo pravděpodobně benigních variant. U konkrétní varianty je vybráno kritérium založené na důkazech pozorovaných pro danou variantu a tato kritéria jsou pak kombinována podle bodovacích pravidel, na základě kterých je varianta klasifikována. Pro získání potřebných důkazů jsou nutné údaje jak ze současné analýzy a vlastních databází, tak z veřejně dostupných zdrojů. Za účelem určité flexibility v klasifikaci v závislosti na shromážděných důkazech může být váha určitých kritérií pozměněna. Pokud daná varianta nespĺňuje kritéria pro patogenní ani pro benigní varianty je označena jako nejistého významu (VUS).

Doporučený postup ACMG/AMP pro interpretaci variant je založen na dokládání důkazů a celý proces je rozdělen do dvou fází. Nejprve je zváženo několik kategorií údajů zahrnující: 1. frekvence varianty v postižené a neovlivněné populaci, 2. výpočetní predikční nástroje, 3. *in vitro* nebo *in vivo* funkční studie, zahrnující přímé testy na vzorcích pacientů, studie na zvířecích modelech nebo buněčných liniích, 4. analýza společné segregace varianty s onemocněním a 5. specifické informace o nemoci nebo samotném genu. Následně je každému údaji udělena tzv. úroveň důkazu. Rozlišují se tzv. velmi silná, silná, střední nebo podpůrná úroveň. Tyto úrovně důkazů jsou pak kombinovány za účelem klasifikace varianty. Například, pokud se jedná o tzv. nulovou variantu (alelu), která zapříčiňuje ztrátu funkce genu, je označena jako velmi silný důkaz a s přidáním dvou případů podpůrných důkazů může být varianta klasifikována jako patogenní. V rámci kritérií pro klasifikaci benigních variant existuje samostatná úroveň, kdy v případě alelové frekvence vyšší než 5 % v některé z databází je varianta automaticky klasifikována jako benigní. Organizace kritérií podle typu a úrovně důkazu je uvedena v **Příloze č.1**. Tento přístup založený na důkazech a nezaujatém přidělování úrovně důkazů se tak pokouší nahradit subjektivní odhad patogenity a může se zdát poněkud přísný, čímž se částečně zabrání mylnému zařazení některých variant mezi patogenní (Richards *et al.*, 2015).

Spoléhání se na vlastní nepublikované údaje při interpretaci variant představuje další zdroj nesrovnalostí mezi laboratořemi. Když mají laboratoře různé informace o variantách, interpretují varianty jinak. Konzistentní klasifikace variant tedy vyžaduje dostupnost všech relevantních dat specifických pro varianty. V současné době je bohužel příliš velké množství dat v soukromých interních databázích, zejména kvůli nedostatku zájmu nebo motivace o zveřejnění (Antonarakis *et Beckmann*, 2006; Bean *et Hegde.*, 2016). Jednotlivé laboratoře by tak měly být motivovány ke zpřístupnění svých údajů do veřejných úložišť, například ClinVar (Landrum *et al.*, 2016) nebo Universal Mutation Database (UMD) (Bérout *et al.*, 2005). Alternativním způsobem je shromažďování klasifikací variant přímo od pacientů nebo lékařů prostřednictvím kampaně "Free the Data" (www.free-the-data.org) nebo projektu Sharing Clinical Reports (www.sharingclinicalreports.org). Na druhou stranu, i když tyto zdroje mohou podporovat sdílení informací a transparentnost, existence několika nezávislých úložišť vytváří další problémy. Například některé případy mohou být v těchto úložištích duplikovány, což vede k nadhodnocení patogenity pro některé varianty. V ideálním případě by bylo řešením jedno společné globální úložiště pro shromažďování všech těchto údajů (Bean *et Hegde*, 2016).

4. 1. 1 Databáze

V současné době existuje velké množství databází obsahujících rostoucí počet genových variant, které jsou neustále objevovány v lidském genomu. Při interpretaci a klasifikaci varianty mohou klinické laboratoře najít cenné informace v databázích i v publikované literatuře.

Databáze sekvencí mohou být také použity pro identifikaci vhodných referenčních sekvencí. Pro získávání frekvencí genových variant ve velkých populacích jsou užitečné populační databáze. O populačních databázích však nelze předpokládat, že zahrnují pouze zdravé jedince, a je známo, že obsahují i patogenní varianty. Navíc neobsahují rozsáhlé informace týkající se funkčního účinku těchto variant nebo jakýchkoli možných souvisejících fenotypů. Databáze by tedy měly být používány s opatrností (Richards *et al.*, 2015).

Databáze genů asociovaných s onemocněním obsahují primárně genové varianty nalezené u pacientů s určitými chorobami a hodnocení patogenity variant. Databáze těchto onemocnění a specifických genů bohužel často obsahují nesprávně klasifikované varianty včetně nesprávných tvrzení publikovaných v odborné literatuře, a to zejména proto, že mnoho databází nevykonává primární přezkoumání důkazů. Z toho důvodu by měl být brán ohled například na to, jak často je databáze aktualizována, jaké metody byly v experimentech použity, do jaké míry jsou uvedené údaje analyticky přesné a na nezávislost uvedeného zdroje. Při zveřejňování nalezených variant a jejich klasifikace by měly laboratoře uvádět také klinické informace o pacientech, aby mohla být lépe pochopena korelace mezi fenotypem a genotypem (Richards *et al.*, 2015). Příklady popisovaných databází jsou uvedeny v **Tabulce č. 2**.

Tabulka č. 2: Příklady populačních a sekvenčních databází, specifických databází genů asociovaných s onemocněním a specifické kardiologické databáze (Richards *et al.*, 2015, upraveno)

Typ databáze	Název	Popis
Populační databáze	Exome Aggregation Consortium	Databáze variant nalezených při sekvenování exomu 61 486 nepříbuzných jedinců sekvenovaných jako součást populačních genetických studií a studií zaměřených na různá onemocnění.
	Exome Variant Server	Databáze variant nalezených v rámci sekvenování exomu několika velkých kohort jedinců evropského i afroamerického původu. Zahrnuje údaje o pokrytí s cílem informovat o absenci změn.
	1000 Genomes	Databáze variant, které byly nalezeny při genomovém a cíleném sekvenování 26 populací. Poskytuje více rozmanitosti ve srovnání s EVS, ale také obsahuje méně kvalitní data a některé kohorty obsahují příbuzné jedince.
	dbSNP	Databáze krátkých genetických variant (50 bp nebo méně) předložených z mnoha zdrojů. Může obsahovat nedostatek podrobností o původní studii a může obsahovat patogenní varianty.
Databáze genů asociovaných s onemocněním	ClinVar	Databáze zahrnující vztahy mezi lidskými genovými variantami a fenotypy, s podporujícími důkazy.
	OMIM	Databáze lidských genů a fenotypů, která také obsahuje vzorové genetické varianty spojené s onemocněním.
	Human Gene Mutation Database	Databáze anotací variant publikovaných v literatuře. Pro zpřístupnění velké části obsahu vyžaduje předplatné založené na poplatcích.
Databáze sekvencí	NCBI Genome	Zdroj úplných referenčních sekvencí lidského genomu.
	RefSeqGene	Lékařsky relevantní zdroj pro genovou referenční sekvenci.
	MitoMap	Zdroj referenční sekvence pro lidskou mitochondriální DNA.
	LOVD	Genově zaměřená databáze DNA variant
Kardiologické databáze	Atlas of Cardiac Genetic Variation	Databáze genetických variant u hypertrofické, dilatační a arytmogenní kardiomyopatie.
	Titin Variants in Dilated Cardiomyopathy	Databáze variant titinového genu, jeho transkriptů a struktur exonů u dilatační kardiomyopatie.
	ARVD/C Genetic Variants Database	Obsahuje informace z klinického výzkumu a další údaje o variantách genů způsobujících arytmogenní kardiomyopatii.

4. 1. 2 Výpočetní (*in silico*) prediktivní nástroje

Při interpretaci sekvenčních variant mohou pomoci také různé *in silico* nástroje, které jsou veřejně nebo komerčně dostupné. Používané algoritmy se mohou v každém nástroji lišit, ale zahrnují zejména stanovení účinků sekvenční varianty na úrovni nukleotidů a aminokyselin včetně stanovení účinku varianty na primární a alternativní genové transkripty a také potenciální vliv varianty na vznikající protein. Existují dvě hlavní kategorie takových nástrojů, jedna skupina zahrnuje předpovídání, zda změna poškozuje výslednou proteinovou funkci nebo strukturu a druhá skupina, které předpovídají, zda má daná změna účinek na sestřih (Richards *et al.*, 2015). Novější nástroje se navíc začínají zabývat i nekódujícími sekvencemi (Kircher *et al.*, 2014).

Účinek genové změny závisí na kritériích, jako je evoluční zachování aminokyseliny nebo nukleotidu, umístění a kontextu v rámci proteinové sekvence a biochemický důsledek substituce aminokyselin. Mezi často používané *in silico* nástroje patří PolyPhen2 (Adzhubei *et al.*, 2010), SIFT (Kumar *et al.*, 2009), MutationTaster (Schwarz *et al.*, 2010), Provean (Choi *et al.*, 2012) a Mutation Assessor (Reva *et al.*, 2011). Různé softwarové programy používají sice odlišné algoritmy, ale jsou založeny na stejném principu, proto je kombinace těchto predikcí z různých *in silico* nástrojů považována za jeden důkaz v interpretaci na rozdíl od nezávislých samostatných důkazů. Pro interpretaci sekvenční varianty by měly být kombinovány odlišné programy, ale nedoporučuje se používat tyto predikce jako jediný zdroj důkazů pro klinické tvrzení. (Richards *et al.*, 2015). Příkladem takové kombinace různých prediktivních nástrojů je online dostupný systém pro predikci patogenity mutace nazvaný UMD-Predictor (Salgado *et al.*, 2016). Tento nástroj spojuje údaje o lokalizaci varianty v rámci proteinu, konzervativnost, biochemické vlastnosti, možný dopad změny na mRNA a také frekvenci varianty v globální populaci. Tento systém, který je součástí i anotačního softwaru VarAFT, tak kombinuje různé algoritmy výše uvedených prediktivních nástrojů doplněné dalšími údaji pro předpověď patogenity variant.

4. 1. 3 Bioinformatické nástroje pro interpretaci variant

Manuální uplatnění standardů a pokynů publikovaných ACMG/AMP je však zdlouhavé a náchylné k lidské chybě. Tento problém mohou řešit webové nástroje a softwarové systémy (Patel *et al.*, 2017). Pro mnohé klinické laboratoře je hodnocení významu variant podle pravidel ACMG/AMP do standardizovaného pracovního postupu s dostupnými nástroji informatiky obtížné a shromažďování informací o každém kritériu je poměrně komplikované (Li a Wang, 2017).

Americký Národní institut zdraví (National Institutes of Health – NIH) vytvořil v roce 2015 ClinGen jako centrální zdroj, který definuje klinický význam genů a variant pro použití v medicíně i výzkumu. Tento konfigurovatelný webový systém umožňuje uživatelům zadat příslušné značení důkazů na základě pokynů ACMG/AMP pro konkrétní alelu s odkazy na podporující data a generovat hodnocení patogenity variant. Prostřednictvím automatizace a komplexní dokumentace důkazů systém usnadňuje přesnější uplatňování pokynů ACMG/AMP a zlepšuje tak standardizaci v klasifikaci variant. Navíc umožňuje přizpůsobení pro specifické geny a nemoci (Patel *et al.*, 2017).

Za účelem odstranění problémů, které dosavadní postupy interpretace variant představovaly, v roce 2017 Li a Wang prezentovali nástroj pro interpretaci genových variant InterVar (Klinická interpretace genetických variant) a jeho webovou verzi wIntervar, které jsou založeny na přístupu ACMG/AMP publikovaného v roce 2015.

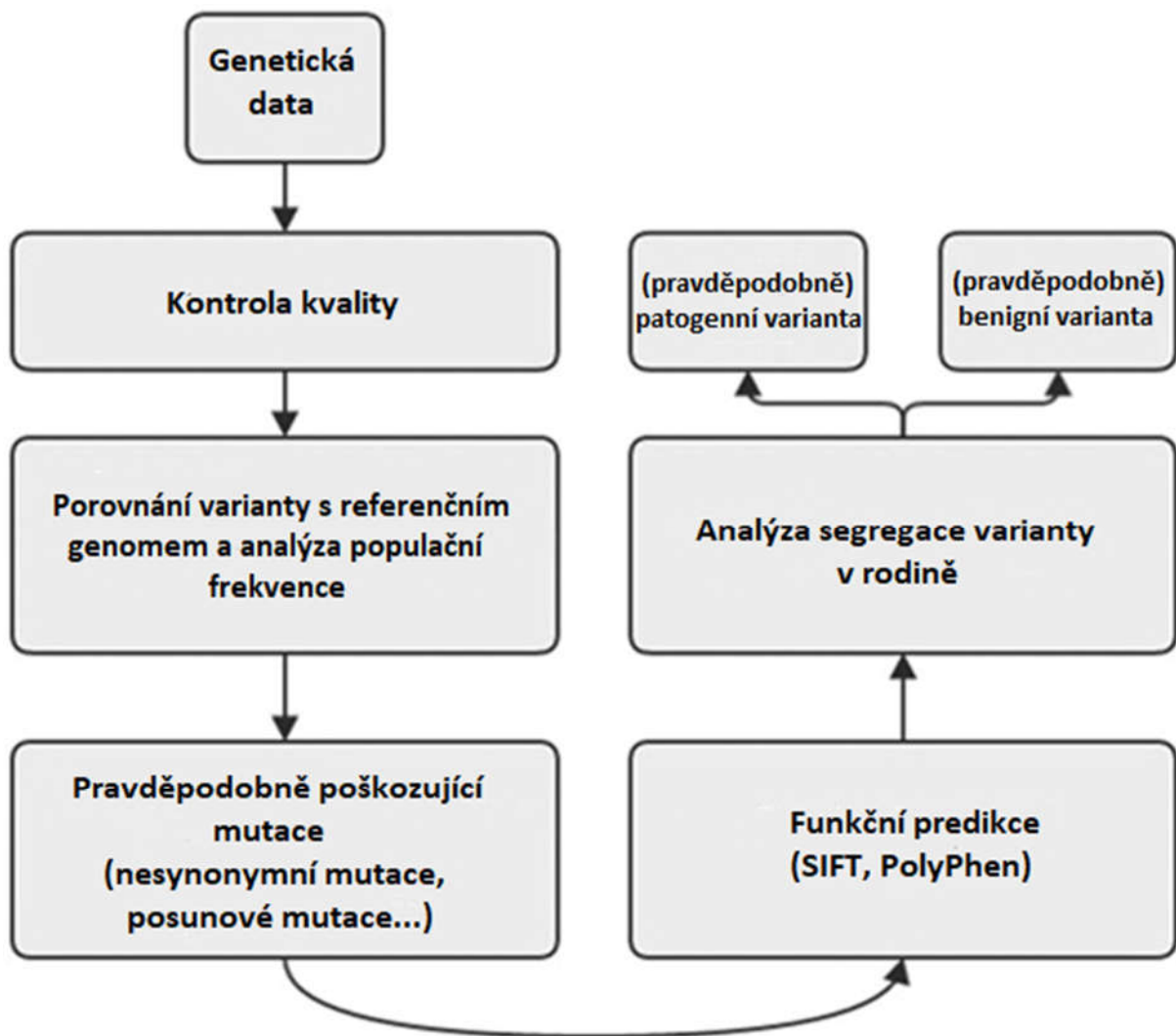
4.2 Interpretace genových variant u dilatační kardiomyopatie

Interpretace vzácných genových variant, ať již v klinické diagnostice nebo výzkumném prostředí, nedokázala udržet krok s rychlým rozvojem generování dat pomocí technologií NGS. Primárním úkolem v současné době klinických lékařů je interpretace identifikovaných genetických variant, ale také jejich překlad do klinické praxe (de Gonzalo-Calvo *et al.*, 2017).

Jak již bylo uvedeno výše obecně se interpretace těchto variant opírá o frekvenci v populaci a předpokládaný účinek varianty na funkci proteinu. Možná patogenita neznámých variant může být testována za pomoci nástrojů výpočetní biologie, zejména nástrojů *in silico*.

Pro posouzení pravděpodobné patogenity nalezených variant je vedle optimalizace získaných dat potřeba několik kroků (viz **Obrázek č. 3**). Nejprve je možné určit frekvenci určité varianty v obecné populaci, aby mohla být odlišena vzácnější varianta od běžně se vyskytujících variant. Základní myšlenkou totiž je, že běžné varianty nemohou být příčinou vzácných onemocnění (Andreasen *et al.*, 2013). Je nepravděpodobné, že frekvence varianty vyšší než 0,1 % způsobí vzácné onemocnění a tyto varianty tak budou nejspíše označeny jako benigní nebo pravděpodobně benigní. Znalost populační prevalence onemocnění navíc poskytuje silný prostředek k vyloučení některých kandidátních variant (Shah *et al.*, 2016). Druhým krokem je posouzení efektu mutace, tzn., že jsou brány v potaz především nesynonymní mutace, které mohou způsobit záměnu aminokyseliny, posunové mutace (frameshift), mutace v místě sestřihu a mutace způsobující vznik nebo zánik terminačního kodonu. Dalším krokem je hodnocení škodlivosti varianty pomocí softwarových programů, jako jsou SIFT a PolyPhen, které předpovídají možný dopad mutace na strukturu a funkci proteinu (Adzhubei *et al.*, 2010).

Následně je pro určení relativního významu zásadní společná segregace varianty u členů rodiny (McNally *et Puckelwartz*, 2015). V zásadě jde o genetický screening postižených členů rodiny za účelem zjištění, zda se mutace segreguje společně s onemocněním. Čím silněji je mutace segregována s onemocněním, tím pravděpodobněji se jedná o kauzální variantu. Nakonec bývá zařazeno funkční sledování, kdy je pozorován biologický účinek například na zvířecích modelech, ale vzhledem k časové a finanční náročnosti nejsou funkční testy bohužel k dispozici pro diagnostiku, a proto jsou využívány jen příležitostně v genetickém výzkumu (Kummeling *et al.*, 2015).



Obrázek č. 3: Postup interpretace genových variant (Kummeling *et al.*, 2015, upraveno)

Tyto kroky do značné míry usnadňují výběr podezřelých variant, ale i přesto se setkáváme s velkým počtem variant neznámého významu, což brání efektivní diagnostice. Na základě očekávání z genetického screeningu by mělo být pečlivě zváženo kolik genů bude

analyzováno. V případě screeningu menšího počtu cílových genů bude pravděpodobně detekováno méně variant, které budou snadněji interpretovány, ale nebude možné nalézt variantu v genu, který nebyl do analýzy zařazen. Na druhou stranu při volbě jednoduššího přístupu se sekvenováním celého exomu získáme velké množství variant, ale s nízkou specifičností.

Obecně platí, že interpretace genetické variability bez přístupu ke klinickým údajům je náročná. V klinické praxi mohou genetické testy produkovat varianty neznámého významu a zpracování těchto genetických informací v kontextu rodin a jednotlivců vyžaduje klinickou korelaci. Pro tzv. kardiovaskulární genetiku vyžaduje korelace genotypu a fenotypu podrobnou znalost jak genetiky, tak kardiovaskulárního testování. Proto je nutný úzký pracovní vztah mezi kardiologem a genetikem, zejména proto, aby bylo možné lépe interpretovat varianty v kontextu klinických nálezů. V populačních výzkumných studiích může být rozumné nezahrnovat do výsledků varianty neznámého významu, ale v klinické praxi vyžadují varianty s neznámým významem další testování. Analýza a hodnocení dalších členů rodiny za použití jak genetického screeningu, tak pečlivého klinického testování může pomoci vytvořit vazbu mezi genotypem a fenotypem (McNally *et Puckelwartz*, 2015).

Prohloubení znalostí o genetických mutacích by mělo informovat lékaře o rychlosti progresu a komplikacích onemocnění a bylo by tak možné některým možným obtížím předcházet. Například mutace v genu *LMNA* jsou spojeny s vysokým rizikem arytmií. Genetická klasifikace kardiomyopatií může také vést k účinnější léčbě, která je v současné době zaměřena na genovou terapii umožňující redukci nebo opravu mutantních alel. Schopnost generovat specificky indukované pluripotentní kmenové buňky, které jsou specifické pro jednotlivé pacienty, nabízí připravený model, ve kterém se testují terapie pro molekulární korekci. Novou éru v personalizované medicíně představuje také editace genu pomocí CRISPR/Cas9, díky které je možné provést genově specifické opravy s velkou přesností (McNally *et Puckelwartz*, 2015).

Kromě výše uvedených interpretačních nástrojů, InterVar a ClinGen, lze k anotaci a interpretaci nalezených variant použít již zmíněný software VarAFT, který umožňuje na základě porovnávání vzorků také kvalitní analýzu dědičných chorob a rakoviny. K hodnocení patogenity variant využívá řady databází a nástrojů UMD-Predictor a Human Splicing Finder, který umožňuje studium intronových a exonových mutací vedoucích k defektům v sestřihu pre-mRNA. Specializovaným nástrojem je potom CardioClassifier (Whiffin *et al.* 2017). Jedná se o automatizovaný a interaktivní webový nástroj, který podporuje interpretaci genetických variant v genech spojených s dědičnými srdečními chorobami na základě pokynů ACMG/AMP.

V současné době je možno provádět analýzu 40 genů s konečnou vazbou na 11 srdečních chorob, ale do budoucna je plánovaná expanze na všech 174 genů zahrnutých v sekvenčním panelu TruSight Cardio (Pua *et al.* 2016).

5 FUNKČNÍ TESTY SPOJENÉ S MOLEKULÁRNÍMI MECHANISMY KARDIOMYOPATIÍ

Moderní genomika prohloubila naše znalosti o základních příčinách různých typů kardiomyopatií, a to zejména proto, že byly objeveny patologicky významné genetické mutace asociované s tímto onemocněním. Rozvoj genetického testování také usnadnil identifikaci dědičných rizikových faktorů projevujících se mnohdy až v pokročilých stádiích onemocnění, což umožnilo identifikovat osoby s velkým rizikem vzniku srdečního selhání.

Daná patologie může být řízena signalizačními kaskádami. Objasnění molekulárních mechanismů proto závisí na *in vitro* a *in vivo* experimentech za použití metod zvýšení exprese či umlčování genů (Tyska *et al.*, 2000). Jako doplňující metody potom mohou sloužit translační přístupy využívající modely hlodavců, zejména transgenní a knock-out linie myši, které se používají ke zkoumání funkce specifických genů *in vivo*.

Různé *in vitro* modely pomohly definovat buněčný fenotyp a prověřit mechanismy onemocnění (Sommariva *et al.*, 2015). Experimenty *in vitro* a *in vivo* analyzující mutace identifikované u pacientů poskytly neocenitelný pohled na molekulární mechanismy těchto kardiomyopatií. Některé výsledky z experimentů *in vivo* bohužel nelze interpretovat do klinicky relevantních terapií. Na druhou stranu schopnost analyzovat mutace odvozené z genetického screeningu ve zjednodušeném a izolovaném systému je neocenitelná a umožňuje lepší pochopení důsledků těchto mutací s velkou přesností. Spojení výsledků z funkčních testů zabývajících se patogenitou určitých genových variant a s možností určité klinické terapie může skutečně ovlivnit život pacientů trpících kardiomyopatií (Dadson *et al.*, 2017). V současné době existují dostupné terapie umožňující zastavit progresi onemocnění u mnoha pacientů a jejich příbuzných, proto se setkáváme s naléhavou potřebou funkčních testů zejména srdečních sarkomerických proteinů, které mohou pomoci nalézt nové kauzální varianty (Pan *et al.*, 2015). Určení kauzality chorob způsobených konkrétními variantami se stává stále důležitější. Nemoci spojené s poškozením sarkomery v srdci představují v tomto ohledu zvláštní výzvu, a to kvůli složitosti testování účinků genetických variant v lidských srdečních kontraktilních proteinech.

K ověření biologického účinku neznámé genetické varianty se obecně doporučuje spolehlivá funkční analýza. Kardiomyopatie však představují zvláštní výzvu ve stanovení kauzality předpokládaných variant způsobujících onemocnění, a to kvůli složitosti testu účinku genetických variant v lidských srdečních strukturních proteinech. K ověření funkce mutantních strukturních proteinů bylo použito množství *in vitro* a *in vivo* technik (Pilichou *et al.*, 2011; Nonaka *et Morimoto*, 2014; Martins *et al.*, 2015; Frisso *et al.*, 2016). Nejčastěji jsou

pro sledování relevantních patologických změn ve vhodném modelu využívány indukované pluripotentní kmenové buňky k vytvoření experimentální tkáně, která pochází přímo od pacienta s analyzovanou genovou variantou (Malan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Tyto techniky jsou však náročné a pracné a vyžadují vysoce kvalifikovaný personál, nejsou proto snadno použitelné pro rozsáhlé přístupy a realizovatelné v diagnostickém prostředí (Girolami *et al.*, 2018).

Principem *in vitro* funkčních testů je vytvoření rekombinantní DNA a její vložení pomocí určitého vektoru do hostitelské buňky. Obecně je z požadovaného organismu získána DNA a její fragmenty jsou kombinovány s vektorovou DNA a vytvořena rekombinantní DNA, která je poté zavedena do hostitelského organismu. V tomto případě se potom jedná o transgenní nebo geneticky modifikované mikroorganismy (GMO) (Brown, 2016). Důležitým krokem je výběr správného vektoru a hostitelské buňky. Ve většině případů je jako vektor použita plazmidová DNA a hostitelem bývá kmen bakterie *E. coli*, který umožní namnožení analyzované DNA. V závislosti na povaze experimentu poté nejčastěji dochází k subklonování do specializovaného vektoru. V případě analýzy molekulárních mechanismů kardiomyopatií je většinou sledovaný mutantní gen získán přímo z buněk periferní krve pacienta a klonová do vhodného vektoru, nejčastěji plasmidu. Nebo je tento gen získán komerčně jako wild type, zaligován do vhodného vektoru a pomocí technik místně cílené mutagenese je do genu zavedena požadovaná mutace. V současné době existuje řada komerčně dostupných sad pro místně cílenou mutagenesi, kdy je mutace do plasmidu zavedena pomocí inverzní PCR za použití specificky navržených primerů. Pro tyto metody mohou být primery navrženy buď s překryvem, kdy je prováděna tzv. overlapping PCR (například QuikChange® firmy Agilent), nebo primery v orientaci back-to-back (například Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, New England BioLabs) (New England BioLabs, online). Dalším způsobem cílené mutagenese je moderní editace genomu pomocí CRISPR/Cas9. Enzymatický komplex CRISPR/Cas9 se naváže na vybrané místo v DNA, vystříhne část sekvence a nahradí ji za jinou. Tento komplex zahrnuje část řetězce RNA, kterou lze cíleně vyhledat studovanou sekvenci a pomocí nukleázy Cas je možné řetězec DNA štěpit a na určené místo v genomu vnést úsek cizí DNA. Tento systém editace genomu je úspěšně používán v mnoha buněčných liniích a organismech, včetně člověka (Pyzocha *et al.*, 2014).

K pozorování funkce určitého proteinu, kódovaného genem se sledovanou variantou, je v závislosti na molekulárních mechanismech velmi důležité vybrat správný experimentální model.

5.1 Experimentální *in vitro* modely

Dosud zkoumané *in vitro* modely byly odvozeny z buněk srdečního kontraktálního kompartmentu, progenitorových buněk, stromálního kompartmentu a nekardiálních buněk. Každý model má své podstatné výhody a nevýhody v závislosti na jeho původu, buněčném typu a vývoji buněk (zda vykazují fenotyp plodu, nebo buňky dospělého jedince). Výběr správného modelu je důležitou součástí celého experimentu (Sommariva *et al.*, 2015).

5.1.1 Kardiomyocyty

Interkalární disky jsou intercelulární specializované oblasti na konci kardiomyocytů, které umožňují synchronní kontrakci srdečního svalu. Tyto disky jsou složeny z různých druhů spojení, které jsou nezbytné pro mechanickou kontinuitu myokardu, elektrickou vazbu a aktivitu mezi sousedními buňkami, a tudíž pro udržení správné funkce srdce. A právě z důvodu důležitosti funkce interkalární disků byly kardiomyocyty navrženy jako klíčový buněčný model. Lidské kardiomyocyty jsou však obtížně získávány a udržovány v kultuře, proto bývají použity různé náhrady těchto buněk (Sommariva *et al.*, 2015).

Buněčná linie HL-1

Buněčná linie HL-1 byla získána imortalizací AT-1 atriálních kardiomyocytů izolovaných z transgenní myši (Field, 1988). Tato linie byla prvním buněčným modelem, který byl použit jako náhrada za kardiomyocyty. HL-1 buňky se kontrahují dokonce i po sérii pasážování a zachovávají si diferencované srdeční morfologické, biochemické a elektrofyziologické vlastnosti (Claycomb *et al.*, 1998).

Myší původ těchto buněk však představuje limitaci pro modelování lidských onemocnění. Navíc se tyto buňky jen zřídka používají pro elektrofyziologické studie, zejména proto, že jsou odvozeny od atriálních buněk a vykazují ultrastrukturní organizaci pro ně typickou, ale nedopovídají ventrikulárním kardiomyocytům, které mají specifické paralelní uspořádání myofibril (Sommariva *et al.*, 2015).

Kardiomyocyty ze zvířecích modelů

Ve výzkumu kardiomyopatií jsou používány jak neonatální kardiomyocyty (pro zajištění delšího přežívání v kultuře), tak kardiomyocyty z dospělých jedinců (pro lepší prezentaci dospělého věku). Jsou využívány dva přístupy, použití kardiomyocytů z transgenních živočichů, které nesou mutaci spojenou s onemocněním, a transfekce wild type živočišných kardiomyocytů expresními vektory obsahujícími mutace spojené s chorobou.

Bohužel, i když kardiomyocyty odvozené od živočichů představují významný a dostupný zdroj funkčních buněk, jsou tyto modely výrazně omezeny nelidským původem. Výsledky získané pomocí těchto přístupů je proto třeba potvrdit v modelech odvozených od lidských buněk (Sommariva *et al.*, 2015).

Kardiomyocyty z indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC)

Přestože přínos zvířecích modelů *in vivo* byl k pochopení dědičných kardiomyopatií enormní, drobní živočichové mají podstatně odlišné vnitřní vlastnosti srdce než člověk, například rychlejší srdeční rytmus (Nonaka *et Morimoto*, 2014).

Intaktní kardiomyocyty od zdravého člověka, a dokonce i od pacienta s kardiomyopatií je velmi obtížné získat. Technologie indukovaných pluripotentních kmenových buněk nabízí jedinečnou příležitost k vytváření modelů specifických pro onemocnění přímo od pacientů s monogenním onemocněním za účelem vyšetření základních mechanismů a provádění screeningu léků v lidských kardiomyocytech, i když pouze *in vitro* (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (hiPSC) tedy představují nástroj k získání kardiomyocytů odvozených od člověka (Brandão *et al.*, 2017) a překonávají tak mezidruhové problémy.

Jedním z nedostatků kardiomyocytů odvozených z hiPSC je jejich fenotyp podobný plodu (Ma *et al.*, 2013), který zcela nereprezentuje dospělý kardiomyocyt. Kim *et al.* (2013) částečně překonal tento problém vyvoláním metabolismu podobného dospělému v kardiomyocytech odvozených od hiPSC stimulací oxidace mastných kyselin.

I přesto, že jsou kardiomyocyty odlišné od lidských iPSC (Zhang *et al.*, 2009; Zwi *et al.*, 2009), ukázalo se, že kardiomyocyty odvozené od hiPSC jsou užitečný experimentální model pro objasnění molekulárních a buněčných patogenních mechanismů, které jsou základem dědičné kardiomyopatie, a pro identifikaci nových terapií pro toto onemocnění (Lan *et al.*, 2013). hiPSC jsou vhodné pro vysokorychlostní screening a jejich výhodou je také potenciální neomezená dostupnost. Navíc tyto buňky obsahují patientské genomy, což představuje jedinečný nástroj pro individuální přístupy k léčbě (Sommariva *et al.*, 2015).

5. 1. 2 Progenitorové buňky

Progenitorové buňky jsou používány jako modely zejména kvůli jejich vyššímu adipogennímu potenciálu ve srovnání s terminálně diferencovanými buňkami. V určitých

případech jsou používány c-kit⁺/Sca1⁺ myší buňky, epikardiální buňky nebo fibro-adipocytární progenitory (Sommariva *et al.*, 2017).

5. 1. 3 Nekardiální buňky

Buňky bukalní sliznice

Vzhledem k omezené dostupnosti vzorků lidského myokardu, Asimaki *et al.* (2016) navrhli jako *in vitro* model buňky bukalní sliznice (BMC). Tyto buňky se snadno získávají z dutiny ústní a patří mezi epiteliální buňky, které obsahují mezerové spoje (gap junctions) a desmozomy, stejně jako srdeční buňky. Takže i přes jejich nekardiální původ mohou být tyto buňky dalším užitečným nástrojem, který lze snadno získat z velkého počtu pacientů s minimálními náklady za účelem vyšetření mechanismů onemocnění a screeningu léků.

Dalším zdrojem buněk pro modelování mechanismů kardiomyopatie jsou primární keratinocyty, které exprimují vysoké hladiny všech isoform desmozomálních proteinů (Gerull, 2014). V roce 2015 byly jako nový buněčný model navrženy také nekontraktilní kardiální mesenchymální stromální buňky (Sommariva *et al.*, 2015).

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Materiál

6.1.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity vzorky periferní krve 12 pacientů s diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií, které byly poskytnuty pro výzkumné účely v rámci spolupráce s I. interní klinikou Fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky byly v rámci práce anonymizované. Všichni pacienti podepsali písemný souhlas s experimentálním zpracováním vzorků jejich DNA.

6.1.2 Použité soupravy a chemikálie

Použité soupravy

101 MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, MGB400-01)

DNA 1000 Analysis Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5067-1504)

High Sensitivity DNA Analysis Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5067-4626)

QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200) (Qiagen, kat. č. 929002)

QIAquick PCR Purification kit, 50 (Qiagen, kat. č. 28104)

Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, kat. č. Q33231)

Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, kat. č. Q32853)

TruSight® Cardio Sequencing Kit (Illumina, FC-141-1010)

Použité chemikálie a roztoky

80% etanol: Příprava 20 ml 80% etanolu smísením 16,7 ml 96% etanolu a 3,3 ml destilované vody

deionizovaná voda

TP DNA-free 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, kat. č. T616)

Primery (Generi Biotech): CRYAB_F1958; CRYAB_F1959; CSRP3_F1960; CSRP3_R1961; RBM20_F1962; RBM20_R1963; JUP_F1964; JUP_R1965

6.1.3 Přístrojová vybavení

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Centrifuge 5430 (Eppendorf)

Centrifuge/vortex Combi-Spin (BioSan)

Chip Priming Station (Agilent Technologies)

Ika MS3 S36 Basic Chip Vortex (IKA)
MagCore HF16 (RBC Bioscience)
Minicentrifuge Minispin (Eppendorf)
MiSeq (Illumina)
Plate Shaker-Thermostat PST-100HL (BioSan)
QIAxcel Advanced Systém (Qiagen, kat. č. 9002123)
Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)
ThermoMixer® C (Eppendorf)
TProfessional Standard PCR Thermocycler (Biometra)
V-1 plus, Personal Vortex (BioSan)
Vacufuge 5301 Vacuum Centrifuge Concentrator (Eppendorf)
Vortex Mixer VX-20 (Labnet)

6. 2 Metodika

Uvedené metody a postupy byly provedeny na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. Ředění a příprava DNA knihovny bylo provedeno dle protokolu dodávaného s kitem TruSight® Cardio Sequencing Kit.

6. 2. 1 Izolace a příprava DNA

Izolace DNA

Izolaci DNA ze vzorků periferní krve pacientů provedli pracovníci Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. K izolaci byl použit automatický izolátor MagCore HF16 s využitím 101 MagCore® Genomic DNA Whole Blood kitu (RBC Bioscience).

Ředění DNA

Izolovaná genomová DNA byla postupně ředěna na 10 ng/μl a poté na 5 ng/μl. K ředění byla použita deionizovaná voda. Stanovení koncentrace vzorků bylo provedeno fluorometrickým měřením na přístroji Qubit 2.0 (Invitrogen) s použitím Qubit® dsDNA HS Assay kitu. Na základě tohoto měření byla DNA naředěna na koncentraci 10 ng/μl, opět byla stanovena koncentrace, a nakonec ředěna na finální koncentraci 5 ng/μl, potřebnou pro tagmentaci DNA.

6. 2. 2 Příprava DNA knihovny

Tagmentace genomové DNA

V prvním kroku byla genomická DNA štěpena na menší fragmenty za pomoci Nextera transposázy, která zároveň přidala adaptérové sekvence na konce fragmentů umožňující následnou PCR amplifikaci. Velikost získaných DNA fragmentů odpovídala předpokládané délce 150 bp – 1 kb.

Do jednotlivých jamek 96 jamkové mikrotitrační desky bylo napipetováno po 10 μ l genomické DNA o předem připravené koncentraci 5 ng/ μ l (celkem tedy 50 ng DNA v jedné reakci). K tomuto množství gDNA bylo přidáno 25 μ l Tagment DNA Buffer a 15 μ l Tagment DNA Enzyme. Deska byla zalepena ochrannou fólií a obsah byl důkladně promíchán na třepače při 1 800 rpm po dobu 1 minuty. Poté byla deska centrifugována po dobu 1 minuty při 280 g a následně umístěna v termocykleru a zahřívána 10 minut při teplotě 58 °C. Po vyjmutí desky z termocykleru byla reakce zastavena přidáním 15 μ l Stop Tagment Buffer. Deska byla opět přelepena ochrannou fólií a směs byla na třepače promísena při 1 800 rpm po dobu 1 minuty. Poté byla deska stočena na centrifuze po dobu 1 minuty při 280 g a inkubována 4 minuty při pokojové teplotě.

Přečištění tagmentované DNA

Přečištění tagmentované DNA pomocí magnetických kuliček bylo důležité pro odstranění transpozomů, které by se mohly pevně vázat na konce DNA a mohly tak ovlivňovat nebo rušit navazující reakce a procesy. Fragmenty DNA byly navázány na magnetické kuličky, omyty čerstvě připraveným 80% etanolem a poté z kuliček eluovány do roztoku.

Do každé jamky se vzorkem bylo přidáno 65 μ l dobře resuspendovaných magnetických kuliček Sample Purification Beads. Deska byla zalepena ochrannou fólií, protřepána po dobu 1 minuty při 1 800 rpm, inkubována 8 minut při pokojové teplotě a poté centrifugována 1 minutu při 280 g. Následně byla na 2 minuty deska umístěna do magnetického stojanu. Pomocí magnetu byly čistící kuličky přichyceny na stěnách jamek a bylo možné supernatant z jamek odsát. Po vyjmutí supernatantu ze všech jamek bylo ke kuličkám přidáno 200 μ l čerstvě připraveného 80% etanolu a po uběhnutí 30 sekund byl etanol odsán. Tento krok omytí etanolem byl 1x opakován. Po odsátí veškerého etanolu byla deska ponechána na magnetickém stojánku po dobu 10 minut při pokojové teplotě, aby došlo k úplnému vysušení magnetických kuliček s navázanou DNA. Poté byla deska odebrána z magnetického stojánku a do každé jamky bylo přidáno 22,5 μ l elučního roztoku Resuspension Buffer. Deska byla přelepena

ochrannou fólií, umístěna 1 minutu na třepačce při 1 800 rpm pro důkladné promíchání roztoku a inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Potom byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a na 2 minuty umístěna na magnetický stojánek. Nakonec bylo odebráno z každé jamky 20 µl supernatantu a přeneseno do odpovídajících jamek v nové desce. Velikost získaných přečištěných fragmentů DNA byla zkontrolována pomocí čipové elektroforézy v přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) s použitím High Sensitivity DNA čipu.

První PCR amplifikace

Přečištěné fragmenty DNA byly v tomto kroku namnoženy pomocí PCR amplifikace. K fragmentům DNA byly připojeny indexy i7 a i5, které jsou nutné pro identifikaci jednotlivých vzorků při sekvenování. Rovněž byly navázány společné adaptéry P5 a P7 potřebné pro tvorbu klastrů a samotné sekvenování.

Do každé zkumavky s přečištěnou DNA bylo přidáno 5 µl indexu i7 (N701-712) a 5 µl indexu i5 (E502) (viz **Tabulka č. 3**). Poté bylo do každé zkumavky napipetováno 20 µl Nextera Library Amplification Mix. Zkumavky byly uzavřeny, protřepány při 1 200 rpm po dobu 1 minuty a poté byly centrifugovány 1 minutu při 280 g. Následně byly vloženy do připraveného termocykleru a byl spuštěn PCR program, jehož podmínky jsou uvedeny v **Tabulka č. 4**.

Tabulka č. 3: Indexy i5 a i7 v jednotlivých vzorcích: Vz. – vzorek.

	N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N708	N709	N710	N711	N712
E502	Vz. 1	Vz. 2	Vz. 3	Vz. 4	Vz. 5	Vz.6	Vz. 7	Vz. 8	Vz. 9	Vz.10	Vz. 11	Vz. 12

Tabulka č. 4: Podmínky první PCR amplifikace fragmentované DNA

Krok reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
Zahřívání	72 °C	2 minuty	1
Počáteční denaturace	98 °C	30 sekund	1
Denaturace	98 °C	10 sekund	10
Připojení primerů	60 °C	30 sekund	
Extenze	72 °C	30 sekund	
Konečná extenze	72 °C	5 minut	1
Chlazení	10 °C	∞	-

První přečištění amplifikované DNA

Následné přečištění amplifikované DNA bylo nutné pro odstranění nežádoucích produktů a byly k tomu opět použity magnetické kuličky podobně jako v kroku přečištění tagmentované DNA.

Po vyjmutí z termocykleru byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 280 g. Z každé zkumavky bylo odebráno 50 µl vzorku a vloženo do odpovídající jamky na nové 96 jamkové desce. Do jamek bylo přidáno 90 µl dobře resuspendovaných magnetických kuliček (Sample Purification Beads). Následné přečištění probíhalo stejně jako v předešlém kroku, lišilo se pouze v posledním kroku, kdy bylo k vzorkům přidáno 27 µl Resuspension Buffer pro eluci DNA, z něhož bylo odebráno 25 µl čistého supernatantu a pipetováno do odpovídajících jamek na nové desce. Z každého vzorku byl 1 µl podroben analýze pomocí přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) s použitím Agilent DNA 1000 čipu.

V případě, že nebylo možné dále pokračovat v postupu, bylo možné vzorky zmrazit při teplotě -15 až -25 °C po dobu maximálně 14 dnů.

První hybridizace

V tomto kroku byla provedena hybridizace DNA se sondami cílenými ke specifickým oblastem molekuly DNA s navázaným biotinem. Doporučená délka a teplota hybridizace byla důležitá pro správné a specifické navázání sond na DNA.

Před samotnou hybridizací bylo však nutno vzorky smísit tak, aby bylo k hybridizaci použito stejné množství DNA od každého vzorku – provést tzv. poolování vzorků. Vzhledem k tomu, že bylo k experimentu použito 12 vzorků, byl vytvořen pouze jeden pool. Z každého vzorku byl odebrán objem odpovídající 500 ng DNA (viz *Tabulka č. 5*). Celkový obsah poolu tak byl 6 000 ng DNA. Pro hybridizační reakci bylo potřeba zajistit, aby celkový objem poolu činil 40 µl. Objem získaného poolu však byl 70,45 µl, a proto byl objem snížen pomocí centrifugačního zakoncentrování s použitím přístroje Vacufuge 5301 Vacuum Centrifuge Concentrator (Eppendorf) na objem 34,4 µl a doplněn do 40 µl pomocí Resuspension Buffer.

Po dosažení objemu 40 µl, bylo k poolu přidáno 50 µl Enrichment Hybridization Buffer a 10 µl TruSight Content Set CSO (Custom Selected Oligos) obsahující specifické próby, lišící se podle experimentu. Směs byla následně promíchána 1 minutu na třepačce při 1 200 rpm, poté byla centrifugována 1 minutu při 280 g a vložena do termocykleru s nastaveným hybridizačním programem (viz *Tabulka č. 6*). Délka hybridizace byla přibližně 14 hodin.

Tabulka č. 5: Poolování 12 vzorků před první hybridizací

Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]	Objem vzorku obsahující 500 ng DNA [μl]	Objem poolu [μl]
1	88,6	5,64	70,45
2	81,8	6,11	
3	79,4	6,30	
4	83,8	5,97	
5	97,4	5,13	
6	90,8	5,51	
7	95,6	5,23	
8	93,4	5,35	
9	61,4	8,14	
10	91,8	5,45	
11	86,0	5,81	
12	86,0	5,81	
Objem po odpaření [μl]			34,4
Doplňný objem Resuspension Buffer [μl]			5,6
Konečný objem poolu [μl]			40

Tabulka č. 6: Podmínky první hybridizace

Krok reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční hybridizace	95 °C	10 minut	1
Denaturace	94 °C a pokles 2 °C/min	1 minuta	18
Hybridizace	58 °C	90 minut – 24 hodin	1

První obohacení (enrichment)

Po hybridizaci byl proveden tzv. enrichment, jedná se o obohacení vzorku za pomoci streptavidinových kuliček, na kterých jsou navázány pouze cílené úseky. Na tyto úseky byly biotinem přichyceny specifické sondy, které byly připojené k cílovým oblastem DNA. Následující dva kroky zahrnovaly promývání za zvýšené teploty, které sloužily k odstranění sond s nespecifickou vazbou. Obohacená DNA knihovna byla poté eluována z kuliček a připravena ke druhé hybridizaci.

Po vyjmutí z termocykleru byla deska s poolem centrifugována 1 minutu při 280 g. Objem byl přepipetován do nové jamky a k němu bylo přidáno 250 μl dobře rozmíchaných streptavidinových magnetických kuliček (Streptavidin Magnetic Beads). Směs byla protřepána 5 minut při 1 200 rpm a inkubována 25 minut při pokojové teplotě. Poté byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g. Následně byla deska umístěna na magnetický stojánek

po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Po usazení vzorku ke stěně byl všechen supernatant opatrně odebrán. Deska byla odebrána z magnetického stojánu a do jamky bylo přidáno 200 μ l Enrichment Wash Solution. Směs byla poté protřepána 4 minuty při 1 800 rpm a pipetou jemně a důkladně promíchána. Následně byla deska inkubována 30 minut při 50 °C v inkubátoru.

Po inkubaci byla deska ihned umístěna na magnetických stojánek po dobu 2 minut a veškerý supernatant byl odsán. Postup promývání s 200 μ l Enrichment Wash Solution byl jednou opakován a po odsátí supernatantu bylo ke směsi přidáno 23 μ l eluční směsi, která byla připravena pro jeden vzorek v nadbytku z 28,5 μ l Enrichment Elution Buffer 1 a 1,5 μ l 2N NaOH. Směs byla protřepána 2 minuty při 1 800 rpm a poté inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Následně byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a umístěna na magnetický stojánek po dobu 2 minut. Potom bylo 21 μ l vzorku přeneseno do nové jamky a byly přidány 4 μ l Elute Target Buffer 2 pro neutralizaci eluce. Směs byla protřepána 1 minutu při 1 200 rpm a deska centrifugována 1 minutu při 280 g.

Druhá hybridizace

Tento a následující krok byl v podstatě zopakováním postupu první hybridizace a obohacení. Tato druhá hybridizace zajišťovala vysokou specifičnost cílených úseků a i zde bylo nutné dodržet teplotu a délku hybridizace.

K přečištěnému vzorku bylo přidáno 15 μ l Resuspension Buffer, 50 μ l Enrichment Hybridization Buffer a 10 μ l TruSight Content Set (CSO), směs byla promíchána na třepačce po dobu 1 minuty při 1 200 rpm a deska centrifugována 1 minutu při 280 g. Poté byla deska opět vložena do termocyklieru s nastaveným hybridizačním programem (viz *Tabulka č. 7*).

Tabulka č. 7: Podmínky druhé hybridizace

Krok reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční hybridizace	95 °C	10 minut	1
Denaturace	94 °C a pokles 2 °C/min	1 minuta	18
Hybridizace	58 °C	14,5 – 24 hodin	1

Druhé obohacení (enrichment)

Po vyjmutí z termocyklieru byl vzorek obohacen pomocí streptavidinových kuliček a eluován stejným postupem jako v kroku prvního obohacení.

Přečištění obohacené DNA

S použitím magnetických kuliček byla DNA přečištěna a připravena ke druhé PCR amplifikaci.

K 25 μ l DNA knihovny bylo přidáno 45 μ l Sample Purification Beads a směs byla protřepána 1 minutu při 1 800 rpm a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a umístěna na magnetický stojánek po dobu 2 minut. Po usazení kuliček na stěně jamky byl odebrán veškerý supernatant a do jamky bylo přidáno 200 μ l čerstvě připraveného 80% etanolu. Po 30 sekundách byl etanol odsán a krok promytí byl zopakován. Poté byl vzorek ponechán 10 minut při pokojové teplotě pro dokonalé usušení. Následně byla deska odebrána z magnetického stojánku a do jamky bylo přidáno 27,5 μ l Resuspension Buffer. Vzorek byl protřepán 1 minutu při 1 800 rpm a inkubován 2 minuty při pokojové teplotě. Poté byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a opět vložena na magnetický stojánek. Po 2 minutách usazování kuliček na stěnu jamky bylo opatrně přeneseno 25 μ l přečištěného vzorku do nové jamky.

Druhá PCR amplifikace

V tomto kroku byly vychytané cílové úseky DNA amplifikovány pomocí 12 PCR cyklů. Během PCR reakce byly k DNA připojeny sekvenační primery, kterými se jednotlivé fragmenty přichycují k průtokové komůrce sekvenátoru.

Do zkumavky s 25 μ l DNA knihovny bylo přidáno 5 μ l směsi primerů PCR Primer Cocktail a 20 μ l reakční směsi Nextera Enrichment Amplification Mix. Směs byla protřepána 1 minutu při 1 200 rpm a zkumavka byla centrifugována 1 minutu při 280 g. Poté byla zkumavka vložena do termocykleru s nastaveným PCR programem, jehož podmínky jsou uvedeny v *Tabulce č. 8*.

Tabulka č. 8: Podmínky druhé PCR amplifikace DNA

Krok reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98 °C	30 sekund	1
Denaturace	98 °C	10 sekund	12
Připojení primerů	60 °C	30 sekund	
Extenze	72 °C	30 sekund	
Konečná extenze	72 °C	5 minut	1
Chlazení	10 °C	∞	-

Druhé přečištění amplifikované DNA

Po PCR amplifikaci byla DNA opět přečištěna pomocí magnetických kuliček pro odstranění nežádoucích produktů.

Po vyjmutí z termocykleru byla zkumavka centrifugována 1 minutu při 280 g. K celkovému množství 50 µl amplifikované DNA přenesenému do jamky v desce bylo přidáno 90 µl dobře rozmíchaných streptavidinových magnetických kuliček (Sample Purification Beads). Směs byla protřepána 1 minutu při 1 800 rpm a inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Poté byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a umístěna na magnetický stojánek po dobu 2 minut. Po usazení kuliček na stěně jamky byl odebrán supernatant a magnetické kuličky opatrně promyty 200 µl čerstvě připraveného 80% etanolu. Po oplachu byl veškerý etanol odsán a vzorek byl ponechán 10 minut při pokojové teplotě pro úplné odpaření zbytkového alkoholu. Poté byla deska odebrána z magnetického stojánu a ke vzorku bylo přidáno 32 µl Resuspension Buffer. Směs byla protřepána 1 minutu při 1 800 rpm a inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Následně byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a vložena na magnetický stojánek na dobu 2 minut. Po usazení magnetických kuliček na stěnu jamky bylo 30 µl připravené DNA knihovny přepipetováno do nové jamky na desce.

Kvantifikace, ředění a denaturace finální DNA knihovny

Před samotnou denaturací byla DNA kvantifikována pomocí přístroje 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) s použitím Agilent High Sensitivity čipu a fluorometru Qubit (Invitrogen). S použitím následujícího vzorce byla získána koncentrace DNA v nM.

$$\frac{(\text{koncentrace DNA v ng/}\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \cdot \text{průměrná délka DNA})} \cdot 10^6 = \text{kocentrace v nM}$$

Koncentrace připravené DNA knihovny byla 26,1 ng/µl a průměrná délka fragmentů činila cca 340 bp. Tedy:

$$\frac{26,1 \text{ ng/}\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} \cdot 340)} \cdot 10^6 = 116 \text{ nM}$$

Požadovaná koncentrace pro postup sekvenování byla 2 nmol/µl. DNA tedy byla ředěna 58x, smísením 5 µl DNA a 285 µl H₂O.

K 15 µl DNA naředěné na požadovanou koncentraci bylo přidáno 15 µl zředěného NaOH, který byl připraven smícháním 10 µl NaOH a 240 µl H₂O. Ze směsi DNA-NaOH bylo

odejmuto 9 μ l a smícháno s 991 μ l Hyb Buffer (HT1). Z této směsi bylo odebráno 600 μ l a napipetováno do sekvenační kazety (cartridge).

6. 2. 3 Sekvence na přístroji MiSeq

Pomocí TruSight® Cardio Sequencing kitu bylo u každého vzorku sekvenováno 174 genů (viz *Příloha č. 2*) asociovaných s různými dědičnými srdečními chorobami. Geny pro tento panel byly odborně vybrány výzkumníky z Imperial College v Londýně se zaměřením na ty srdeční choroby, které jsou nejvíce ovlivněny genetickými predispozicemi. Je zde zahrnuto 17 srdečních chorob, z nichž kardiomyopatie zahrnují podstatnou část panelu (viz *Tabulka č. 9*).

Tabulka č. 9: Seznam onemocnění a počet profilovaných genů zahrnující TruSight® Cardio Sequencing Kit

Srdeční choroba	Počet profilovaných genů
Onemocnění aortální chlopně	3
Marfanův syndrom	3
Loeys-Dietz syndrom	4
Syndrom krátkého QT	4
Katecholaminergní polymorfni komorová tachykardie	6
Familiární hypercholesterolemie	7
Restriktivní kardiomyopatie	9
Nonkompaktní kardiomyopatie	10
Noonanův syndrom	11
Arytmogenní dysplazie pravé komory	11
Brugada syndrom	13
Strukturní onemocnění srdce	15
Syndrom dlouhého QT	15
Familiární aneurysma aorty	16
Familiární atriální fibrilace	21
Hypertrofická kardiomyopatie	47
Dilatační kardiomyopatie	59

Před spuštěním analýzy byl celý sekvenační systém promyt roztokem Tween 20 o 0,5% koncentraci. Reagenční cartridge, obsahující chemikálie potřebné k sekvenování, byla před analýzou rozmrazena a do vyznačeného otvoru bylo napipetováno 600 μ l naředěné DNA knihovny. Poté byla cartridge spolu s lahví pufru vložena do přístroje. Průtoková komůrka byla omyta destilovanou vodou, dosucha očištěna a vložena do přístroje.

Na sekvenátoru byl spuštěn program Illumina Experiment Manager verze 1.8 a s jeho pomocí byl vytvořen Sample Sheet, který udává instrukce přístroji MiSeq. Byla zvolena kategorie Targeted Resequencing a Enrichment. Ze sekvenační cartridge byl opsán Reagent Cartridge Barcode a sekvenační běh byl pojmenován. Dále byl zadán počet čtení 2x 151 bází a jednotlivým vzorkům byly přiřazeny příslušné indexy i5 a i7. Nakonec byl vložen seznam analyzovaných oblastí (TruSight Cardio Manifest) a analýza byla spuštěna.

6. 2. 4 Analýza sekvenačních dat

Nedílnou součástí přístroje MiSeq je program MiSeq Reporter, který po skončení analýzy vygeneroval datové soubory FASTQ, BAM a VCF, pomocí aplikace „workflow – enrichment“, která obsahuje nástroje „BWA mem“ a „GATK realign“ pro zarovnání (alignment) na referenční genomovou sekvenci hg19 a nástroj GATK pro variant calling. Datové soubory FASTQ byly zpracovány interní neveřejnou analytickou pipeline 3 MOLDIMED prostřednictvím superpočítače IT4i, která je vyvíjena v rámci projektu č. TE02000058 v Centrum kompetence pro molekulární diagnostiku a personalizovanou medicínu s finanční podporou TA ČR. Tato pipeline obsahuje nástroje BWA mem pro alignment a Varscan pro variant calling.

Datové soubory VCF byly zároveň zpracovány v programu Variant Studio verze 3.0, programu VarAft a online přístupném programu BaseSpace Variant Interpreter. V rámci těchto programů bylo provedeno efektivní filtrování variant na základě kvality sekvenačních dat, populační frekvence, typu nalezených variant, popřípadě asociovaného fenotypu. Podrobnější informace o analýze genových variant prostřednictvím jednotlivých programů je popsán v kapitole Výsledky. Práce s těmito anotačními a interpretačními nástroji byla následně porovnávána a na základě poskytnutých informací byla hodnocena závažnost jednotlivých nalezených variant.

6. 2. 5 Navržení primerů a PCR amplifikace vybraných variant

Z nalezených variant byly vybrány některé, které by mohly být potenciálně patogenní. Na tyto úseky sekvence s vybranými variantami byly navrženy primery za pomoci online dostupného nástroje Primer3 (www.primer3.ut.ee).

Na PCR reakci bylo potřeba 0,5 µl vzorku DNA, 10 µl Master Mixu (TopBio), 0,6 µl forward primeru, 0,6 µl reverse primeru a 8,3 µl deionizované vody (viz *Tabulka č. 10*). Zkumavky se směsí byly vloženy do termocykléru a byl spuštěn odpovídající program (viz *Tabulka č. 11*). PCR produkty byly následně přečištěny na koloně pomocí kitu QIAquick PCR Purification. Kvalita a velikost vzniklých produktů byla ověřena pomocí přístroje Qiaxcel

za použití QIAxcel DNA High Resolution kitu. Za účelem validace variant byly PCR produkty spolu s navrženými primery osekvenovány Sangerovou metodou, prostřednictvím firmy SEQme.

Tabulka č. 10: Objemy a koncentrace chemikálií použitých na PCR amplifikaci vybraných variant

Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Koncentrace v PCR reakci	Objem [μ l]
Master Mix	2x	1x	10
Forward primer	10 μ M	0,3 μ M	0,6
Reverse primer	10 μ M	0,3 μ M	0,6
DNA	-	-	0,5
H ₂ O	-	-	8,3
Celkem			20

Tabulka č. 11: Podmínky PCR reakce vybraných variant

Krok reakce	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	5 minut	1
Denaturace	95 °C	10 sekund	40
Připojení primerů	58 °C	30 sekund	
Extenze	72 °C	30 sekund	
Melting	95-65 °C	-	-

7 VÝSLEDKY

DNA izolovaná z poskytnutých patientských vzorků byla použita k přípravě DNA knihovny a sekvenována použitím TruSight® Cardio Sequencing kitu přístrojem MiSeq. Kromě samotné analýzy DNA byla zaznamenána také kvalita sekvenačních dat.

7.1 Kvalita sekvenačních dat

Celková délka sekvence cílové oblasti byla 571 897 bp. Výtěžek sekvenačního běhu činil 5,54 Gbp. Hustota činila $1,040 \pm 15$ tisíc klastrů/mm², z nichž $88,41 \pm 6,19$ % prošlo vnitřním filtrem kvality. V rámci sekvenování proběhlo celkem 39 921 312 čtení a 35 299 334 jich prošlo vnitřním filtrem kvality sekvenování. Počet čtení u jednotlivých vzorků a výtěžek enrichmentu je zaznamenán v *Tabulce č. 12*. Ve všech případech bylo procentuální zastoupení oblastí pokrytých 20x 99,9 %, s výjimkou dvou vzorků, kde bylo pokrytí 20x 99,8 %. Přehled pokrytí sekvenování jednotlivých vzorků je uvedeno v *Tabulce č. 13*. Průměrná délka sekvenovaných fragmentů byla 147 bp a přehled délek sekvenovaných fragmentů je zaznamenán v *Tabulce č. 14*.

Tabulka č. 12: Počet čtení a klastrů u jednotlivých vzorků

Vzorek	Celkový počet čtení přiřazených k referenčnímu genomu	Počet čtení přiřazených cílové oblasti	Procentuální zastoupení enrichmentu	Počet klastrů
1	3 384 593	2 728 792	80,6 %	1 694 884
2	2 774 484	2 245 807	80,9 %	1 389 623
3	3 750 789	3 032 839	80,9 %	1 879 201
4	2 634 746	2 160 109	82,0 %	1 319 564
5	3 001 702	2 454 136	81,8 %	1 502 983
6	2 767 604	2 218 777	80,2 %	1 385 800
7	2 969 512	2 411 157	81,2 %	1 489 194
8	2 182 633	1 782 651	81,7 %	1 093 757
9	3 399 205	2 782 849	81,9 %	1 701 774
10	2 217 253	1 815 917	81,9 %	1 110 494
11	2 259 231	1 849 439	81,9 %	1 131 155
12	2 569 339	2 089 742	81,3 %	1 286 521

Tabulka č. 13: Přehled pokrytí sekvenování jednotlivých vzorků

Vzorek	Počet nukleotidů přiřazených k dané oblasti (průměrný počet případů, kdy je konkrétní báze sekvenována nezávislými čteními) – pokrytí sekvenování	Procentuální zastoupení oblastí pokrytých 20x	Procentuální zastoupení oblastí pokrytých 50x
1	401,2x	99,9 %	99,6 %
2	325,9x	99,9 %	99,4 %
3	444,1x	99,9 %	99,8 %
4	302,7x	99,9 %	99,3 %
5	348,9x	99,9 %	99,5 %
6	324,2x	99,9 %	99,5 %
7	341,1x	99,9 %	99,5 %
8	250,1x	99,8 %	98,4 %
9	402,4x	99,9 %	99,7 %
10	255,6x	99,8 %	98,9 %
11	258,9x	99,9 %	98,9 %
12	303,2x	99,9 %	99,4 %

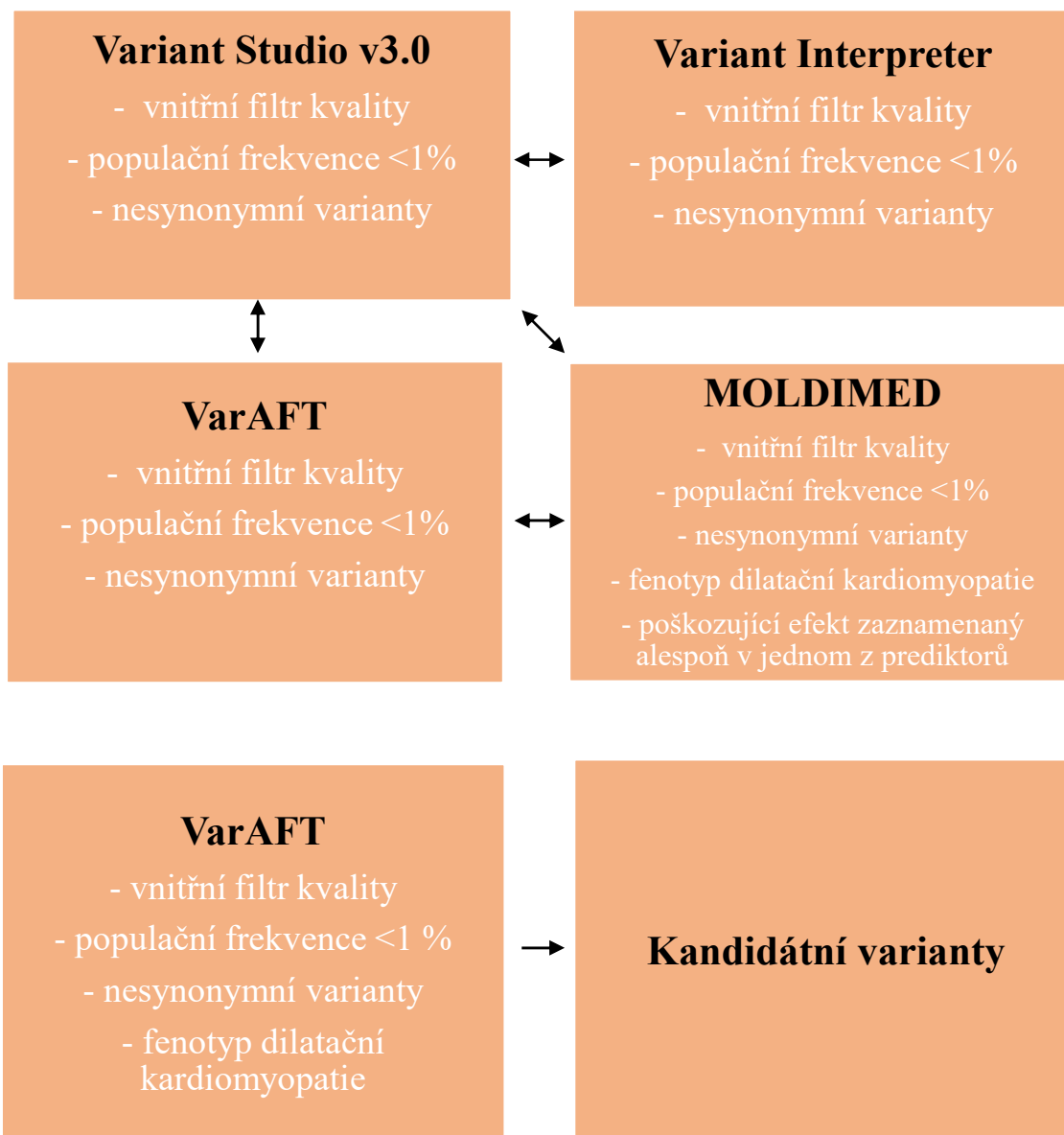
Tabulka č. 14: Délka fragmentů sekvenované DNA u jednotlivých vzorků

Vzorek	Průměrná délka sekvenovaných fragmentů	Minimální délka sekvenovaných fragmentů	Maximální délka sekvenovaných fragmentů
1	163 bp	37 bp	545 bp
2	153 bp	36 bp	508 bp
3	159 bp	37 bp	536 bp
4	136 bp	36 bp	439 bp
5	142 bp	36 bp	460 bp
6	156 bp	37 bp	518 bp
7	140 bp	36 bp	461 bp
8	138 bp	36 bp	443 bp
9	151 bp	37 bp	490 bp
10	139 bp	36 bp	447 bp
11	137 bp	36 bp	445 bp
12	152 bp	37 bp	495 bp

7.2 Výsledky analýzy DNA

Kitem TruSight® Cardio Sequencing bylo analyzováno celkem 174 genů. Výstupní VCF soubory byly zpracovány a analyzovány v programu Variant Studio verze 3.0, programu VarAft a online přístupném programu BaseSpace Variant Interpreter. Pro další srovnání byl také použit anotační nástroj MOLDIMED, který zpracovává soubory FASTQ.

Na **Obrázku č. 4** je schematicky zobrazeno vzájemné porovnávání jednotlivých programů, jejich podmínky filtrace a kritéria pro výběr kandidátních variant.



Obrázek č. 4: Schéma vzájemného porovnávání jednotlivých programů, jejich podmínky filtrace a kritéria pro výběr kandidátních variant

7. 2. 1 Variant Studio v3.0

Celkem bylo nalezeno 3843 variant, z toho 3746 jednonukleotidových variant a 97 indel variant. Průměrně byl u každého pacienta zjištěno 320 variant, 312 jednonukleotidových a 8 indel variant. Počet nalezených variant a počet genů, ve kterých byly varianty nalezeny, u jednotlivých vzorků je uveden v **Tabulce č 15**.

Tabulka č. 15: Počet nalezených variant v jednotlivých vzorcích prostřednictvím Variant Studio v3: jednonukleotidové varianty – single nucleotide variant (SNV), databáze jednonukleotidového polymorfismu - single nucleotide polymorphism database (dbSNP).

Vzorek	Počet genů s nalezenými variantami	Počet variant	Počet SNV	Počet indel variant
1	104	327	318	9
2	104	308	300	8
3	100	361	351	10
4	103	304	294	10
5	98	322	312	10
6	105	330	323	7
7	108	348	339	9
8	110	286	281	5
9	98	290	283	7
10	104	326	319	7
11	96	284	278	6
12	101	357	348	9

Pro další analýzu byly varianty specificky filtrovány. Na základě sekvenačních dat byly vybrány pouze varianty, které prošly vnitřním filtrem kvality. Poté byly zvoleny varianty s detekovanou frekvencí varianty >20 %, dále ty, jejichž zastoupení v populaci je <1 % a také konkrétně v evropské populaci <1 %. S ohledem na případnou patogenitu mutace, byly zobrazeny pouze sestřihové varianty, posunové mutace (frameshift), ztráty terminačních kodonů, mutace mající smysl (missense), změny iniciačních kodonů a inserce a delece.

Filtrací bylo vybráno celkem 120 variant v 53 genech. V naprosté většině se jednalo o missense varianty, kterých bylo nalezeno 101. Dále byly zjištěny 3 frameshift varianty, 2 inframe delece, 11 inframe inzercí, 1 intronová varianta a 2 varianty sestřihové. Nejvíce variant, konkrétně 34 bylo nalezeno v genu *TTN*, 8 variant se nacházelo v genu *ALMS1*, v genech *APOB*, *PCSK9* a *SDHA* bylo nalezeno 5 variant. V ostatních genech to bylo méně než 5 variant. Seznam nalezených variant u jednotlivých pacientů je uveden v **Tabulce č. 16**. Varianta p.Glu28dup v genu *ALMS1* byla nalezena u 50 % vzorků a byla označena za artefakt.

Tabulka č. 16: Nalezené genové varianty u jednotlivých pacientů analyzovány programem Variant Studio v3: varianty s detekovanou frekvencí varianty >20 %, jejichž zastoupení v populaci je <1 % a také konkrétně v evropské populaci <1 %; označení * představuje přítomnost artefaktu *ALMS1* p.(Glu28dup).

Pacient	Nalezené genové varianty
1	<i>APOB</i> p.(Val4074Met); <i>NDE1</i> c.947+7250T>A, <i>MYH11</i> p.(Thr1941Ser); <i>NOTCH1</i> p.(Arg1279His); <i>PCSK9</i> p.(Leu23dup); <i>RYR2</i> p.(Ser1400Gly); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TTN</i> p.(Ile33540Thr); <i>TTN</i> p.(Arg28474ValfsTer15)
2	<i>APOB</i> p.(Thr1973Ile); <i>CRYAB</i> p.(Pro39Leu); <i>HCN4</i> p.(Met1113Val); <i>LAMA4</i> p.(Arg1080Gln); <i>LAMP2</i> p.(Gly221Arg); <i>LDB3</i> p.(Gln517Pro); <i>LTBP2</i> p.(His1816Asn); <i>MYBPC3</i> p.(Arg326Gln); <i>PCSK9</i> p.(Arg46Leu); <i>TTN</i> p.(Ala10827Val); <i>TTN</i> p.(Val5060Leu); <i>TTN</i> p.(Pro30726Ser)
3	<i>ABCG8</i> p.(Ser241Phe); <i>ANK2</i> p.(Glu3931Lys); <i>APOB</i> p.(Ser4430Thr); <i>BRAF</i> p.(Ser607Phe); <i>CSRP3</i> p.(Gly70Trp); <i>DSP</i> p.(Arg889Lys); <i>FHL2</i> p.(Arg113Cys); <i>KCNH2</i> p.(Arg892Cys); <i>MURC</i> p.(Pro327His); <i>TTN</i> p.(Glu11416del); <i>TTN</i> p.(Asn7744Lys); <i>TTN</i> p.(Asn4657His); <i>TTN</i> p.(Pro20274Leu); *
4	<i>LAMA4</i> p.(Arg1080Gln); <i>MYBPC3</i> p.(Ser217Gly); <i>PCSK9</i> p.(Leu23dup); <i>TRPM4</i> p.(Arg252His); <i>TTN</i> p.(Glu11172dup); *
5	<i>CBS</i> p.(Arg45Trp); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TTN</i> p.(His10092Tyr); <i>TTN</i> p.(Arg3120Gln); <i>TTN</i> p.(Arg32748Cys); *
6	<i>ALMS1</i> p.(Glu1355Asp); <i>APOB</i> p.(Asp1113His); <i>FBN1</i> p.(Thr1020Ala); <i>LPL</i> p.(Asn318Ser); <i>NOTCH1</i> p.(Arg621His); <i>PCSK9</i> p.(Leu23dup); <i>RBM20</i> p.(Tyr229Cys); <i>TTN</i> p.(Val5435Met); <i>TTN</i> p.(Pro4995Arg); <i>TTN</i> p.(Ile2986Thr)
7	<i>DSC2</i> p.(Ala897Lysfs); <i>RYR2</i> p.(Asn3308Ser); <i>SDHA</i> p.(Val461Phe); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TRPM4</i> p.(Pro1204Leu); <i>TTN</i> p.(Glu12487Asp); <i>TTN</i> p.(Leu26799Arg); <i>TTN</i> p.(Ser31002Ile); *
8	<i>ACTA1</i> p.(Tyr220His); <i>DSC2</i> p.(Ala897Lysfs); <i>LDB3</i> c. 891T>C(p.=); <i>PDLIM3</i> p.(Thr245Ile); <i>SNTA1</i> p.(Ala263Ser); <i>TTN</i> p.(Val8322Leu); <i>TTN</i> p.(Tyr5683Cys); <i>TTN</i> p.(Arg34859Gln)
9	<i>COL5A2</i> p.(Thr1230Arg); <i>DSP</i> p.(Val30Met); <i>NOTCH1</i> p.(Pro1377Ser); <i>RYR2</i> p.(Val4653Ile); <i>ZHX3</i> p.(Glu671Lys); *
10	<i>APOB</i> p.(Glu2566Lys); <i>JUP</i> p.(Asn425Asp); <i>MYLK</i> p.(Pro443Ser); <i>PKP2</i> p.(Ala372Pro); <i>SCN1B</i> p.(Arg214Gln); <i>TRPM4</i> p.(Arg252His); <i>TTN</i> p.(Ser24535Tyr); <i>TTN</i> p.(Val32324Ala); *
11	<i>AKAP9</i> p.(Met3614Val); <i>ALMS1</i> p.(Asn2944Lys); <i>APOA4</i> p.(Ala161Ser); <i>DMD</i> p.(Thr1245Ile); <i>GAA</i> p.(Pro493Leu); <i>LAMA2</i> p.(Cys3087Ser); <i>MYH7</i> c.5286C>T(p.=); <i>MYLK</i> p.(Pro443Ser); <i>PCSK9</i> p.(Leu23dup)
12	<i>ACTN2</i> p.(Arg298His); <i>ANK2</i> p.(Val3634Asp); <i>CALR3</i> p.(Glu383Lys); <i>COL5A1</i> p.(Asn951Ser); <i>FKRP</i> p.(Ala114Gly); <i>LAMA2</i> p.(Thr2895Ser); <i>LDLRAP1</i> p.(Glu33Lys); <i>LMF1</i> p.(Arg354Trp); <i>NOTCH1</i> p.(Gly842del); <i>SCN5A</i> p.(Pro2006Ala); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>SENPI1</i> p.(Thr137Ala); <i>TRIM63</i> p.(Glu269Lys); <i>TTN</i> p.(Leu10784Val); <i>TTN</i> p.(Gly7058Asp); <i>TTN</i> p.(Arg15908His); <i>TTN</i> p.(Lys18518Arg); <i>TTN</i> p.(Thr21820Ile); <i>TTN</i> p.(Ser23226Gly); <i>TTN</i> p.(Val29796Met); <i>TTN</i> p.(Arg31748Cys); <i>TTN</i> p.(Ile31757Thr); <i>TTN</i> p.(Glu35527Val)

Na základě informací uvedených v databázi ClinVar, frekvence alely v populaci a hodnocení nástroji SIFT a PolyPhen, které program Variant Studio zobrazuje, bylo vyhodnoceno 17 variant jako benigních, 31 variant pravděpodobně benigních, 1 varianta pravděpodobně patogenní (*GAA* p.(Pro493Leu)) a 71 variant neznámého významu.

7. 2. 2 BaseSpace Variant Interpreter

Programem Variant Interpreter byly analyzovány totožné VCF soubory, a proto byl počet nalezených variant shodný s množstvím zobrazeným v programu Variant Studio.

Pro filtraci byly použity podobné parametry jako u Variant Studia. Aplikací filtru byly vybrány pouze jednonukleotidové a indel varianty, které prošly nastaveným vnitřním filtrem kvality. Poté byly zvoleny varianty s detekovanou frekvencí varianty >20 % a dále ty, jejichž zastoupení v populaci je <1 % v rámci všech databází, které Variant Interpreter využívá. Dále pak byly vyhledány varianty se ztrátou terminačního kodonu, s nově vzniklým terminačním kodonem, s nekompletním terminačním kodonem, posunové a sestřihové varianty, inserce, delece, varianty se změnou iniciačního kodonu a missence varianty.

Filtrací bylo vytipováno 90 variant v 44 genech. Nalezené varianty se shodovaly s výsledky z programu Variant Studio až na pár výjimek. Několik variant program Variant Interpreter oproti Variant Studiu vůbec nezobrazoval (viz **Tabulka č.17**), mezi které patří i již zmíněný artefakt *ALMS1* p.(Glu28dup).

Tabulka č. 17: Genové varianty nezobrazené programem Variant Interpreter, ale nalezené v programu Variant Studio

Pacient	Genová varianta
1	<i>NOTCH1</i> p.(Arg1279His); <i>RYR2</i> p.(Ser1400Gly); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe)
2	<i>PCSK9</i> p.(Arg46Leu); <i>HCN4</i> p.(Met1113Val)
3	<i>ALMS1</i> p.(Glu28dup)
4	<i>ALMS1</i> p.(Glu28dup)
5	<i>ALMS1</i> p.(Glu28dup); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe)
6	<i>LPL</i> p.(Asn318Ser); <i>TTN</i> p.(Pro4995Arg)
7	<i>ALMS1</i> p.(Glu28dup); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TTN</i> p.(Glu12487Asp)
8	<i>PDLIM3</i> p.(Thr245Ile)
9	<i>ALMS1</i> p.(Glu28dup); <i>NOTCH1</i> p.(Pro1377Ser)
10	<i>ALMS1</i> p.(Glu28dup); <i>MYLK</i> p.(Pro443Ser)
11	<i>ALMS1</i> p.(Asn2944Lys); <i>DMD</i> p.(Thr1245Ile); <i>MYLK</i> p.(Pro443Ser)
12	<i>COL5A1</i> p.(Asn951Ser); <i>FKRP</i> p.(Ala114Gly); <i>LMF1</i> p.(Arg354Trp); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>SENPI</i> p.(Thr137Ala)

Na základě frekvence alely v populaci, hodnocení nástroji SIFT a PolyPhen, uvedené predikce z databáze ClinVar a BaseSpace® Knowledge Network, což je soukromá databáze firmy Illumina, bylo vyhodnoceno 9 variant jako benigních, 23 variant pravděpodobně benigních, 1 varianta pravděpodobně patogenní (*GAA* p.(Pro493Leu)) a 57 variant neznámého významu.

7. 2. 3 VarAFT

Celkem bylo nalezeno 3800 genových variant. Za použití filtru byly vybrány všechny typy variant kromě synonymních variant, poté varianty s frekvencí <1 % uvedenou v databázi 1000 Genomes a The Genome Aggregation Database.

Filtrací bylo vytipováno 91 variant ve 44 genech. Nejvíce variant, konkrétně 32, bylo nalezeno v genu *TTN* a 5 variant se nacházelo v genu *APOB*. V ostatních genech se nacházelo 1-4 variant. Seznam nalezených variant u jednotlivých pacientů je uveden v **Tabulce č. 18**.

Tabulka č. 18: Nalezené genové varianty u jednotlivých pacientů analyzovány programem VarAFT: nesynonymní varianty s populační frekvencí <1 %.

Pacient	Nalezené genové varianty
1	<i>APOB</i> p.(Val4074Met); <i>MYH11</i> p.(Thr1941Ser); <i>TTN</i> p.(Arg28474ValfsTer15)
2	<i>APOB</i> p.(Thr1973Ile); <i>CRYAB</i> p.(Pro39Leu); <i>LAMP2</i> p.(Gly221Arg); <i>LDB3</i> p.(Gln517Pro); <i>LTBP2</i> p.(His1816Asn); <i>MYBPC3</i> p.(Arg326Gln); <i>TTN</i> p.(Pro30726Ser); <i>TTN</i> p.(Ala10827Val); <i>TTN</i> p.(Val5060Leu)
3	<i>ABCG8</i> p.(Ser241Phe); <i>ANK2</i> p.(Glu3931Lys); <i>APOB</i> p.(Ser4430Thr); <i>BRAF</i> p.(Ser607Phe); <i>CSRP3</i> p.(Gly70Trp); <i>DSP</i> p.(Arg889Lys); <i>FHL2</i> p.(Arg113Cys); <i>KCNH2</i> p.(Arg892Cys); <i>LMF1</i> c.879-1337C>T; <i>MURC</i> p.(Pro327His); <i>TTN</i> p.(Asn7744Lys); <i>TTN</i> p.(Asn4657His); <i>TTN</i> p.(Pro20274Leu); <i>TTN</i> p.(Glu11416del)
4	<i>MYBPC3</i> p.(Ser217Gly); <i>TRPM4</i> p.(Arg252His)
5	<i>CBS</i> p.(Arg45Trp); <i>LAMP2</i> p.(Val391Ile); <i>TTN</i> p.(Arg32748Cys); <i>TTN</i> p.(Arg3120Gln); <i>TTN</i> p.(His10092Tyr)
6	<i>ALMS1</i> p.(Glu1355Asp); <i>APOB</i> p.(Asp1113His); <i>FBNI</i> p.(Thr1020Ala); <i>NOTCH1</i> p.(Arg621His); <i>RBM20</i> p.(Tyr229Cys); <i>TTN</i> p.(Val5435Met); <i>TTN</i> p.(Pro4995Arg); <i>TTN</i> p.(Ile2986Thr)
7	<i>DSC2</i> p.(Ala897Lysfs); <i>LMF1</i> c.879-1201G>A; <i>RYR2</i> p.(Asn3308Ser); <i>SDHA</i> p.(Val461Phe); <i>TRPM4</i> p.(Pro1204Leu); <i>TTN</i> p.(Leu26799Arg); <i>TTN</i> p.(Ser31002Ile)
8	<i>ACTA1</i> p.(Tyr220His); <i>DSC2</i> p.(Ala897Lysfs); <i>FBN2</i> p.(Gly531Ala); <i>SNTA1</i> p.(Ala263Ser); <i>TMEM43</i> c.13-519G>A; <i>TTN</i> p.(Tyr5683Cys); <i>TTN</i> p.(Val8322Leu)
9	<i>COL5A2</i> p.(Thr1230Arg); <i>DSP</i> p.(Val30Met); <i>RYR2</i> p.(Val4653Ile); <i>TTN</i> p.(Cys5387Tyr); <i>ZHX3</i> p.(Glu671Lys)
10	<i>APOB</i> p.(Glu2566Lys); <i>JUP</i> p.(Asn425Asp); <i>PKP2</i> p.(Ala372Pro); <i>SCN1B</i> p.(Arg214Gln); <i>TRPM4</i> p.(Arg252His); <i>TTN</i> p.(Ser24535Tyr); <i>TTN</i> p.(Val32324Ala)
11	<i>AKAP9</i> p.(Met3614Val); <i>ALMS1</i> p.(Asn2944Lys); <i>APOA4</i> p.(Ala161Ser); <i>GAA</i> p.(Pro493Leu); <i>LAMA2</i> p.(Cys3087Ser)
12	<i>ACTN2</i> p.(Arg298His); <i>ANK2</i> p.(Val3634Asp); <i>CALR3</i> p.(Glu383Lys); <i>LAMA2</i> p.(Thr2895Ser); <i>LDLRAP1</i> p.(Glu33Lys); <i>NOTCH1</i> p.(Gly842del); <i>SCN5A</i> p.(Pro2006Ala); <i>TRIM63</i> p.(Glu269Lys); <i>TTN</i> p.(Leu10784Val); <i>TTN</i> p.(Lys18518Arg); <i>TTN</i> p.(Glu35527Val); <i>TTN</i> p.(Lys4646Glu); <i>TTN</i> p.(Val29796Met); <i>TTN</i> p.(Gly7058Asp); <i>TTN</i> p.(Thr21820Ile); <i>TTN</i> p.(Ser23226Gly); <i>TTN</i> p.(Arg15908His); <i>TTN</i> p.(Arg31748Cys); <i>TTN</i> p.(Ile31757Thr)

V rámci programu VarAFT byl využit prediktivní nástroj UMD-Predictor, který vybrané varianty klasifikoval do kategorií: polymorfni, pravděpodobně polymorfni, pravděpodobně patogenní, patogenní a varianty neklasifikované. 22 variant bylo označeno jako polymorfni, 17 variant bylo klasifikováno jako pravděpodobně polymorfni, 11 variant bylo pravděpodobně patogenních, 33 variant bylo označeno jako patogenní a 8 variant nebylo klasifikováno.

K hodnocení nalezených variant byly kromě predikce pomocí nástroje UMD-Predictor využity i další data a informace, které program VarAFT poskytuje, zejména údaje uvedené v databázi ClinVar a populační frekvence varianty. 12 variant bylo vyhodnoceno jako benigní, 23 variant bylo označeno jako pravděpodobně benigní, 1 varianta jako pravděpodobně patogenní (*GAA* p.(Pro493Leu)) a 55 variant bylo neznámého významu.

Většina nalezených variant se shodovala s výsledky z programu Variant Studio, ale některé genové varianty byly pro oba programy specifické. Například v programu VarAFT byla navíc zobrazena varianta *TTN* p.(Val8322Leu) u pacienta 8, kdežto Variant Studio zobrazoval u pacienta 8 navíc variantu *TTN* p.(Arg34859Gln).

7. 2. 4 MOLDIMED

Za účelem dalšího srovnání byl k anotaci a interpretaci variant použit analytický nástroj MOLDIMED, konkrétně pipeline 3, který umožnil zpracovat surová data ve formátech FASTQ a provést klinickou anotaci. Do zpracování byl vložen sample sheet s identifikacemi vzorků a označením fenotypu. K analýze byly použity výstupní data již filtrovaná na základě klinického fenotypu (*basic_filtered_clin_phenotype.csv*). Nastavený filtr zobrazoval varianty s populační frekvencí <1 % uvedenou v databázi ExAC a byl zvolen fenotyp dilatační kardiomyopatie (HP:0001644). Dalším kritériem byl poškozující efekt zaznamenaný alespoň v jednom z použitých prediktorů, SIFT a PolyPhen. Celkem bylo nalezeno 39 genových variant, z toho 14 indel variant a 25 jednonukleotidových variant. Žádná z nalezených variant nebyla systémem vyhodnocena jako patogenní. Nalezené genové varianty u jednotlivých pacientů jsou uvedeny v **Tabulce č. 19**. Varianta p.Pro526del v genu *ALMS1* byla nalezena u 75 % vzorků a byla označena za artefakt. U pacientů 4 a 9 byly nalezeny pouze artefakty. Většina nalezených variant byla shodná s výsledky programů Variant Studio a VarAFT nebo alespoň s jedním z nich. Výjimku tvořila varianta *ALMS1* p.(Glu29_Ala30insGlu) u pacienta 1, 8 a 11, varianta *ALMS1* p.(Ser2102Leu) u pacienta 3 a varianta *TTN* p.(Thr25821Lys) u pacienta 12.

Tabulka č. 19: Nalezené genové varianty u jednotlivých pacientů analyzovány programem MOLDIMED: nesynonymní varianty s populační frekvencí <1 % asociované s fenotypem dilatační kardiomyopatie; označení * představuje přítomnost artefaktu *ALMS1* p.(Pro526del).

Pacient	Nalezené genové varianty
1	<i>ALMS1</i> p.(Glu29_Ala30insGlu); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TTN</i> p.(Arg28474ValfsTer15)
2	<i>CRYAB</i> p.(Pro39Leu); <i>LDB3</i> p.(Gln517Pro); <i>TTN</i> p.(Pro30726Ser); *
3	<i>ALMS1</i> p.(Ser2102Leu); <i>CSRP3</i> p.(Gly70Trp); <i>FHL2</i> p.(Arg113Cys); *
4	*
5	<i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TTN</i> p.(Arg3120Gln); *
6	<i>ALMS1</i> p.(Glu1355Asp); <i>RBM20</i> p.(Tyr229Cys); <i>TTN</i> p.(Ile2986Thr); *
7	<i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>SDHA</i> p.(Val461Phe); <i>TTN</i> p.(Leu26799Arg); <i>TTN</i> p.(Ser31002Ile); <i>TTN</i> p.(Glu12487Asp); *
8	<i>ALMS1</i> p.(Glu29_Ala30insGlu); <i>ACTA1</i> p.(Tyr220His);
9	*
10	<i>JUP</i> p.(Asn425Asp); <i>TTN</i> p.(Ser24535Tyr); <i>TTN</i> p.(Val32324Ala); *
11	<i>ALMS1</i> p.(Glu29_Ala30insGlu); *
12	<i>ACTN2</i> p.(Arg298His); <i>SDHA</i> p.(Tyr629Phe); <i>TTN</i> p.(Ile31757Thr); <i>TTN</i> p.(Thr25821Lys); *

7. 2. 5 Cardio Classifier a ClinGen

VCF soubory byly také analyzovány pomocí online dostupného nástroje Cardio Classifier (Whiffin *et al.* 2017). Na základě doporučených postupů ACMG/AMP (Richards *et al.*, 2015) hodnotí nalezené varianty v genech asociovaných se srdečními chorobami. Byly vyhodnoceny pouze varianty v genech souvisejících s fenotypem dilatační kardiomyopatie. Žádná z nalezených variant nebyla klasifikována jako patogenní. Celkem bylo nalezeno 346 benigních variant a 37 variant s nejistým významem. Pouze u pacienta 1 byla nalezena varianta p.Arg28474ValfsTer15 v genu *TTN*, která byla zhodnocena jako pravděpodobně patogenní.

Některé vybrané genové varianty byly také hodnoceny nástrojem ClinGen (Patel *et al.*, 2017). K hodnocení patogenity však bylo k dispozici málo důkazů a varianty byla klasifikovány jako varianty s nejistým významem.

7. 2. 6 Vybrané kandidátní genové varianty

Na základě informací, které poskytly všechny použité nástroje pro anotaci a interpretaci variant, byly vybrány kandidátní genové varianty, které by mohly být potenciálně patogenní a souviset s rozvojem dilatační kardiomyopatie. Byly vyfiltrovány nesynonymní varianty s populační frekvencí <1 % a varianty pouze v genech, které jsou asociovány s dilatační

kardiomyopatií (HP:0001644). U některých pacientů byly do analýzy zařazeny i geny související s rozvojem podobného fenotypu. U pacienta 4 to byl *TRPM4* asociovaný s progresivní familiární srdeční blokádou (HP:0001626), u pacienta 5 gen *CBS* spojovaný s infarktem myokardu (HP:0001658) a u pacienta 11 gen *LAMA2* související obecně s kardiomyopatií (HP:0001638). Dalším kritériem pro výběr kandidátních variant bylo hodnocení predikčními nástroji CADD, DANN, Eigen, FATHMM, GERP++, LRT, MetaLR, MetaSVM, Mutation Taster, Mutation Assessor, PolyPhen2, Provean, SIFT, UMD-Predictor a VESST3. Hodnoty poskytnuté z jednotlivých nástrojů byly normalizovány pomocí standardizace na maximum sloupce, kdy jsou všechny hodnoty v sloupci poděleny maximální hodnotou sloupce (Haruštiaková *et al.*, 2012). Byly brány v úvahu všechny varianty u všech pacientů. V případě, že se zde objevovaly hodnoty záporné, byla nejnižší záporná hodnota v sloupci přičtena ke všem hodnotám přítomným ve sloupci. U některých použitých predikčních nástrojů nebylo k dispozici skóre, ale pouze jejich slovní hodnocení varianty. V případě, že byla varianta hodnocena jako deleterious, tedy škodlivá, byla přiřazena hodnota 1 a v případě hodnocení jako benign nebo tolerated, tedy benigní, byla přiřazena hodnota 0. Bylo tak určeno průměrné predikční skóre, jehož rozsah byl 0-1, kdy hodnoty blízké 1 představovaly škodlivé varianty. Tabulka zobrazující skóre jednotlivých predikčních nástrojů u variant vybraných na základě populační frekvence <1 % a fenotypu je uvedena v **Příloze č. 3**, kde jsou jednotlivé varianty seřazeny sestupně podle průměrného predikčního skóre v rámci pacienta.

Na základě tohoto skóre byly vybrány potenciálně patogenní varianty. Tyto vybrané varianty by mohly být předmětem dalšího výzkumu. Vytipované kandidátní genové varianty u jednotlivých pacientů jsou zaznamenány v **Tabulce č. 20**. Celkem bylo vytipováno 20 variant, z nichž 5 nebylo dosud zaznamenáno v žádné databázi a u zbylých 15 variant je jejich význam neznámý nebo jsou uvedeny s konfliktní interpretací patogenity.

Tabulka č. 20: Vybrané kandidátní potenciálně patogenní genové varianty u jednotlivých pacientů, jejich průměrné predikční skóre a populační frekvence: průměrná populační frekvence získána z hodnot uvedených v databázi gnomAD a 1000 Genomes.

Pacient	Gen	Varianta	Průměrné predikční skóre	Průměrná populační frekvence
1	<i>TTN</i>	p.Arg28474ValfsTer15	-	-
2	<i>CRYAB</i>	p.Pro39Leu	0.84	0.0002
	<i>TTN</i>	p.Pro30726Ser	0.83	0.002298
3	<i>FHL2</i>	p.Arg113Cys	0.97	0.0004
	<i>CSRP3</i>	p.Gly70Trp	0.95	3.25e-05
4	<i>MYBPC3</i>	p.Ser217Gly	0.59	0.001849
5	<i>CBS</i>	p.Arg45Trp	0.81	0.001249
	<i>TTN</i>	p.Arg32748Cys	0.71	0.002599
6	<i>RBM20</i>	p.Tyr229Cys	0.84	-
	<i>TTN</i>	p.Ile2986Thr	0.61	0.000102
7	<i>SDHA</i>	p.Val461Phe	0.88	-
	<i>TTN</i>	p.Leu26799Arg	0.85	4.08e-06
8	<i>ACTA1</i>	p.Tyr220His	0.94	-
9	<i>RYR2</i>	p.Val4653Ile	0.81	1.67e-05
	<i>TTN</i>	p.Cys5387Tyr	0.46	0.002099
10	<i>JUP</i>	p.Asn425Asp	0.72	-
	<i>TTN</i>	p.Ser24535Tyr	0.69	0.00035
11	<i>LAMA2</i>	p.Cys3087Ser	0.95	4.06e-06
12	<i>TTN</i>	p.Ile31757Thr	0.64	0.0004
	<i>ACTN2</i>	p.Arg298His	0.61	0.00035

7.3 Navržení primerů a validace vybraných nalezených variant

Z vytipovaných kandidátních variant byly zvoleny 4 varianty a na úseky sekvence s těmito variantami byla navrženy primery pomocí online nástroje Primer3. Vybrané varianty a sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v *Tabulce č. 21*.

Tabulka č. 21: Vybrané varianty a sekvence navržených primerů

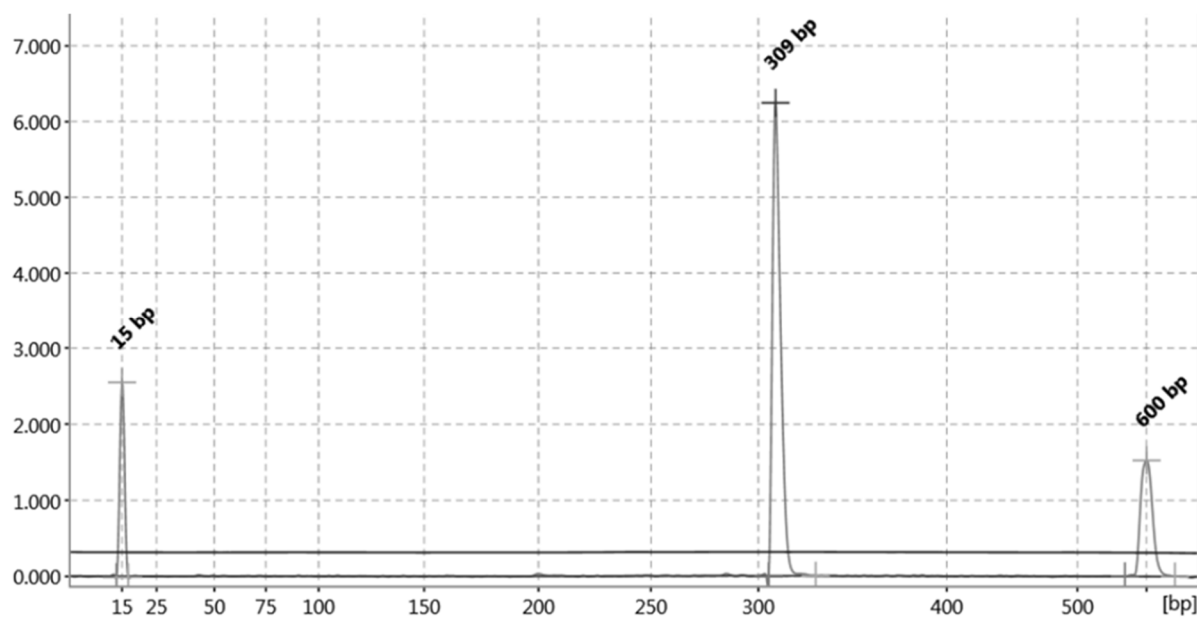
Pacient	Gen	Pozice varianty	Forward primer	Reverse primer
2	<i>CRYAB</i>	chr11:111782333	GTCCAGTGTCAAACCAGCTG	ACCCCTGACATCACCATTCC
3	<i>CSRP3</i>	ch11:19209756	AGTCCATTCTCCCACTTCCA	CCAATCCCATGACCCTTCCT
6	<i>RBM20</i>	ch10:112541053	CATGAACCTTCCCAACCAGC	TTGGAAAAGGCAGCTTGACC
10	<i>JUP</i>	ch17:39919459	CTCGCCTAACAGCAGTACCT	CCTGGAGAGTGTGCTGAAGA

Po provedení PCR amplifikace byla kvalita PCR produktů ověřena pomocí přístroje Qiaxcel za použití QIAxcel DNA High Resolution kitu, kde bylo zjištěno, že velikost PCR

produktu odpovídala očekávané situaci (viz *Tabulka č. 22*). Příklad elektroforetogramu provedené elektroforézy PCR produktu je zobrazen na *Obrázku č. 5*. Koncentrace PCR produktů byla po přečištění na koloně pomocí kitu QIAquick PCR Purification zjištěna fluorometrickým měřením na přístroji Qubit 2.0 s použitím Qubit® dsDNA BR Assay kitu. Následně bylo 50 ng jednotlivých PCR produktů smícháno s forward a reverse primery a doplněno deionizovanou vodou do 10 µl. Složení směsi určené pro sekvenování firmou SEQme je zaznamenáno v *Tabulce č. 23*.

Tabulka č. 22: Velikosti očekávaných PCR produktů s vybranými variantami

Pacient	Gen	Pozice produktu	Velikost produktu
2	<i>CRYAB</i>	chr11:111782256+111782563	308 bp
3	<i>CSRP3</i>	chr11:19209580+19209882	303 bp
6	<i>RBM20</i>	chr10:112540916+112541206	291 bp
10	<i>JUP</i>	chr17:39919217+39919568	352 bp

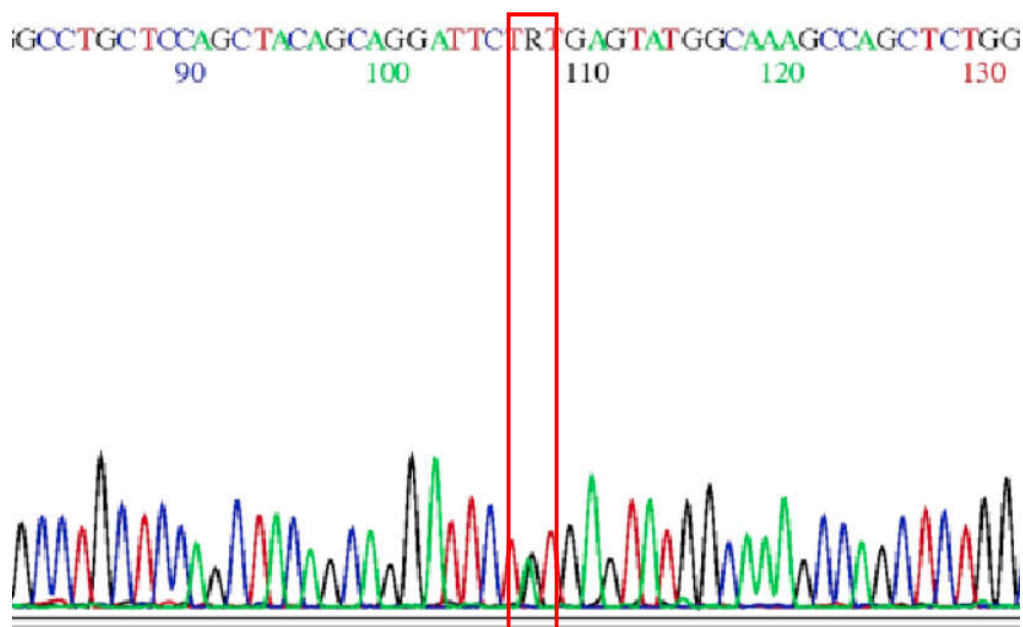


Obrázek č. 5: Příklad elektroforetogramu provedené elektroforézy PCR produktu pomocí přístroje Qiaxcel za použití QIAxcel DNA High Resolution kitu: osa x – velikosti fragmentů DNA v bp; osa y – počet daných fragmentů; nejvýraznější pik představuje PCR produkt o velikosti 309 bp.

Tabulka č. 23: Koncentrace PCR produktů s vybranými variantami

Pacient	Gen	Koncentrace v ng/µl	Objem obsahující 50 ng PCR produktu (µl)	Objem 10µM forward/reverse primeru	Objem deionizované H ₂ O
2	<i>CRYAB</i>	19.9	2.51	2,5	4.99
3	<i>CSRP3</i>	21.8	2.29	2,5	5.21
6	<i>RBM20</i>	17.5	2.86	2,5	4.64
10	<i>JUP</i>	27.2	1.84	2,5	5.66

V rámci výsledků sekvenování byly firmou SEQme poskytnuty výsledné chromatogramy a samotné pořadí detekovaných nukleotidů. Příklad dodaného chromatogramu ze sekvenování je zobrazen na **Obrázku č. 6**. Z chromatogramu vyplývá, že v analyzované oblasti genu *RBM20* u pacienta 6 se v konkrétní pozici nachází R, tedy A nebo G. Pozice variant a části sekvencí jednotlivých genů s validovanými variantami jsou uvedeny v **Tabulce č. 24**.



Obrázek č. 6: Výsledný chromatogram ze sekvenování PCR produktu obsahujícího část genu *RBM20* s nalezenou variantou v pozici *ch10:112541053*: červeně je ohraničen signál odpovídající přítomným nukleotidům A a G

Tabulka č. 24: Pozice vybraných variant a části sekvencí jednotlivých genů s validovanými variantami: S = C/G, M = A/C, R = A/G, Y = C/T

Gen	Pozice varianty	Část sekvence referenčního genomu	Část sekvence přítomné u pacienta
<i>CRYAB</i>	chr11:111782333	AGTAGACGTC[G]GGAAAAGATC	AGTAGACGTC[S]GGAAAAGATC
<i>CSRP3</i>	ch11:19209756	TACCCGATCC[C]TTTGGGGCCA	TACCCGATCC[M]TTTGGGGCCA
<i>RBM20</i>	ch10:112541053	GCAGGATTCT[A]TGAGTATGGC	GCAGGATTCT[R]TGAGTATGGC
<i>JUP</i>	ch17:39919459	AGCGTCTTGT[T]CTTGCTGTTG	AGCGTCTTGT[Y]CTTGCTGTTG

Výsledné chromatogramy ze Sangerova sekvenování potvrzovaly varianty nalezené pomocí technologie NGS. Validace variant v případě použití NGS nebyla sice nutná, jelikož se jedná o spolehlivou metodu za podmínky dodržení striktních kritérií kvality, nicméně analýza Sangerovým sekvenováním dokazuje jeho možnost využití pro genotypizaci dalších členů rodiny.

8 DISKUZE

Klastrování v rámci sekvenování bylo relativně vysoké a činilo $1,040 \pm 15$ tisíc klastrů/mm². Podle specifikací použitého kitu daných výrobcem by se měla hustota klastrů pohybovat v rozmezí 865-965 tisíc klastrů/mm². Pro snížení hustoty klastrů by bylo vhodné snížit koncentraci sekvenované DNA knihovny. Vyšší hustota klastrů však nijak nesnižovala kvalitu sekvenačních dat.

K anotaci a interpretaci nalezených variant byly použity různé anotační programy. Prvním z nich byl program Variant Studio v3.0 od firmy Illumina, který je uživatelům k dispozici při využití některého z jejich sekvenačních kitů. Tento program je však nutné instalovat a je zapotřebí stažení fixní databáze, která však nepodléhá aktualizacím. K anotaci jsou využívány datové zdroje, jako jsou databáze 1000 Genomes, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), ClinVar, National Center for Biotechnology (NCBI), National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), UCSC a Variant Effect Predictor (VEP). Zobrazení tohoto programu je přehledné a práce s ním je jednoduchá. Jsou zde uvedeny užitečné informace o populačních frekvencích variant, asociovaném fenotypu a významu hodnocení z databáze ClinVar spolu s dostupnými odkazy na tyto zdroje. Výhodou je i zobrazení více vzorků najednou, umožňující jednoduché porovnávání, a také možnost analýzy na základě rodinné filtrace a způsobu dědičnosti. Z predikčních nástrojů jsou zde uvedena hodnocení pouze programu SIFT a PolyPhen.

Velmi podobným anotačním systémem je online dostupný Variant Interpreter, taktéž od firmy Illumina. Představuje jednoduchý a rychlý nástroj pro anotaci a interpretaci genových jednonukleotidových variant, delecí a inzercí, strukturních genetických variant a variability v počtu kopií (CNV). Pro anotaci jsou využívány databáze dbSNP, COSMIC, ClinVar, 1000 Genomes, NHLBI EVS a ExAC. Každých 6 měsíců jsou tyto anotační zdroje aktualizovány. Kromě informací o populační frekvenci varianty poskytuje informace o počtu již hlášených případů konkrétní varianty a jejich hodnocení, a to z databáze ClinVar a soukromé databáze BaseSpace Knowledge Network. Výhodou je i možnost jednoduchého vizuálního zobrazení varianty nástrojem Integrative Genome Viewer (IGV), zejména v případě strukturních variant a CNV. Pro predikci patogenity jsou opět uvedena pouze hodnocení nástrojů SIFT a PolyPhen.

Dalším použitým nástrojem byl program VarAFT, který je zdarma ke stažení. Je však potřebná instalace a bylo nutné provést stažení databází GnomAD (The Genome Aggregation Database), dbSNP a 1000 Genomes, které bylo relativně zdlouhavé, ale navíc umožňoval

i stažení databáze Kaviar (Known VARIants), The Haplotype Reference Consortium (HRCR) a Great Middle East (GME). K anotaci genových variant byl použit nástroj ANNOVAR. Jako předěšlé programy i VarAFT poskytuje informace o populační frekvenci, případech uvedených v databázi ClinVar, asociovaném fenotypu, doplňující informace o genech a další. Program také umožňuje srovnání více vzorků pro analýzu způsobu dědičnosti v rodinně. V rámci tohoto programu je predikce patogenity hodnocena nástrojem UMD-Predictor, který kombinuje různé algoritmy a spojuje údaje o lokalizaci varianty v rámci proteinu, konzervativnost, biochemické vlastnosti, možný dopad změny na mRNA a také frekvenci varianty v globální populaci. Výhodou je také velké množství dalších predikčních nástrojů. Kromě programu SIFT a PolyPhen je zde k dispozici například i hodnocení programů Mutation Taster, Provean nebo CADD (Combined Annotation Dependent Depletion). Tyto a další nástroje pro predikci patogenity byly využity jako kritérium pro výběr kandidátních variant. Hodnoty skóre uvedených nástrojů byly normalizovány a bylo získáno průměrné predikční skóre. Program VarAFT umožnil také jednoduchou filtraci na základě fenotypu pomocí The Human Phenotype Ontology (HPO).

Všechny tyto použité programy poskytly jednoduchý a účinný filtr pro výběr zájmových variant. Umožňují filtraci na základě typu a umístění varianty, populační frekvence, asociovaného fenotypu a také na základě kvality sekvenčních dat.

Pro další srovnání byl použit pro anotaci a interpretaci variant i analytický nástroj MOLDIMED. Tento systém zpracovává surová sekvenční data ve formátu FASTQ a poskytuje jednoduchou identifikaci patogenních variant. Varianty jsou filtrovány na základě fenotypu a nízké frekvence v populaci. Poskytuje základní informace o nalezených variantách, ale prohlížení je relativně nepřehledné a pro získání dalších informací chybí odkazy na dostupné databáze. Pro analýzu genových variant u dilatační kardiomyopatie, kdy existuje velké množství variant s neznámým významem a je potřeba důkladný výběr kandidátních variant, je méně vhodný. Nastavení tohoto programu je více rigidnější. Nelze například přenastavit filtr populační frekvence <1% a v případě filtrování na základě přenastavení jiného fenotypu, je nutné analýzu spustit znova.

I přesto, že výsledky ze všech použitých programů byly velmi podobné, objevily se i odlišnosti. Například programem Variant Studio byla zobrazena varianta p.Tyr629Phe v genu *SDHA*, a to u pacientů 1, 5, 7 a 12. Tyto varianty však nebyly zobrazeny programy Variant Interpreter a VarAFT. Podobným příkladem je i varianta p.Glu28dup v genu *ALMS1*, která byla nalezena u 6 pacientů, a varianta p.Leu23dup v genu *PCSK9* u 4 pacientů. Analytickým nástrojem MOLDIMED byla zase nalezena varianta p.Pro526del v genu *ALMS1* u celkem

10 pacientů, která nebyla zobrazena žádným z předchozích programů. S největší pravděpodobností se však jednalo o artefakty a rozdílné výsledky použitých programů byly patrně způsobeny odlišným nastavením vnitřního filtru kvality.

Programem MOLDIMED bylo odfiltrováno větší množství variant, a to zejména z toho důvodu, že je v programu nastaveno kritérium poškozujícího efektu zaznamenaného alespoň jedním z použitých predikčních nástrojů. Většina z nalezených variant však patřila mezi vybrané kandidátní varianty. Výjimku tvořila varianta p.Arg45Trp v genu *CBS* u pacienta 5 a varianta p.Cys3087Ser v genu *LAMA2* u pacienta 11. Tyto varianty však nemohly být zobrazeny, protože jsou asociovány s odlišným fenotypem. I přesto však nebyly programem MOLDIMED zaznamenány varianty *MYBPC3* p.(Ser217Gly) u pacienta 4, *TTN* p.(Arg32748Cys) u pacienta 5 a varianty *RYR2* p.(Val4653Ile) a *TTN* p.(Cys5387Tyr) u pacienta 9, které byly zařazeny mezi kandidátní varianty.

Všechny vybrané kandidátní varianty filtrované pomocí programu VarAFT se nacházely také v programu Variant Studio s jedinou výjimkou varianty *TTN* p.(Cys5387Tyr) u pacienta 9.

Kromě artefaktů byly nalezeny i varianty, které z nějakého důvodu nebyly zobrazeny všemi použitými systémy. Odlišnosti byly zřejmě způsobeny filtrací na základě populační frekvence, jelikož programy někdy využívaly i jiné databáze nebo průměry těchto frekvencí. Pro komplexnější analýzu je proto výhodné kombinovat různé anotační nástroje, které poskytnou trochu odlišný pohled na věc. V případě použití v klinické diagnostice se jeví jako nejvhodnější nástroj VarAFT.

U pacienta 10 byla nalezena kombinace variant p.Asn425Asp v genu *JUP* a p.Ala372Pro v genu *PKP2*. U toho pacienta bylo již dříve provedeno genetické testování se stejným výsledkem za použití trochu odlišného kitu, což potvrzuje správnost analýzy (Vysloužilová, 2016).

U pacienta 11 byla nalezena varianta p.Pro493Leu v genu *GAA*, která byla zhodnocena jako pravděpodobně patogenní. Tento gen však není asociován s dilatační kardiomyopatií, ale s dědičnou metabolickou poruchou zvanou glykogenóza.

Z nalezených genových variant bylo vybráno 20 kandidátních potenciálně patogenních variant na základě populační frekvence, průměrného predikčního skóre a dříve publikované literatury. K hodnocení významu vybraných variant byly také použity obecné pokyny a postupy pro klinickou interpretaci sekvenčních variant publikované v roce 2015 ACMG/AMP (Richards *et al.*, 2015). Praktické použití těchto pokynů není jednoduché, a proto byl použit nástroj ClinGen, vytvořený americkým institutem NIH v roce 2015, který umožňuje uživatelům

zadat příslušné značení důkazů na základě pokynů ACMG/AMP a generovat hodnocení patogenity variant (Patel *et al.*, 2017). Dalším použitým nástrojem, který usnadňuje interpretaci variant na základě pokynů ACMG/AMP, je CardioClassifier specializovaný na hodnocení významu variant v genech spojených s dědičnými srdečními chorobami (Whiffin *et al.* 2017). Výhodou tohoto nástroje je, že dostupné a publikované důkazy doplňuje sám s možností vlastního vkládání. V současné době však umožňuje analyzovat pouze 40 genů asociovaných s 11 srdečními chorobami. Vzhledem k tomu, že většina analyzovaných genových variant nebyla dříve publikována, byly vybrané varianty interpretovány jako varianty s nejistým významem s výjimkou varianty v genu *TNN* u pacienta 1, která byla zhodnocena jako pravděpodobně patogenní. K dispozici byly bohužel pouze informace o populační frekvenci a hodnocení predikčními nástroji. To podporuje fakt, že pro určení relativního významu varianty je zásadní znalost rodinné anamnézy a společná segregace varianty u členů rodiny (McNally *et Puckelwartz*, 2015). Segregační analýza kandidátních variant, která by významně podpořila patogenitu varianty, je doporučována mnoha laboratořemi (Blue *et al.*, 2014; Parikh and Ashley, 2017). Dalším postupem pro získání více informací o významu varianty jsou funkční testy spojené s molekulárními mechanismy onemocnění, kdy je sledován biologický účinek *in vitro* nebo *in vivo* na zvířecích modelech. Bohužel vzhledem k časové a finanční náročnosti nejsou funkční testy zapojovány k diagnostice a jsou využívány pouze v některých případech v genetickém výzkumu (Kummeling *et al.*, 2015).

V roce 2017 provedl Brodehl *et al.* funkční testování za účelem zjištění molekulárního mechanismu nově nalezené varianty v genu *CRYAB*. Transfekovali C2C12 a HL-1 buňky expresními plazmidy, konkrétně pECFP-N1 (Clontech Laboratories), s cDNA wild-type α B-kryštalínu a dvou mutantních variant, nově nalezenou variantu p.D109G a dříve popsanou mutaci p.R120G. Vzorky byly označeny primárními protilátkami proti α B-kryštalínu s barvivou FITC a Cy3 a sledovány pomocí konfokálního mikroskopu. Bylo pozorováno, že wild-type α B-kryštalín byl rovnoměrně distribuován v cytoplazmě, zatímco obě mutantní formy tvořily cytoplazmatické proteinové agregáty. Tyto údaje tak odhalily vnitřní vadu způsobenou mutacemi vedoucí k akumulaci proteinu. Vzhledem k tomu, že i v našem případě byla nalezena genová varianta genu *CRYAB* s nejistým významem, konkrétně p.Pro39Leu, bylo by možné tento popsaný systém použít pro hodnocení významu i této varianty. K experimentu by bylo nutné získat komerčně dostupný lidský gen *CRYAB* již v expresním vektoru, například pMCSG7 (DNASU Plasmid Repository). K namnožení tohoto plasmidu by bylo nutné klonování do kompetentních buněk, například NEB® 5-alpha Competent *E. coli*. K cílené mutagenезi by bylo možné využít například Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England

BioLabs). Připravené vektory by poté byly transfekovány například do výše zmíněné linie myších myoblastů C2C12 nebo linie kardiomyocytů transgenických myší HL-1. Exprimovaný protein by byl označen specifickými protilátkami, například ABIN4280177 (antibodies-online.com) a vizualizován pomocí konfokálního mikroskopu. Bylo by sledováno, zda dochází k tvorbě proteinových agregátů nebo k rovnoměrné distribuci proteinu.

Další nalezenou genovou variantou, která by mohla být předmětem dalšího zkoumání, byla varianta p.Gly70Trp v genu *CSRP3*. V roce 2008 (Geier *et al.*) byla provedena studie zabývající se pravděpodobně mutantními variantami v tomto genu spojenými zejména s hypertrofickou kardiomyopatií. Byly provedeny *in vitro* i *in vivo* testy prostřednictvím transfekce neonatálních krysích kardiomyocytů a linie COS-1 buněk. Rekombinantní svalové LIM proteiny vybraných mutantních variant byly bakteriálně exprimovány, následně purifikovány a byla sledována stabilita proteinu v reakci s proteázou thermolysinem. Ve srovnání s wild-type byl mutantní protein méně stabilní a byl více náchylný k proteolytickému rozpadu v roztoku. V transfekovaných savčích buňkách byl také jeho obsah dramaticky snížen na asi 40 %. Z těchto funkčních experimentů vyplývá, že ne samotný mutantní protein, ale spíše relativní nedostatek funkčního svalového LIM proteinu způsobuje onemocnění.

Molekulární genetické testování bylo dříve používáno pouze jako výzkumný nástroj, ale v nedávné době vstoupilo toto testování do klinického diagnostického prostředí, zejména kvůli svému potenciálu poskytnout pacientovi a jeho rodině více individualizované poradenství (Jongbloed *et al.*, 2011). Genetické testování je nezbytným krokem zejména pro nalezení rizikových asymptomatických členů rodiny.

Ukázalo se, že technologie NGS je vhodnou metodou při identifikaci nových kauzálních mutací u onemocnění kardiovaskulárního systému, včetně dilatační kardiomyopatie (Faita *et al.*, 2012). NGS umožňuje provádět paralelní analýzu velkého počtu genů, které pravděpodobně přispívají k rozvoji onemocnění. Může být také užitečnou metodou při identifikaci vzácných variant v menších rodinách.

Poprvé byl cílený přístup NGS ve screeningu pacientů s dědičnou kardiomyopatií použit v roce 2011 (Meder *et al.*), kdy bylo analyzováno 47 genů u 10 pacientů s hypertrofickou a dilatační kardiomyopatií. Pro výběr cílených oblastí použili speciální microarray a pro sekvenaci použili metodu SOLiD. Tímto způsobem detekovali 27 nových potenciálně poškozujících mutací. Následně se metoda NGS začala využívat v klinické diagnostice kardiomyopatií (Punetha *et Hoffman*, 2013).

Skvělým příkladem toho, jaký měla metoda NGS vliv na objasnění genetického kontextu kardiomyopatie, byla studie z roku 2012 (Herman *et al.*), která popisovala detekci zkrácených variant titinu jako hlavní příčiny DCM. Herman *et al.* analyzovali úplnou sekvenci genu *TTN* u pacientů s DCM, s HCM a u kontrolní skupiny. Zkrácené varianty titinu, jako příčiny rozvoje DCM, byly nalezeny u 18 % sporadických idiopatických DCM a u 25 % rodinných případů. Dospělo se tak k závěru, že začlenění sekvenační analýzy *TTN* do genetického screeningu by mělo zvýšit citlivost genetického testování přibližně o 50 %. Tento závěr potvrdila i nezávislá studie v roce 2014 (Johnson *et al.*). Již dříve bylo známo, že mutace v *TTN* způsobují familiární DCM (Siu *et al.*, 1999; Gerull *et al.*, 2002), ale kvůli jeho velikosti nebyla analýza tohoto genu tradičním Sangerovým sekvenováním snadná a podrobnější informace o kauzalitě těchto variant nebyly dlouho známy.

V jedné z nejrozsáhlejších studií zabývajících se využitím genových sekvenačních panelů v kardiomyopatii bylo v průběhu 5 let geneticky testováno celkem 766 pacientů s DCM (Pugh *et al.*, 2014). Bylo analyzováno až 46 genů asociovaných s DCM a zvětšováním genových panelů se klinická citlivost pro diagnostiku DCM zvýšila více než třikrát, a to především kvůli zahrnutí genu *TTN*. Tento nárůst citlivosti byl však na úkor většího počtu pacientů s nejednoznačnými výsledky testování. V roce 2016 byla provedena studie u více než 1400 pacientů s kardiomyopatií, která se zaměřovala na detekci delecí a duplikací (Ceyhan-Birsoy *et al.*, 2015). I přesto, že byly v rámci tohoto testování identifikovány klinicky významné delece a duplikace u méně než 1 % pacientů, byl učiněn závěr, že zařazení analýzy delecí a duplikací nepředstavuje takovou výhodu a nemělo by výrazně navyšovat náklady a složitost jejího začlenění do rutinních diagnostických testů. Některé studie také zdůrazňují výhodnost metod NGS v klinické diagnostice a významnou roli výběru správného pacienta pro nákladově efektivnější testování (Cecconi *et al.*, 2016; Rubattu *et al.*, 2016).

Další studie, jejíž výsledky naznačují, že cílené genové sekvenování je proveditelným přístupem k identifikaci patogenních mutací u pacientů s DCM, byla realizována skupinou Zhao *et al.* (2015). Byla provedena analýza 21 jedinců čínské populace a bylo identifikováno celkem 12 pravděpodobně patogenních variant. I tato práce zdůrazňuje důležitost genetického testování, zejména pro prevenci a léčbu DCM před nástupem příznaků, a pro předpověď rizika onemocnění u dalších členů rodiny.

I v našem případě se ukázalo, že genetické testování za použití metod NGS může být úspěšně použito při identifikaci dilatační kardiomyopatie. V současné době je však interpretace nalezených genových variant složitá a velké množství variant bývá označeno jako s nejistým významem. Jednou z možností, jak přispět k objasnění významu genových variant, je *in vitro*

nebo *in vivo* funkční testování, které je však v mnoha případech složité. Jednodušším způsobem je proto segreganční analýza, která by výrazně podpořila patogenitu variant. V případě tedy, že by byli k dispozici minimálně 2 další členové rodiny, ideálně jeden člen se sledovaným fenotypem a jeden bez fenotypu, bylo by možné využít pro genotypizaci na kandidátní varianty jednoduché Sangerovo sekvenování s použitím navržených primerů u čtyř uvedených variant a analogicky postup využít i u dalších kandidátních variant. Ke komplexnější analýze je také důležitá kooperace DNA laboratoře s kardiologickými klinikami a oddělením lékařské genetiky.

9 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zabývala hodnocením významu genetických variant detekovaných sekvenováním nové generace při identifikaci dilatační kardiomyopatie. V teoretické části byla zpracována rešerše na téma kardiomyopatie, zaměřená na dilatační kardiomyopatii a její identifikaci zejména využitím sekvenování nové generace. Dále zde byla popsána problematika analýzy sekvenačních dat, především tedy interpretace genových variant a také problematika funkčních testů spojených s molekulárními mechanismy kardiomyopatií.

V experimentální části práce byla pomocí TruSight® Cardio Sequencing kitu provedena příprava DNA knihovny 12 vzorků pacientů s diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií a následná analýza sekvenování nové generace pomocí platformy Illumina na sekvenátoru MiSeq. Z nalezených variant bylo na základě populační frekvence, hodnocení predikčních nástrojů a již publikovaných případů vybráno 20 kandidátních variant, které by mohly být potenciálně patogenní a souviset s rozvojem dilatační kardiomyopatie. Pro konečnou interpretaci však bylo k dispozici málo informací a důkazů. Tyto vybrané varianty by proto měly být předmětem dalšího výzkumu.

10 LITERÁRNÍ ZDROJE

- Ackerman, M. J., Priori, S. G., Willems, S., Berul, C., Brugada, R., Calkins, H., ... Zipes, D. P. (2011). HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies: This document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*, 8(8), 1308-1339.
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., ... Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248-249.
- Amendola, L. M., Jarvik, G. P., Leo, M. C., McLaughlin, H. M., Akkari, Y., Amaral, M. D., ... Rehm, H. L. (2016). Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *The American Journal of Human Genetics*, 98(1), 1067-1076.
- Andreasen, C., Nielsen, J. B., Refsgaard, L., Holst, A. G., Christensen, A. H., Andreasen, L., ... Olesen, M. S. (2013). New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. *European Journal of Human Genetics*, 21(9), 918-928.
- Antonarakis, S. E., Beckmann, J. S. (2006). Mendelian disorders deserve more attention. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 277-282.
- Asimaki, A., Protonotarios, A., James, C. A., Chelko, S. P., Tichnell, C., Murray, B., ... Saffitz, J. E. (2016). Characterizing the molecular pathology of arrhythmogenic cardiomyopathy in patient buccal mucosa cells. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 9(2), e003688.
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 12(11), 745-755.
- Bean, L. J., Hegde, M. R. (2016). Gene Variant Databases and Sharing: Creating a Global Genomic Variant Database for Personalized Medicine. *Human Mutation*, 37(6), 559-563.
- Becane, H. M., Bonne, G., Varnous, S., Muchir, A., Ortega, V., Hammouda, E. H., ... Duboc, D. (2000). High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 23(11), 1661-1666.
- Bérout, C., Hamroun, D., Collod-Bérout, G., Boileau, C., Soussi, T., Claustres, M. (2005). UMD (Universal Mutation Database): 2005 update. *Human Mutation*, 26(3), 184-191.
- Biswas, A., Rao, V. R., Seth, S., Maulik, S. K. (2014). Next generation sequencing in cardiomyopathy: towards personalized genomics and medicine. *Molecular Biology Reports*, 41(8), 4881-4888.
- Blue, G. M., Kirk, E. P., Giannoulatou, E., Dunwoodie, S. L., Ho, J. W., Hilton, D. C., ... Winlaw, D. S. (2014). Targeted next-generation sequencing identifies pathogenic variants in familial congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(23), 2498-2506.
- Bond, J., Flintoff, K., Higgins, J., Scott, S., Bennet, C., Parsons, J., ... Woods, C. G. (2005). The importance of seeking ALMS1 mutations in infants with dilated cardiomyopathy. *Journal of Medical Genetics*, 42(2), e10.
- Brandão, K. O., Tabel, V. A., Atsma, D. E., Mummery, C. L., Davis, R. P. (2017). Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 10(9), 1039-1059.
- Brodehl, A., Gaertner-Rommel, A., Klauke, B., Grewe, S. A., Schirmer, I., Peterschröder, A., ... Milting, H. (2017). The novel α B-crystallin (CRYAB) mutation p.D109G causes restrictive cardiomyopathy. *Human Mutation*, 38(8), 947-952.
- Brown, T. A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis: An introduction* (7th ed.). Cambridge, MA: Wiley-Blackwell Pub.
- Burkett, E. L., Hershberger, R. E. (2005). Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(7), 969-981.
- Cecconi, M., Parodi, M. I., Formisano, F., Spirito, P., Autore, C., Musumeci, M. B., ... Coviello, D. A. (2016). Targeted next-generation sequencing helps to decipher the genetic and phenotypic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 1111-1124.

- Ceyhan-Birsoy, O., Pugh, T. J., Bowser, M. J., Hynes, E., Frisella, A. L., Mahanta, L. M., ... Funke, B. H. (2015). Next generation sequencing-based copy number analysis reveals low prevalence of deletions and duplications in 46 genes associated with genetic cardiomyopathies. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 4(2), 143-151.
- Chanavat, V., Seronde, M., Bouvagnet, P., Chevalier, P., Rousson, R., Millat, G. (2012). Molecular characterization of a large *MYBPC3* rearrangement in a cohort of 100 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European Journal of Medical Genetics*, 55(3), 163-166.
- Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J., Jegga, A. G. (2009). ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), W305-W311.
- Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE*, 7(10), e46688.
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., Izzo, N. J. (1998). HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2979-2984.
- D'Argenio, V., Frisso, G., Precone, V., Boccia, A., Fienga, A., Pacileo, G., ... Salvatore, F. (2014). DNA sequence capture and next-generation sequencing for the molecular diagnosis of genetic cardiomyopathies. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(1), 32-44.
- Dadson, K., Hauck, L., Billia, F. (2017). Molecular mechanisms in cardiomyopathy. *Clinical Science*, 131(13), 1375-1392.
- De Gonzalo-Calvo, D., Quezada, M., Campuzano, O., Perez-Serra, A., Broncano, J., Ayala, R., ... Toro, R. (2017). Familial dilated cardiomyopathy: A multidisciplinary entity, from basic screening to novel circulating biomarkers. *International Journal of Cardiology*, 228, 870-880.
- Den Boer, S. L., (Lennie) van Osch-Gevers, M., Van Ingen, G., Du Marchie Sarvaas, G. J., Van Iperen, G. G., Tanke, R. B., ... Dalinghaus, M. (2015). Management of children with dilated cardiomyopathy in The Netherlands: Implications of a low early transplantation rate. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34(7), 963-969.
- Du, C. K., Morimoto, S., Nishii, K., Minakami, R., Ohta, M., Tadano, N., ... Sasaguri, T. (2007). Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. *Circulation Research*, 101(2), 185-194.
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., ... Keren, A. (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, 29(2), 270-276.
- Fackenthal, D. L., Chen, P. X., Howe, T., Das, S. (2013). Denaturing high-performance liquid chromatography for mutation detection and genotyping. *Methods in Molecular Biology*, 1015, 25-54.
- Faita, F., Vecoli, C., Foffa, I., Andreassi, M. G. (2012). Next generation sequencing in cardiovascular diseases. *World Journal of Cardiology*, 4(10), 288-295.
- Fatkin, D., Graham, R. M. (2002). Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiological Reviews*, 82(4), 945-980.
- Fatkin, D., Huttner, I. G. (2017). Titin-truncating mutations in dilated cardiomyopathy: the long and short of it. *Current Opinion in Cardiology*, [Epub ahead of print].
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., ... McDonough, B. (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *New England Journal of Medicine*, 341(23), 1715-1724.
- Field, L. (1988). Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science*, 239(4843), 1029-1033.
- Frisso, G., Detta, N., Coppola, P., Mazzaccara, C., Pricolo, M., D'Onofrio, A., ... Salvatore, F. (2016). Functional Studies and *In Silico* Analyses to Evaluate Non-Coding Variants in Inherited Cardiomyopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), E1883.

- Frisso, G., Limongelli, G., Pacileo, G., Del Giudice, A., Forgione, L., Calabrò, P., ... Salvatore, F. (2009). A child cohort study from southern Italy enlarges the genetic spectrum of hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical Genetics*, 76(1), 91-101.
- Geier, C., Gehmlich, K., Ehler, E., Hassfeld, S., Perrot, A., Hayess, K., ... Özcelik, C. (2008). Beyond the sarcomere: *CSRP3* mutations cause hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 17(18), 2753-2765.
- Gerull, B. (2014). Skin-heart connection: What can the epidermis tell us about the myocardium in arrhythmogenic cardiomyopathy? *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(3), 225-227.
- Gerull, B., Gramlich, M., Atherton, J., McNabb, M., Trombitás, K., Sasse-Klaassen, S., ... Thierfelder, L. (2002). Mutations of *TTN*, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nature Genetics*, 30(2), 201-204.
- Girolami, F., Frisso, G., Benelli, M., Crotti, L., Iascone, M., Mango, R., ... Olivetto, I. (2018). Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 19(1), 1-11.
- Guo, W., Schafer, S., Greaser, M. L., Radke, M. H., Liss, M., Govindarajan, T., ... Gotthardt, M. (2013). *RBM20*, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing. *Nature Medicine*, 18(5), 766-773.
- Gupta, P., Bilinska, Z. T., Sylvius, N., Boudreau, E., Veinot, J. P., Labib, S., ... Tesson, F. (2010). Genetic and ultrastructural studies in dilated cardiomyopathy patients: a large deletion in the lamin A/C gene is associated with cardiomyocyte nuclear envelope disruption. *Basic Research in Cardiology*, 105(3), 365-377.
- Haas, J., Frese, K. S., Peil, B., Kloos, W., Keller, A., Nietsch, R., ... Meder, B. (2015). Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *European heart journal*, 36(18), 1123-1135a.
- Haghighi, K., Kolokathis, F., Gramolini, A. O., Waggoner, J. R., Pater, L., Lynch, R. A., ... Kranias, E. G. (2006). A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1388-1393.
- Harakalova, M., Kummeling, G., Sammani, A., Linschoten, M., Baas, A. F., Van der Smagt, J., ... Asselbergs, F. W. (2015). A systematic analysis of genetic dilated cardiomyopathy reveals numerous ubiquitously expressed and muscle-specific genes. *European Journal of Heart Failure*, 17(5), 484-493.
- Haruštiaková, D., Jarkovský, J., Littnerová, S., Dušek, L. (2012). *Vícerozměrné statistické metody v biologii*. Brno: Akademické nakladatelství CERM. ISBN 978-80-7204-791
- Herman, D. S., Lam, L., Taylor, M. R., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., ... Seidman, C. E. (2012). Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 366(7), 619-628.
- Hershberger, R. E., Morales, A. (2007). Dilated cardiomyopathy overview. [Updated 2015 Sep 24]. In: Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., *et al.*, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018
- Hershberger, R. E., Siegfried, J. D. (2011). Update 2011: Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(16), 1641-1649.
- Hershberger, R. E., Hedges, D. J., Morales, A. (2013). Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nature Reviews Cardiology*, 10(9), 531-547.
- Hershberger, R. E., Lindenfeld, J., Mestroni, L., Seidman, C. E., Taylor, M. R., Towbin, J. A., Heart Failure Society of America. (2009). Genetic Evaluation of Cardiomyopathy - A Heart Failure Society of America Practice Guideline. *Journal of Cardiac Failure*, 15(2), 83-97.
- Hershberger, R. E., Norton, N., Morales, A., Li, D., Siegfried, J. D., Gonzalez-Quintana, J. (2010). Coding sequence rare variants identified in *MYBPC3*, *MYH6*, *TPMI*, *TNNC1*, and *TNNI3* from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 3(2), 155-161.
- Hinson, J. T., Chopra, A., Nafissi, N., Polacheck, W. J., Benson, C. C., Swist, S., ... Seidman, C. E. (2015). HEART DISEASE. Titin mutations in iPSCs define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science*, 349(6251), 982-986.

- Inagaki, N., Hayashi, T., Arimura, T., Koga, Y., Takahashi, M., Shibata, H., ... Kimura, A. (2006). Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications*, 342(2), 379-386.
- Ingles, J., McGaughran, J., Scuffham, P., Atherton, J., Semsarian, C. (2012). A cost-effectiveness analysis of genetic testing in the evaluation of families with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 98(8), 625-630.
- Jamuar, S. S., Tan, E. (2015). Clinical application of next-generation sequencing for Mendelian diseases. *Human Genomics*, 9(1), 10.
- Johnson, R., Stockhammer, K., Soka, M., Ohanian, M., Lam, L., Fatkin, D. (2014). Truncating Titin mutations: Are they a primary cause of dilated cardiomyopathy or a susceptibility factor? *Heart, Lung and Circulation*, 23, e11-e12.
- Jongbloed, J. D., Pósfalvi, A., Kerstjens-Frederikse, W. S., Sinke, R. J., Van Tintelen, J. P. (2011). New clinical molecular diagnostic methods for congenital and inherited heart disease. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 5(1), 9-24.
- Kamisago, M., Sharma, S. D., DePalma, S. R., Solomon, S., Sharma, P., McDonough, B., ... Seidman, C. E. (2000). Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 343(23), 1688-1696.
- Kim, C., Wong, J., Wen, J., Wang, S., Wang, C., Spiering, S., ... Chen, H. V. (2013). Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*, 494(7435), 105-110.
- Kircher, M., Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6), 524-536.
- Kircher, M., Witten, D. M., Jain, P., O'Roak, B. J., Cooper, G. M., Shendure, J. (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nature Genetics*, 46(3), 310-315.
- Kirk, E. P., Sunde, M., Costa, M. W., Rankin, S. A., Wolstein, O., Castro, M. L., ... Harvey, R. P. (2007). Mutations in cardiac T-box factor gene *TBX20* are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 81(2), 280-291.
- Kirk, R., Naftel, D., Hoffman, T. M., Almond, C., Boyle, G., Caldwell, R. L., ... Pediatric Heart Transplant Study Investigators. (2009). Outcome of pediatric patients with dilated cardiomyopathy listed for transplant: A multi-institutional study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 28(12), 1322-1328.
- Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073-1081.
- Kummeling, G., Baas, A., Harakalova, M., Van der Smagt, J., Asselbergs, F. (2015). Cardiovascular genetics: technological advancements and applicability for dilated cardiomyopathy. *Netherlands Heart Journal*, 23(7-8), 356-362.
- Lakdawala, N. K., Dellefave, L., Sparks, E., Cirino, A., Depalma, S., Funke, B., ... Ho, C. Y. (2010). Familial dilated cardiomyopathy caused by an alpha-tropomyosin mutation: The distinctive natural history of sarcomeric dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(4), 320-329.
- Lakdawala, N. K., Funke, B. H., Baxter, S., Cirino, A. L., Roberts, A. E., Judge, D. P., ... Ho, C. Y. (2012). Genetic testing for dilated cardiomyopathy in clinical practice. *Journal of cardiac failure*, 18(4), 296-303.
- Lan, F., Lee, A., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P., Wang, L., ... Wu, J. (2013). Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(1), 101-113.
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., ... Maglott, D. R. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D862-D868.
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Riley, G. R., Jang, W., Rubinstein, W. S., Church, D. M., Maglott, D. R. (2014). ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D980-D985.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3), R25.
- Li, D., Liu, Y., Maruyama, M., Zhu, W., Chen, H., Zhang, W., ... Shou, W. (2011). Restrictive loss of plakoglobin in cardiomyocytes leads to arrhythmogenic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4582-4596.

- Li, H., Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009a). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, Q., Wang, K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP guidelines. *The American Journal of Human Genetics*, 100(2), 267-280.
- Li, R., Li, Y., Fang, X., Yang, H., Wang, J., Kristiansen, K., Wang, J. (2009b). SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. *Genome Research*, 19(6), 1124-1132.
- Li, X., Luo, R., Mo, X., Jiang, R., Kong, H., Hua, W., Wu, X. (2013). Polymorphism of *ZBTB17* gene is associated with idiopathic dilated cardiomyopathy: a case control study in a Han Chinese population. *European Journal of Medical Research*, 18(1), 10.
- Li, Y., Lang, P., Linke, W. A. (2016). Titin stiffness modifies the force-generating region of muscle sarcomeres. *Scientific Reports*, 6(1), 24492.
- Lin, F., Worman, H. J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *The Journal of biological chemistry*, 268(22), 16321-16326.
- Liu, G., Morales, A., Vafiadaki, E., Lam, C. K., Cai, W., Haghghi, K., ... Kranias, E. G. (2015). A novel human *R25C*-phospholamban mutation is associated with super-inhibition of calcium cycling and ventricular arrhythmia. *Cardiovascular Research*, 107(1), 164-174.
- Lund, L. H., Edwards, L. B., Kucheryavaya, A. Y., Benden, C., Dipchand, A. I., Goldfarb, S., ... Stehlik, J. (2015). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second official adult heart transplantation report—2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34(10), 1244-1254.
- Ma, D., Wei, H., Lu, J., Ho, S., Zhang, G., Sun, X., ... Liew, R. (2013). Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 34(15), 1122-1133.
- MacDonald, J. R., Ziman, R., Yuen, R. K., Feuk, L., Scherer, S. W. (2014). The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D986-D992.
- Malan, D., Zhang, M., Stallmeyer, B., Müller, J., Fleischmann, B. K., Schulze-Bahr, E., ... Greber, B. (2016). Human iPS cell model of type 3 long QT syndrome recapitulates drug-based phenotype correction. *Basic Research in Cardiology*, 111(2), 14.
- Martins, A. S., Parvatiyar, M. S., Feng, H., Bos, J. M., Gonzalez-Martinez, D., Vukmirovic, M., ... Pinto, J. R. (2015). *In vivo* analysis of troponin C knock-in (A8V) mice: evidence that *TNNC1* is a hypertrophic cardiomyopathy susceptibility gene. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(5), 653-664.
- McCartan, C., Mason, R., Jayasinghe, S. R., Griffiths, L. R. (2012). Cardiomyopathy classification: Ongoing debate in the genomics era. *Biochemistry Research International*, 2012, 1-10.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A., ... DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297-1303.
- McLaren, W., Pritchard, B., Rios, D., Chen, Y., Flicek, P., Cunningham, F. (2010). Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics*, 26(16), 2069-2070.
- McNair, W. P., Ku, L., Taylor, M. R., Fain, P. R., Dao, D., Wolfel, E., Mestroni, L., Familial Cardiomyopathy Registry Research Group. (2004). *SCN5A* mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*, 110(15), 2163-2167.
- McNally, E. M., Puckelwartz, M. J. (2015). Genetic variation in cardiomyopathy and cardiovascular disorders. *Circulation Journal*, 79(7), 1409-1415.

- McNally, E. M., Golbus, J. R., Puckelwartz, M. J. (2013). Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 19-26.
- Meder, B., Haas, J., Keller, A., Heid, C., Just, S., Borries, A., ... Rottbauer, W. (2011). Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 4(2), 110-122.
- Mestroni, L., Maisch, B., McKenna, W. J., Schwartz, K., Charron, P., Rocco, C., ... Komajda, M. (1999a). Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *European heart journal*, 20(2), 93-102.
- Mestroni, L., Rocco, C., Gregori, D., Sinagra, G., Di Lenarda, A., Miodini, S., ... Camerini, F. (1999b). Familial dilated cardiomyopathy: Evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *Journal of American College of Cardiology*, 34(1), 181-190.
- Michels, V. V., Moll, P. P., Miller, F. A., Tajik, A. J., Chu, J. S., Driscoll, D. J., ... Tazelaar, H. D. (1992). The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 326(2), 77-82.
- Míka, M. (2018, online) [navštíveno 15. března 2018]. Magazín. Retrieved. Dostupné z <https://www.seqme.eu/cs/magazine/data-analysis>
- Millat, G., Chanavat, V., Créhalet, H., Rousson, R. (2010). Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta*, 411(23-24), 1983-1991.
- Millat, G., Chanavat, V., Julia, S., Crehalet, H., Bouvagnet, P., Rousson, R. (2009). Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the LMNA gene. *Clinical Biochemistry*, 42(9), 892-898.
- Murphy, R. T., Mogensen, J., Shaw, A., Kubo, T., Hughes, S., McKenna, W. J. (2004). Novel mutation in cardiac troponin I in recessive idiopathic dilated cardiomyopathy. *The Lancet*, 363(9406), 371-372.
- Neveling, K., Feenstra, I., Gilissen, C., Hoefsloot, L. H., Kamsteeg, E. J., Mensenkamp, A. R., ... Nelen, M. R. (2013). A post-hoc comparison of the utility of Sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Human mutation*, 34(12), 1721-1726.
- New England Biolabs. (2018, online) [navštíveno 15. března 2018]. Site Directed Mutagenesis | NEB. Dostupné z <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/site-directed-mutagenesis>
- Ng, P. C. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3812-3814.
- Nonaka, M., Morimoto, S. (2014). Experimental models of inherited cardiomyopathy and its therapeutics. *World Journal of Cardiology*, 6(12), 1245-51.
- Norton, N., Li, D., Rieder, M., Siegfried, J., Rampersaud, E., Züchner, S., ... Hershberger, R. (2011). Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in *BAG3* as a cause of dilated cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 88(3), 273-282.
- Pan, S., Sommese, R. F., Sallam, K. I., Nag, S., Sutton, S., Miller, S. M., ... Ashley, E. A. (2015). Establishing disease causality for a novel gene variant in familial dilated cardiomyopathy using a functional *in-vitro* assay of regulated thin filaments and human cardiac myosin. *BMC Medical Genetics*, 16, 97.
- Parikh, V. N., Ashley, E. A. (2017). Next-generation sequencing in cardiovascular disease. *Circulation*, 135(5), 406-409.
- Patel, R. Y., Shah, N., Jackson, A. R., Ghosh, R., Pawliczek, P., ... ClinGen Resource. (2017). ClinGen Pathogenicity Calculator: a configurable system for assessing pathogenicity of genetic variants. *Genome Medicine*, 9(1), 3.
- Pepin, M. G., Murray, M. L., Bailey, S., Leistriz-Kessler, D., Schwarze, U., Byers, P. H. (2016). The challenge of comprehensive and consistent sequence variant interpretation between clinical laboratories. *Genetics in Medicine*, 18(1), 20-24.
- Pérez-Serra, A., Toro, R., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Berne, P., Iglesias, A., ... Brugada, R. (2015). A novel mutation in lamin A/C causing familial dilated cardiomyopathy associated with sudden cardiac death. *Journal of Cardiac Failure*, 21(3), 217-225.

- Pérez-Serra, A., Toro, R., Sarquella-Brugada, G., De Gonzalo-Calvo, D., Cesar, S., Carro, E., ... Campuzano, O. (2016). Genetic basis of dilated cardiomyopathy. *International journal of cardiology*, 224, 461-472.
- Pilichou, K., Bezzina, C. R., Thiene, G., Basso, C. (2011). Arrhythmogenic cardiomyopathy: Transgenic animal models provide novel insights into disease pathobiology. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(3), 318-326.
- Pinto, Y. M., Elliott, P. M., Arbustini, E., Adler, Y., Anastasakis, A., Böhm, M., ... Charron, P. (2016). Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *European Heart Journal*, 37(23), 1850-1858.
- Priori, S. G., Blomström-Lundqvist, C. (2015). 2015 European Society of Cardiology Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death summarized by co-chairs. *European heart journal*, 36(41), 2757-2759.
- Pua, C. J., Bhalshankar, J., Miao, K., Walsh, R., John, S., Lim, S. Q., ... Cook, S. A. (2016). Development of a comprehensive sequencing assay for inherited cardiac condition genes. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 9(1), 3-11.
- Pugh, T. J., Kelly, M. A., Gowrisankar, S., Hynes, E., Seidman, M. A., Baxter, S. M., ... Funke, B. H. (2014). The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genetics in Medicine*, 16(8), 601-608.
- Punetha, J., Hoffman, E. P. (2013). Short read (next-generation) sequencing: A tutorial with cardiomyopathy diagnostics as an exemplar. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 6(4), 427-434.
- Pyzocha, N. K., Ran, F. A., Hsu, P. D., Zhang, F. (2014). RNA-guided genome editing of mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, 1114, 269-277.
- Reva, B., Antipin, Y., Sander, C. (2011). Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Research*, 39(17), e118.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*, 17(5), 405-424.
- Roberts, A. M., Ware, J. S., Herman, D. S., Schafer, S., Baksi, J., Bick, A. G., ... Cook, S. A. (2015). Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Science translational medicine*, 7(270), 270ra6.
- Rook, M. B., Evers, M. M., Vos, M. A., Bierhuizen, M. F. (2012). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular Research*, 93(1), 12-23.
- Ruan, Y., Liu, N., Priori, S. G. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nature Reviews Cardiology*, 6(5), 337-348.
- Rubattu, S., Bozzao, C., Pennacchini, E., Pagannone, E., Musumeci, B., Piane, M., ... Chessa, L. (2016). A next-generation sequencing approach to identify gene mutations in early- and late-onset hypertrophic cardiomyopathy patients of an Italian cohort. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1239.
- Ruppert, V., Meyer, T., Struwe, C., Petersen, J., Perrot, A., ... German Heart Failure Network. (2010). Evidence for *CTLA4* as a susceptibility gene for dilated cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, 18(6), 694-699.
- Salgado, D., Desvignes, J., Rai, G., Blanchard, A., Miltgen, M., Pinard, A., ... Bérout, C. (2016). UMD-Predictor: A high-throughput sequencing compliant system for pathogenicity prediction of any human cDNA substitution. *Human Mutation*, 37(5), 439-446.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, 30(12), 57e.

- Schwarz, J. M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods*, 7(8), 575-576.
- Seliem, M. A., Mansara, K. B., Palileo, M., Ye, X., Zhang, Z., Benson, D. W. (2000). Evidence for autosomal recessive inheritance of infantile dilated cardiomyopathy: studies from the eastern province of Saudi Arabia. *Pediatric Research*, 48(6), 770-775.
- Shah, N., Hou, Y. C., Yu, H., Sainger, R., Dec, E., Perkins, B., ... Telenti, A. (2016). Identification of misclassified ClinVar variants using disease population prevalence. *bioRxiv* (15 September 2016).
- Sifrim, A., Popovic, D., Tranchevent, L., Ardeshirdavani, A., Sakai, R., Konings, P., ... Moreau, Y. (2013). eXtasy: variant prioritization by genomic data fusion. *Nature Methods*, 10(11), 1083-1084.
- Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L. F., De Boer, E. N., Almomani, R., Boven, L. G., Van den Berg, M. P., ... Sinke, R. J. (2013). Targeted next-generation sequencing can replace sanger sequencing in clinical diagnostics. *Human Mutation*, 34(7), 1035-1042.
- Siu, B. L., Niimura, H., Osborne, J. A., Fatkin, D., MacRae, C., Solomon, S., ... Seidman, C. E. (1999). Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. *Circulation*, 99(8), 1022-1026.
- Skutková, L., Humlová, D., Kadlecová, J. (2016). Aplikace molekulární diagnostiky kardiomyopatií v pediatrické praxi. *Kardiologická revue interní medicína*, 18(4), 268-271.
- Sommariva, E., Brambilla, S., Carbucichio, C., Gambini, E., Meraviglia, V., Dello Russo, A., ... Pompilio, G. (2015). Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy. *European Heart Journal*, 37(23), 1835-1846.
- Sommariva, E., Stadiotti, I., Perrucci, G. L., Tondo, C., Pompilio, G. (2017). Cell models of arrhythmogenic cardiomyopathy: advances and opportunities. *Disease Models & Mechanisms*, 10(7), 823-835.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A. D., Cooper, D. N. (2014). The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Human Genetics*, 133(1), 1-9.
- Sugrue, D. D. (1992). The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Annals of Internal Medicine*, 117(2), 117-123.
- Sukhai, M. A., Craddock, K. J., Thomas, M., Hansen, A. R., Zhang, T., Siu, L., ... Kamel-Reid, S. (2016). A classification system for clinical relevance of somatic variants identified in molecular profiling of cancer. *Genetics in Medicine*, 18(2), 128-136.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.
- Taylor, M. R., Fain, P. R., Sinagra, G., Robinson, M. L., Robertson, A. D., Carniel, E., ... Familial Dilated Cardiomyopathy Registry Research Group. (2003). Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(5), 771-780.
- Tesson, F., Saj, M., Uvaize, M. M., Nicolas, H., Płoski, R., Bilinska, Z. (2014). Lamin A/C mutations in dilated cardiomyopathy. *Cardiology Journal*, 21(4), 331-342.
- Tester, D. J., Will, M. L., Ackerman, M. J. (2006). Mutation detection in congenital long QT syndrome: cardiac channel gene screen using PCR, dHPLC, and direct DNA sequencing. *Methods in molecular medicine*, 128, 181-207.
- Tfelt-Hansen, J., Winkel, B. G., Grunnet, M., Jespersen, T. (2011). Cardiac channelopathies and sudden infant death syndrome. *Cardiology*, 119(1), 21-33.
- Towbin, J. A. (2010). Left Ventricular Noncompaction: A New Form of Heart Failure. *Heart Failure Clinics*, 6(4), 453-469.
- Tyska, M. J., Hayes, E., Giewat, M., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Warshaw, D. M. (2000). Single-molecule mechanics of r403q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Research*, 86(7), 737-744.

- Van Allen, E. M., Wagle, N., Stojanov, P., Perrin, D. L., Cibulskis, K., Marlow, S., ... Garraway, L. A. (2014). Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine. *Nature medicine*, 20(6), 682-688.
- Vysloužilová, L. (2016). Využití sekvenování nové generace pro identifikaci dědičných poruch způsobujících kardiomyopatie. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Walsh, R., Thomson, K. L., Ware, J. S., Funke, B. H., Woodley, J., McGuire, K. J., ... Watkins, H. (2017). Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genetics in Medicine*, 19(2), 192-203.
- Wang, H., Xi, Y., Zheng, Y., Wang, X., Cooney, A. J. (2016). Generation of electrophysiologically functional cardiomyocytes from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 16(2), 522-530.
- Wang, K., Li, M., Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 38(16), e164-e164.
- Ware, J. S., Li, J., Mazaika, E., Yasso, C. M., DeSouza, T., Cappola, T. P., ... IMAC-2 and IPAC Investigators. (2016). Shared genetic predisposition in peripartum and dilated cardiomyopathies. *The New England journal of medicine*, 374(3), 233-241.
- Whiffin, N., Walsh, R., Govind, R., Edwards, M., Ahmad, M., Zhang, X., ... Cook, S. A. (2017). CardioClassifier: demonstrating the power of disease- and gene-specific computational decision support for clinical genome interpretation. *Genetics In Medicine* 2018/01/25/online.
- Wittwer, C. T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 30(6), 857-859.
- Xiong, Q., Cao, Q., Zhou, Q., Xie, J., Shen, Y., Wan, R., ... Hong, K. (2015). Arrhythmogenic cardiomyopathy in a patient with a rare loss-of-function *KCNQ1* mutation. *Journal of the American Heart Association*, 4(1), e001526-e001526.
- Yandell, M., Huff, C., Hu, H., Singleton, M., Moore, B., Xing, J., ... Reese, M. G. (2011). A probabilistic disease-gene finder for personal genomes. *Genome Research*, 21(9), 1529-1542.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-20.
- Zhang, J., Wilson, G. F., Soerens, A. G., Koonce, C. H., Yu, J., Palecek, S. P., ... Kamp, T. J. (2009). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation research*, 104(4), e30-e41.
- Zhang, X. L., Qiu, X. B., Yuan, F., Wang, J., Zhao, C. M., Li, R. G., ... Yang, Y. Q. (2015). *TBX5* loss-of-function mutation contributes to familial dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(1), 166-171.
- Zhao, Y., Feng, Y., Zhang, Y. M., Ding, X. X., Song, Y. Z., Zhang, A. M., ... Xia, X. S. (2015). Targeted next-generation sequencing of candidate genes reveals novel mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(6), 1479-1486.
- Zimmerman, R. S., Cox, S., Lakdawala, N. K., Cirino, A., Mancini-Dinardo, D., Clark, E., ... Funke, B. H. (2010). A novel custom resequencing array for dilated cardiomyopathy. *Genetics in Medicine*, 12(5), 268-278.
- Zwi, L., Caspi, O., Arbel, G., Huber, I., Gepstein, A., Park, I. H., Gepstein, L. (2009). Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 120(15), 1513-23.

11 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Organizace kritérií podle typu a úrovně důkazu (Richards *et al.*, 2015)

	Benign		Pathogenic	
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate
	Strong	Supporting	Moderate	Very Strong
Population Data	MAF is too high for disorder <i>BA1/BS1</i> OR observation in controls inconsistent with disease penetrance <i>BS2</i>			
Computational And Predictive Data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product <i>BP4</i> Missense in gene where only truncating cause disease <i>BP1</i> Silent variant with non predicted splice impact <i>BP7</i>	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product <i>PP3</i>	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before <i>PM5</i> Protein length changing variant <i>PM4</i>
Functional Data	Well-established functional studies show no deleterious effect <i>BS3</i>		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common <i>PP2</i>	Well-established functional studies show a deleterious effect <i>PS3</i>
Segregation Data	Non-segregation with disease <i>BS4</i>		Co-segregation with disease in multiple affected family members <i>PP1</i>	Increased segregation data
De novo Data				<i>De novo</i> (without paternity & maternity confirmed) <i>PS2</i>
Allelic Data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant <i>BP2</i> Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant <i>BP2</i>		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant <i>PM3</i>
Other Database	Reputable source w/out shared data = benign <i>BP6</i>	Reputable source = pathogenic <i>PP5</i>		
Other Data	Found in case with an alternate cause <i>BP5</i>	Reputable source = pathogenic <i>PP5</i> Patient's phenotype or FH highly specific for gene <i>PP4</i>		

Příloha č. 2: Seznam genů analyzovaných kitem TruSight® Cardio Sequencing (Illumina)

Název genu	Název proteinu (angl.)
<i>ABCC9</i>	ATP binding cassette subfamily C member 9
<i>ABCG5</i>	ATP binding cassette subfamily G member 5
<i>ABCG8</i>	ATP binding cassette subfamily G member 8
<i>ACTA1</i>	actin, alpha 1, skeletal muscle
<i>ACTA2</i>	actin, aortic smooth muscle
<i>ACTC1</i>	actin, alpha cardiac muscle 1
<i>ACTN2</i>	alpha-actinin-2
<i>AKAP9</i>	a-kinase anchor protein 9
<i>ALMS1</i>	Alstrom syndrome protein 1
<i>ANK2</i>	ankyrin-2
<i>ANKRD1</i>	ankyrin repeat domain-containing protein 1
<i>APOA4</i>	apolipoprotein A-IV
<i>APOA5</i>	apolipoprotein A-V
<i>APOB</i>	apolipoprotein B
<i>APOC2</i>	apolipoprotein C-II
<i>APOE</i>	apolipoprotein E
<i>BAG3</i>	BAG family molecular chaperone regulator 3
<i>BRAF</i>	serine/threonine-protein kinase B-raf
<i>CACNA1C</i>	voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C
<i>CACNA2D1</i>	voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-1
<i>CACNB2</i>	voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-2
<i>CALM1</i>	calmodulin-1
<i>CALR3</i>	calreticulin-3
<i>CASQ2</i>	calsequestrin-2
<i>CAV3</i>	caveolin-3
<i>CBL</i>	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
<i>CBS</i>	cystathionine beta-synthase
<i>CETP</i>	cholesteryl ester transfer protein
<i>COL3A1</i>	collagen alpha-1(III) chain
<i>COL5A1</i>	collagen alpha-1(V) chain
<i>COL5A2</i>	collagen alpha-2(V) chain
<i>COX15</i>	cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog
<i>CREB3L3</i>	cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3
<i>CRELD1</i>	cysteine-rich with EGF-like domain protein 1
<i>CRYAB</i>	alpha-crystallin B chain
<i>CSRP3</i>	cysteine and glycine-rich protein 3
<i>CTF1</i>	cardiotrophin-1
<i>DES</i>	desmin
<i>DMD</i>	dystrophin
<i>DNAJC19</i>	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14
<i>DOLK</i>	dolichol kinase
<i>DPP6</i>	dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6
<i>DSC2</i>	desmocollin-2
<i>DSG2</i>	desmoglein-2
<i>DSP</i>	desmoplakin
<i>DTNA</i>	dystrobrevin alpha
<i>EFEMP2</i>	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
<i>ELN</i>	elastin
<i>EMD</i>	emerin
<i>EYA4</i>	eyes absent homolog 4

Název genu	Název proteinu (angl.)
<i>FBN1</i>	fibrillin-1
<i>FBN2</i>	fibrillin-2
<i>FHL1</i>	four and a half LIM domains protein 1
<i>FHL2</i>	four and a half LIM domains protein 2
<i>FKRP</i>	fukutin-related protein
<i>FKTN</i>	fukutin
<i>FXN</i>	frataxin, mitochondrial
<i>GAA</i>	lysosomal alpha-glucosidase
<i>GATAD1</i>	GATA zinc finger domain-containing protein 1
<i>GCKR</i>	glucokinase regulatory protein
<i>GJA5</i>	gap junction alpha-5 protein
<i>GLA</i>	alpha-galactosidase A
<i>GPDI1</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein
<i>GPIHBP1</i>	glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1
<i>HADHA</i>	trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial
<i>HCN4</i>	potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
<i>HFE</i>	hereditary hemochromatosis protein
<i>HRAS</i>	GTPase HRas
<i>HSPB8</i>	heat shock protein beta-8
<i>ILK</i>	integrin-linked protein kinase
<i>JAG1</i>	protein jagged-1
<i>JPH2</i>	junctionophilin-2
<i>JUP</i>	junction plakoglobin
<i>KCNA5</i>	potassium voltage-gated channel subfamily A member 5
<i>KCND3</i>	potassium voltage-gated channel subfamily D member 3
<i>KCNE1</i>	potassium voltage-gated channel subfamily E member 1
<i>KCNE2</i>	potassium voltage-gated channel subfamily E member 2
<i>KCNE3</i>	potassium voltage-gated channel subfamily E member 3
<i>KCNH2</i>	potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
<i>KCNJ2</i>	inward rectifier potassium channel 2
<i>KCNJ5</i>	G protein-activated inward rectifier potassium channel 4
<i>KCNJ8</i>	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 8
<i>KCNQ1</i>	potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1
<i>KLF10</i>	Krüppel-like factor 10
<i>KRAS</i>	GTPase KRas
<i>LAMA2</i>	laminin subunit alpha-2
<i>LAMA4</i>	laminin subunit alpha-4
<i>LAMP2</i>	lysosome-associated membrane glycoprotein 2
<i>LDB3</i>	LIM domain-binding protein 3
<i>LDLR</i>	low-density lipoprotein receptor
<i>LDLRAP1</i>	low density lipoprotein receptor adapter protein 1
<i>LMF1</i>	lipase maturation factor 1
<i>LMNA</i>	prelamin-A/C
<i>LPL</i>	lipoprotein lipase
<i>LTBP2</i>	latent-transforming growth factor beta-binding protein 2
<i>MAP2K1</i>	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
<i>MAP2K2</i>	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2
<i>MIB1</i>	E3 ubiquitin-protein ligase MIB1
<i>MURC</i>	caveolae-associated protein 4
<i>MYBPC3</i>	myosin-binding protein C, cardiac-type
<i>MYH11</i>	myosin-11
<i>MYH6</i>	myosin-6

Název genu	Název proteinu (angl.)
<i>MYH7</i>	myosin-7
<i>MYL2</i>	myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform
<i>MYL3</i>	myosin light chain 3
<i>MYLK</i>	myosin light chain kinase, smooth muscle
<i>MYLK2</i>	myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle
<i>MYO6</i>	unconventional myosin-VI
<i>MYOZ2</i>	myozenin-2
<i>MYPN</i>	myopalladin
<i>NEXN</i>	nexilin
<i>NKX2-5</i>	homeobox protein Nkx-2.5
<i>NODAL</i>	nodal homolog
<i>NOTCH1</i>	neurogenic locus notch homolog protein 1
<i>NPPA</i>	natriuretic peptides A
<i>NRAS</i>	GTPase NRas
<i>PCSK9</i>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
<i>PDLIM3</i>	PDZ and LIM domain protein 3
<i>PKP2</i>	plakophilin-2
<i>PLN</i>	cardiac phospholamban
<i>PRDM16</i>	PR domain zinc finger protein 16
<i>PRKAG2</i>	5-AMP-activated protein kinase subunit gamma-2
<i>PRKARIA</i>	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
<i>PTPN11</i>	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
<i>RAF1</i>	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
<i>RANGRF</i>	ran guanine nucleotide release factor
<i>RBM20</i>	RNA-binding protein 20
<i>RYR1</i>	ryanodine receptor 1
<i>RYR2</i>	ryanodine receptor 2
<i>SALL4</i>	sal-like protein 4
<i>SCN1B</i>	sodium channel subunit beta-1
<i>SCN2B</i>	sodium channel subunit beta-2
<i>SCN3B</i>	sodium channel subunit beta-3
<i>SCN4B</i>	sodium channel subunit beta-4
<i>SCN5A</i>	sodium channel protein type 5 subunit alpha
<i>SCO2</i>	protein SCO2 homolog, mitochondrial
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
<i>SEPN1</i>	selenoprotein N
<i>SGCB</i>	beta-sarcoglycan
<i>SGCD</i>	delta-sarcoglycan
<i>SGCG</i>	gamma-sarcoglycan
<i>SHOC2</i>	leucine-rich repeat protein SHOC-2
<i>SLC25A4</i>	ADP/ATP translocase 1
<i>SLC2A10</i>	solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 10
<i>SMAD3</i>	mothers against decapentaplegic homolog 3
<i>SMAD4</i>	mothers against decapentaplegic homolog 4
<i>SNTA1</i>	alpha-1-syntrophin
<i>SOS1</i>	son of sevenless homolog 1
<i>SREBF2</i>	sterol regulatory element-binding protein 2
<i>TAZ</i>	tafazzin
<i>TBX20</i>	T-box transcription factor TBX20
<i>TBX3</i>	T-box transcription factor TBX3
<i>TBX5</i>	T-box transcription factor TBX5
<i>TCAP</i>	telethonin

Název genu	Název proteinu (angl.)
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor beta-2
<i>TGFB3</i>	transforming growth factor beta-3
<i>TGFBRI</i>	TGF-beta receptor type-1
<i>TGFBR2</i>	TGF-beta receptor type-2
<i>TMEM43</i>	transmembrane protein 43
<i>TMPO</i>	lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha
<i>TNNC1</i>	troponin C, slow skeletal and cardiac muscles
<i>TNNI3</i>	troponin I, cardiac muscle
<i>TNNT2</i>	troponin T, cardiac muscle
<i>TPM1</i>	tropomyosin alpha-1 chain
<i>TRDN</i>	triadin
<i>TRIM63</i>	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63
<i>TRPM4</i>	transient receptor potential cation channel subfamily M member 4
<i>TTN</i>	titin
<i>TTR</i>	transthyretin
<i>TXNRD2</i>	thioredoxin reductase 2, mitochondrial
<i>VCL</i>	vinculin
<i>ZBTB17</i>	zinc finger and BTB domain-containing protein 17
<i>ZHX3</i>	zinc fingers and homeoboxes protein 3
<i>ZIC3</i>	zinc finger protein ZIC 3

Příloha č. 3: Skóre jednotlivých predikčních nástrojů u variant vybraných na základě populační frekvence <1 % a fenotypu

P	Gen	Záměna aminokyseliny	CADD	DANN	Eigen	FATHMM	GERP++	LRT	Meta LR	Meta SVM	Mutation Taster	Mutation Assessor	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	PROVEAN	SIFT	UMD	VEST3	Průměrné skóre
1	<i>TTN</i>	p.R28474VfsTer15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>CRYAB</i>	p.P39L	0,91	1,00	0,91	1,00	0,92	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	0,99	0,91	0,00	1,00	0,72	0,52	0,84
2	<i>TTN</i>	p.P30726S	0,50	0,91	1,00	0,00	0,97	-	1,00	1,00	1,00	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	0,20	0,83
2	<i>LAMP2</i>	p.G221R	0,73	1,00		0,00	0,99	1,00	0,00	0,00	1,00	0,73	1,00	1,00	1,00	1,00	0,62	0,43	0,70
2	<i>LDB3</i>	p.Q517P	0,44	0,98	0,71	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00	1,00	0,39	0,95	0,34	0,00	0,80	0,81	0,49	0,49
2	<i>MYBPC3</i>	p.R326Q	0,69	1,00	0,66	0,00	0,89	-	0,00	0,00	1,00	0,55	0,05	0,009	0,00	0,97	0,72	0,13	0,44
2	<i>TTN</i>	p.V5060L	0,38	0,45	0,72	0,00	0,96	-	0,00	0,00	1,00	-	0,71	0,39	0,00	0,41	0,54	0,24	0,41
2	<i>TTN</i>	p.A10827V	0,61	0,96	0,51	0,00	0,70	-	0,00	0,00	1,00	-	0,00	0,001	0,00	0,23	0,60	0,08	0,33
3	<i>FHL2</i>	p.R113C	1,00	1,00	0,93	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80	1,00	0,99	1,00	1,00	0,96	0,93	0,97
3	<i>CSRP3</i>	p.G70W	0,86	1,00	0,92	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,64	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93	0,96	0,95
3	<i>TTN</i>	p.P20274L	0,50	0,92	0,98	0,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00	0,82	0,99	0,92	1,00	0,99	0,87	0,36	0,82
3	<i>TTN</i>	p.N4657H	0,37	0,86	0,77	0,00	0,78	-	0,00	0,00	1,00	-	0,60	0,58	1,00	0,94	0,66	0,12	0,55
3	<i>TTN</i>	p.N7744K	0,46	0,98	0,64	0,00	0,91	-	0,00	0,00	1,00	-	0,00	0,00	0,00	0,35	0,39	0,07	0,34
3	<i>DSP</i>	p.R889K	0,52	0,99	0,57	0,00	0,92	1,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,42	0,54	0,11	0,32
3	<i>TTN</i>	p.E11416del	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>MYBPC3</i>	p.S217G	0,42	0,98	0,69	0,00	0,82	-	0,00	0,00	1,00	0,47	0,91	0,61	1,00	1,00	0,78	0,13	0,59
4	<i>TRPM4</i>	p.R252H	0,66	1,00	0,69	0,00	0,72	0,00	0,00	0,00	1,00	0,58	1,00	0,67	1,00	0,99	0,12	0,24	0,54
5	<i>CBS</i>	p.R45W	0,83	1,00	0,73	1,00	0,81	0,00	1,00	1,00	1,00	0,67	1,00	0,54	1,00	0,99	0,84	0,59	0,81
5	<i>TTN</i>	p.R32748C	0,67	0,94	0,95	0,00	0,93	-	0,00	0,00	1,00	0,72	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,43	0,71
5	<i>TTN</i>	p.R3120Q	0,68	0,99	0,84	0,00	0,98	-	0,00	0,00	1,00	-	0,99	0,65	0,00	0,77	0,87	0,33	0,58
5	<i>TTN</i>	p.H10092Y	0,61	0,94	0,72	0,00	0,98	-	0,00	0,00	1,00	-	0,006	0,01	1,00	0,92	0,81	0,42	0,53
5	<i>LAMP2</i>	p.V391I	0,55	0,54	-	0,00	0,80	-	0,00	0,00	1,00	-	0,001	0,004	0,00	0,00	0,41	0,18	0,27
6	<i>RBM20</i>	p.Y229C	0,71	1,00	0,74	1,00	0,96	-	1,00	1,00	1,00	0,63	0,62	0,27	1,00	1,00	1,00	0,74	0,84
6	<i>TTN</i>	p.I2986T	0,56	0,97	0,84	0,00	0,95	-	0,00	0,00	1,00	-	0,65	0,45	1,00	0,90	0,93	0,35	0,61
6	<i>TTN</i>	p.P4995R	0,41	0,88	0,79	0,00	0,98	-	0,00	0,00	1,00	-	0,67	0,34	1,00	0,67	0,43	0,44	0,54
6	<i>TTN</i>	p.V5435M	0,61	0,95	0,70	0,00	0,94	-	0,00	0,00	1,00	-	0,09	0,04	0,00	0,78	0,60	0,30	0,43
6	<i>ALMS1</i>	p.E1355D	0,01	0,99	0,34	-	0,23	-	0,00	0,00	0,00	0,62	1,00	0,99	-	-	0,24	0,07	0,37

P	Gen	Záměna aminokyseliny	CADD	DANN	Eigen	FATHMM	GERP++	LRT	Meta LR	Meta SVM	Mutation Taster	Mutation Assessor	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	PROVEAN	SIFT	UMD	VEST3	Průměrné skóre	
7	<i>SDHA</i>	p.V461F	0,81	0,99	0,89	0,00	0,91	-	1,00	1,00	1,00	0,73	0,99	0,89	1,00	1,00	0,99	0,99	0,88	
7	<i>TTN</i>	p.L26799R	0,45	0,88	0,97	0,00	0,97	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,53	0,85
7	<i>TTN</i>	p.31002I	0,65	0,94	0,84	0,00	0,89	-	0,00	0,00	1,00	0,36	0,95	0,79	1,00	0,97	0,93	0,41	0,65	
8	<i>ACTA1</i>	p.Y220H	0,76	0,99	0,97	1,00	0,86	1,00	1,00	1,00	1,00	0,81	0,98	1,00	1,00	-	0,81	0,96	0,94	
8	<i>TTN</i>	p.V8322L	0,57	0,92	0,70	0,00	1,00	-	0,00	0,00	1,00	-	0,39	0,09	0,00	0,68	0,60	0,21	0,44	
8	<i>TTN</i>	p.Y5683C	0,00009	0,35	0,47	0,00	0,83	-	0,00	0,00	1,00	-	0,04	0,04	1,00	0,89	1,00	0,40	0,43	
9	<i>RYR2</i>	p.V4653I	0,68	1,00	0,94	1,00	0,97	-	1,00	1,00	1,00	0,61	1,00	0,99	0,00	1,00	0,60	0,33	0,81	
9	<i>TTN</i>	p.C5387Y	0,42	0,98	0,69	0,00	0,98	-	0,00	0,00	1,00	-	0,22	0,08	0,00	0,96	0,78	0,35	0,46	
9	<i>DSP</i>	p.V30M	0,00003	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,71	0,17	
10	<i>JUP</i>	p.N425D	0,78	1,00	0,92	0,00	0,92	1,00	0,00	0,00	1,00	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	0,42	0,72	
10	<i>TTN</i>	p.S24535Y	0,59	0,89	0,98	0,00	0,99	-	0,00	0,00	1,00	0,53	1,00	0,99	1,00	1,00	0,90	0,48	0,69	
10	<i>TTN</i>	p.V32324A	0,54	0,98	0,74	0,00	0,96	-	0,00	0,00	0,00	0,27	0,05	0,11	1,00	0,77	0,72	0,14	0,42	
11	<i>LAMA2</i>	p.C3087S	0,71	0,99	0,93	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	1,00	1,00	1,00	1,00	0,84	1,00	0,95	
11	<i>ALMS1</i>	p.N2944K	0,002	0,73	0,25	-	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,002	-	-	0,05	0,008	0,14	
12	<i>TTN</i>	p.S23226G	0,37	0,84	0,88	0,00	0,88	-	0,00	1,00	1,00	0,80	1,00	0,99	1,00	0,99	0,90	0,21	0,72	
12	<i>TTN</i>	p.R15908H	0,67	0,96	0,95	0,00	0,98	-	0,00	0,00	1,00	0,59	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	0,33	0,68	
12	<i>TTN</i>	p.R31748C	0,69	0,96	0,95	0,00	0,97	-	0,00	0,00	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	0,95	0,71	0,40	0,68	
12	<i>TTN</i>	p.G7058D	0,63	0,89	0,86	0,00	0,98	-	0,00	1,00	1,00	-	0,47	0,45	1,00	0,67	0,78	0,45	0,66	
12	<i>TTN</i>	p.I31757T	0,61	0,91	0,85	0,00	0,97	-	0,00	0,00	1,00	0,10	1,00	0,94	1,00	0,96	0,93	0,37	0,64	
12	<i>ACTN2</i>	p.R298H	0,72	1,00	0,76	0,00	0,89	1,00	0,00	0,00	1,00	0,60	0,03	0,02	1,00	0,99	0,87	0,82	0,61	
12	<i>TTN</i>	p.V29796M	0,65	0,96	0,89	0,00	0,96	-	0,00	0,00	1,00	0,39	1,00	1,00	0,00	0,99	0,72	0,22	0,58	
12	<i>TTN</i>	p.K18518R	0,43	0,92	0,87	0,00	0,98	-	0,00	0,00	1,00	0,34	1,00	1,00	0,00	0,83	0,72	0,20	0,55	
12	<i>TTN</i>	p.T21820I	0,65	0,89	0,78	0,00	0,99	-	0,00	0,00	1,00	0,60	0,13	0,05	1,00	0,89	0,62	0,36	0,53	
12	<i>TTN</i>	p.E35527V	0,54	0,72	0,50	0,00	0,86	-	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,001	1,00	1,00	0,65	0,42	0,39	
12	<i>SCN5A</i>	p.P2006A	0,00003	0,35	0,37	1,00	0,35	0,00	1,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,40	0,57	0,13	0,27	
12	<i>TTN</i>	p.L10784V	0,38	0,94	0,44	0,00	0,69	-	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,13	0,19	
12	<i>TTN</i>	p.K4646E	0,09	0,55	0,31	0,00	0,36	-	0,00	0,00	0,00	-	0,002	0,009	0,00	1,00	0,05	0,17	0,18	