

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Natálie Havranová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Studium sekvenčních variant vybraných genů u
pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Natálie Havranová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Arpád Bóday
Termín odevzdání práce:	2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Natálie Havranová
Název práce	Studium sekvenčních variant vybraných genů u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, PřF UPOL
Vedoucí práce	Ing. Arpád Bóday
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je nejčastější dědičné autozomálně dominantní onemocnění srdce s prevalencí v populaci 1:500. Je obecně definována přítomností hypertrofie levé někdy i pravé komory a zvětšením hmotnosti myokardu bez přítomnosti hypertenze a chlopenní vady. Abnormální struktura srdečního svalu vede k poruchám srdečního rytmu, který způsobuje palpitace a synkopy. Tyto srdeční defekty mohou zapříčinit srdeční selhání až náhlou smrt pacientů ve všech věkových kategoriích zahrnujících i asymptomatické pacienty. HCM je heterogenní onemocnění s variabilní expresivitou, odlišným věkem nástupu a různou závažností symptomů. Pacienti mohou být dlouhá léta bezpříznakoví. Genetická heterogenita je způsobena mutacemi ve velkém počtu genů, které kódují proteiny sarkomerického komplexu a Z-disk proteiny. V diplomové práci byly analyzovány vybrané geny spojené s hypertrofickou kardiomyopatií.</p>
Klíčová slova	Hypertrofická kardiomyopatie, sarkomerické geny, nesarkomerické geny, SCD, predikční programy
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Natálie Havranová
Title of thesis	Study of sequence variants of the selected genes in patients with hypertrophic cardiomyopathy
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators, Center of the region Haná for biotechnological and agricultural research, PŘF UPOL
Supervisor	Ing. Arpád Bóday
The year of presentation	2017
Abstract	<p>Hypertrophic cardiomyopathy is the most common autosomal dominant hereditary heart disease in a population with a prevalence of 1: 500. It is generally defined by the presence of hypertrophy of the left and sometimes the right ventricular wall and by increasing the myocardium weight without the presence of hypertension and valvular disease. The abnormal structure of the heart muscle leads to malfunction in heart rhythm that causes palpitations and syncope. These heart defects can cause heart failure as well as sudden death to patients of all age group also including asymptomatic patients.</p> <p>HCM is a heterogeneous disease with variable expressivity, with diverse age of onset and severity of various symptoms. Patients may be asymptomatic for many years. Genetic heterogeneity is caused by mutations in many genes that encode protein components of the sarcomere and the Z-disc proteins. In the thesis, selected genes associated with hypertrophic cardiomyopathy were analyzed.</p>
Key words	Hypertrophic cardiomyopathy, sarcomeric genes, non-sarcomeric genes, SCD, prediction programmes
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Ing. Arpáda Bódaye a uvedla veškerou literaturu, ze které jsem čerpala.

V Novém Jičíně, dne 23. 4. 2017

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce, Ing. Arpádu Bódayovi, za odbornou pomoc, poskytnutou literaturu a cenné rady při zpracování práce. Stejně tak děkuji Ing. Petře Cibulkové, Mgr. Magdaléně Dvořákové a Mgr. Pavle Vaníčkové za jejich trpělivost a veškeré informace, které mi při vypracování práce ochotně poskytly a také ostatním zaměstnancům laboratoří AGEL a.s. v Novém Jičíně z oddělení lékařské genetiky.

Obsah

Obsah	1
Seznam zkratek	3
1 Úvod	5
2 Cíle práce	6
3 Současný stav řešené problematiky	7
3.1 Klinické projevy HCM	7
3.2 Patologie myokardu s HCM	9
3.2.1 Makroskopický fenotyp	10
3.2.2 Mikroskopický fenotyp	12
3.3 Patofyziologie	13
3.4 Průběh onemocnění.....	14
3.5 Klinická diagnostika	14
3.6 Terapie	15
3.6.1 Farmakoterapie.....	15
3.6.2 Nefarmakologická terapie	16
3.7 Prevalence HCM.....	16
3.8 Genetika HCM.....	17
3.8.1 Geny související se vznikem HCM.....	17
3.9 Molekulární podstata HCM	22
3.9.1 Signální dráhy spojené s HCM.....	22
3.9.1.1 Ca ²⁺ signalizace	22
3.9.1.2 β-adrenergní signalizace	23
3.10 Molekulární diagnostika.....	24
3.10.1 Sangerova metoda sekvenování	24
3.10.2 Sekvenování nové generace (NGS)	25
3.10.2.1 Illumina/Solexa	26
3.10.2.2 Cílené sekvenování (Target Enrichment)	28
3.10.2.3 Nimble Gen Seq Cap EZ Choice Systém.....	29

3.10.2.4	Analýza sekvenačních dat.....	29
3.10.2.5	Interpretace sekvenačních dat.....	31
4	Materiál a metodika.....	33
4.1	Materiál.....	33
4.1.1	Soubor pacientů.....	33
4.1.2	Biologický materiál.....	33
4.1.3	Použité chemikálie.....	33
4.1.4	Přístrojové vybavení.....	33
4.2	Metodika.....	34
4.2.1	Izolace DNA z periferní krve - vysolovací metoda.....	34
4.2.2	Měření koncentrace nukleových kyselin.....	35
4.2.3	Navrhování primerů.....	35
4.2.4	Sangerovo sekvenování.....	36
4.2.5	Analýza sekvenačních dat.....	38
5	Výsledky.....	39
5.1	Frekvence záchytu sekvenčních variant ve vybraných genech.....	44
5.2	Rodokmeny pacientů s HCM.....	46
6	Diskuze.....	49
7	Závěr.....	52
8	Seznam použité literatury.....	53
8.1	Použité internetové zdroje.....	63

Seznam zkratek

AFA	The Adaptive Focused Acoustics™
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
Bp	Base pair
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCD	Charge-coupled device
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNV	Copy number varian
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
dsDNA	dvouvláknová DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EKG	elektrokardiografie
F	forward
GD	Grantham Difference score
GV	Grantham Variation score
HCM	hypertrofická kardiomyopatie
HGMD	Database of Human Gene Mutation Data
ICD	implantabilní kardioverter/defibrilátor
IVS	interventrikulární septum
LK	levá komora
LM-PCR	Ligation-mediated PCR (ligační PCR)
MR	magnetická resonance
MYBPC3	myozinový vazebný protein C 3
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	sekvenování nové generace
PCR	polymerázová řetězová reakce
PKA	proteinkináza A
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2
PRKAG2	γ 2 podjednotka svalové cAMP-dependentní proteinkinázy
PSIBLAST	Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool
R	reverse
RyR	ryanodinové receptory

SAM	systolický dopředný pohyb (systolic anterior motion)
SCD	riziko náhlé srdeční smrti
SERCA	sarko/endoplazmatické retikulum Ca ²⁺ ATPáza
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Single nucleotide polymorphism
SROOGLE	Splicing Regulation Online Graphical Engine
SRS	Splicing regulatory sequence
ssDNA	jednovláknová DNA
TGF-β	transforming growth factor
T _m	melting temperature
UMD-Predictor	A mutation pathogenicity prediction system
VUS/UV	Variant of uncertain significance

1 Úvod

Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je převážně geneticky podmíněné onemocnění srdečního svalu. Jedná se o nejčastější formu familiární kardiomyopatie s autozomálně dominantní dědičností. V současné době je odhadována celosvětová prevalence hypertrofické kardiomyopatie přibližně na 1 : 500. HCM je heterogenní onemocnění, u kterého dochází k částečným odchylkám od klasické genetiky jako je např. neúplná penetrance genotypu - hypertrofie se nemusí projevit ve všech případech, kdy je přítomná genetická predispozice a jeho variabilní intra a interfamiliární expresivita, kdy znak může být různě vyjádřen - ne ve všech případech musí být HCM závažnou chorobou, u mnoha pacientů nedochází k žádnému projevu klasických příznaků. Pacienti také mohou být nositeli většího počtu mutací ve více genech způsobujících kumulativní efekt, což může mít za následek dřívější manifestaci onemocnění s větším rizikem náhlého úmrtí pacienta. Charakteristickým anatomickým rysem nemoci je asymetrická hypertrofie stěn levé komory srdeční. I přes omezenou znalost mechanismů zapojených do modifikace kardiomyocytů, víme, že je onemocnění spojeno s mutacemi, které postihují jak sarkomerické tak nesarkomerické proteiny a další proteiny zapojené do svalové kontrakce. Do roku 2017 bylo identifikováno více než 2200 mutací odpovědných za patologii HCM. Většinou jde o missense mutace, kdy dochází k náhradě jedné aminokyseliny za jinou. Žádná z mutací se nezdá být převažující. Hypertrofie myokardu většinou nebývá přítomná při narození postiženého jedince a k jejímu rozvoji dochází kdykoli v průběhu života. HCM provází příznaky jako bolest na hrudi, synkopy nebo presynkopy, dušnost, palpitace a náhlá srdeční smrt. Molekulární diagnostika HCM je nanejvýš důležitá, jelikož umožňuje detekci jedinců nesoucích mutace v genech pro HCM již před možným rozvojem klinických příznaků. Díky genetické heterogenitě je však molekulární diagnostika obtížná. V současné době se k detekci mutací využívají techniky jako Sangerovo sekvenování, DNA čipy a nejnovější technologie sekvenování nové generace (NGS).

Diplomová práce se zabývá analýzou souboru vybraných genů, které jsou dle genetických databází spojeny s HCM. K analýze těchto genů byla využita metoda NGS (Next generation sequencing), která umožňuje získat velké množství molekulárních dat paralelní analýzou desítek genů za relativně krátký časový úsek.

2 Cíle práce

1. Vytvořit literární přehled o hypertrofické kardiomyopatii (HCM).
2. V souboru 170 pacientů s klinicky stanovenou diagnózou hypertrofické kardiomyopatie vyhodnotit výsledky mutační analýzy 20 genů souvisejících s HCM.
3. U pacientů bez nálezu patogenní sekvenční varianty v hlavní skupině 20 genů, vyhodnotit doplňující analýzu dalších 12 genů souvisejících s HCM.
4. Všechny nalezené patogenní a pravděpodobně patogenní sekvenční varianty ověřit metodou Sangerova sekvenování.
5. Stanovit frekvenci nalezených patogenních a pravděpodobně patogenních sekvenčních variant v souboru pacientů s HCM.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Klinické projevy HCM

Kardiomyopatie je myokardiální postižení, při kterém je srdeční sval strukturálně nebo funkčně poškozen, při současné nepřítomnosti koronární nemoci, hypertenze, chlopenní vady nebo vrozené srdeční vady schopné způsobit toto postižení (Elliott, 2008). V případě hypertrofické kardiomyopatie dochází k hypertrofii levé komory (LK), která bývá větší než 15 mm. Genetická definice pak popisuje HCM jako dědičné, autozomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené mutacemi v genech kódujících srdeční sarkomerické proteiny. Mutace sarkomerických proteinů se však vyskytují pouze u ~ 60 % pacientů. (Maron, 2004).

Příznaky hypertrofické kardiomyopatie jsou variabilní, a to i v rámci jedné rodiny, ale navíc se předpokládá, že většina pacientů je buďto asymptomatická nebo minimálně symptomatická. Mezi příznaky HCM patří např. bolest na hrudi, synkopy nebo presynkopy, dušnost a palpitace. Klinická diagnóza HCM může být podpořena rodinnou anamnézou onemocnění, přítomností tachyarytmie nebo abnormalitami EKG (Maron, 2002; Maron *et al.*, 2003). Nejzávažnější komplikací HCM je náhlá srdeční smrt, která může být prvním projevem tohoto onemocnění. Dříve byli za pacienty s rizikem náhlé srdeční smrti označováni ti, kteří byli v minulosti resuscitováni pro srdeční zástavu, pro fibrilaci komor nebo pro setrvalou komorovou tachykardii, dále pacienti s rodinnou anamnézou náhlé smrti u přímých příbuzných, pacienti s patogenní mutací nebo nemocní s nevysvětlitelnou synkopou. (Maron *et al.*, 2000, Maron *et al.*, 2003).

Nyní se k rozčlenění rizika náhlé srdeční smrti využívá speciální algoritmus dostupný online z <http://www.doc2do.com/hcm/webHCM.html> (viz obr. 1). Ve výpočtu je zohledněn věk pacienta, zjištěná tloušťka levé komory (LK) v mm pomocí EKG, zjištěný průměr levé síně v mm, maximální výtok levé komoty v mmHg, rodinná historie náhlé srdeční smrti, nepravidelný srdeční rytmus zaznamenaný pomocí Holterova monitorování a nevysvětlitelné synkopy. Výstupem je výpočet rizika náhlé srdeční smrti v následujících pěti letech a doporučení Evropské kardiologické společnosti.

HCM Risk-SCD Calculator

Age	<input type="text"/>	Years	Age at evaluation
Maximum LV wall thickness	<input type="text"/>	mm	Transthoracic Echocardiographic measurement
Left atrial size	<input type="text"/>	mm	Left atrial diameter determined by M-Mode or 2D echocardiography in the parasternal long axis plane at time of evaluation
Max LVOT gradient	<input type="text"/>	mmHg	The maximum LV outflow gradient determined at rest and with Valsalva provocation (irrespective of concurrent medical treatment) using pulsed and continuous wave Doppler from the apical three and five chamber views. Peak outflow tract gradients should be determined using the modified Bernoulli equation: Gradient= $4V^2$, where V is the peak aortic outflow velocity
Family History of SCD	<input type="radio"/> No	<input type="radio"/> Yes	History of sudden cardiac death in 1 or more first degree relatives under 40 years of age or SCD in a first degree relative with confirmed HCM at any age (post or ante-mortem diagnosis).
Non-sustained VT	<input type="radio"/> No	<input type="radio"/> Yes	3 consecutive ventricular beats at a rate of 120 beats per minute and <30s in duration on Holter monitoring (minimum duration 24 hours) at or prior to evaluation.
Unexplained syncope	<input type="radio"/> No	<input type="radio"/> Yes	History of unexplained syncope at or prior to evaluation.

Risk of SCD at 5 years (%):

ESC recommendation:

Obr. 1 Výpočet rizika náhlé srdečné smrti

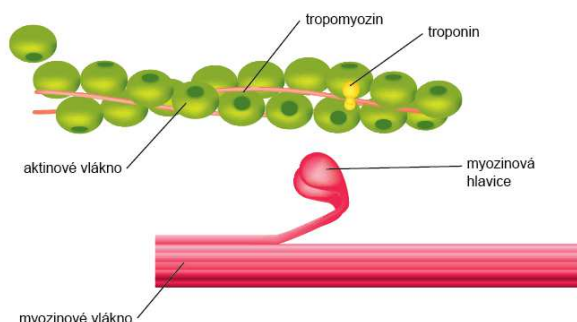
Převzato z: <http://www.doc2do.com/hcm/webHCM.html>

Nejčastější nálezy patogenních sekvenčních variant spojených s HCM jsou v genech *MYH7* a *MYBPC3*. Méně časté jsou nálezy v genech *TNNT2* a *TNNI3*, *TPMI* a *MYL3*. Existuje však mnoho dalších genů, které mohou mít spojitost s HCM včetně těch, které doposud nebyly identifikovány (Lopes *et al.*, 2013). Geny spojené s HCM kódují proteiny odpovědné za strukturu nebo funkci sarkomery srdečního svalu. Jedná se o silná a tenká kontraktilní myofilamenta, proteinové složky sarkomery nebo přilehlé Z-disky, které jsou exprimovány především v srdci (Seidman *et Seidman* 2011; Maron *et al.*, 2012).

Sarkomery jsou základními stavebními jednotkami svalů, jsou složeny ze silných a tenkých myofilament (**viz obr. 2**). Silná myofilamenta se skládají z těžkých řetězců myozinu navzájem propojených myozinovým vazebným proteinem C. Tenká filamenta obsahují dva řetězce molekul aktinu spletených do šroubovice spolu s vláknem tropomyozinu a regulačními bílkoviny – srdečními troponiny (Veselka *et al.* 2006).

Srdeční činnost je založena na neustálé kontrakci a relaxaci srdečního svalu. Pravidelné kontrakce pak pumpují krev do zbytku těla. Během kontrakce se tenká aktinová vlákna vsouvají mezi silná vlákna myozinu. Při relaxaci se vlákna vzdalují a napínají se

elastické složky sarkomery. HCM může být způsobena mutací jakéhokoliv proteinu srdeční sarkomery (Seidman, 2002; Richard, 2003; Van Driest, 2005). Většina mutací se však nachází v genech pro proteiny silných myofilament (Schwartz, 1995).

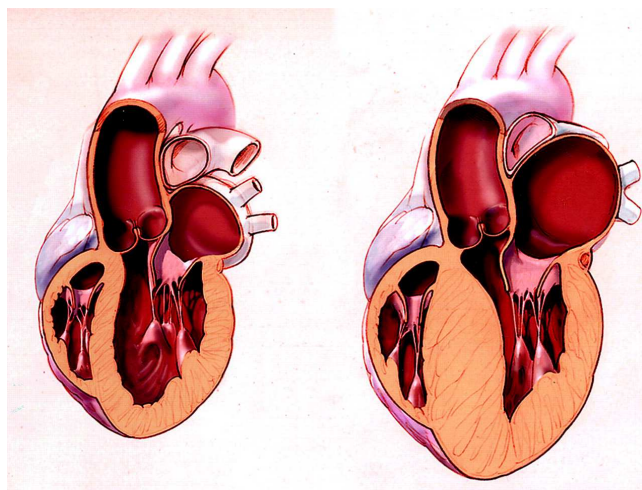


Obr. 2 Struktura srdečního svalu

Převzato z: <https://publi.cz/books/151/05.html>

3.2 Patologie myokardu s HCM

Jako první v roce 1957 popsal hypertrofickou kardiomyopatii Russell Brock, který našel funkční subvalvulární obstrukci u pacientů podstupujících aortální valvotomii pro podezření z chlopenní aortální stenózy (Brock, 1956). Poté v roce 1958 popsal Teare srdeční anatomii u 8 mladých pacientů, kteří náhle zemřeli a označil ji jako asymetrickou hypertrofii srdce. Tento nález považoval za benigní nádor ze srdeční svaloviny a uvažoval, zda je jeho původ vrozený či získaný (Teare, 1958). V roce 1995 byla HCM podle klasifikace WHO/ISFC kardiomyopatií popsána jako hypertrofie levé a/nebo pravé komory, která je obvykle asymetrická a postihuje interventrikulární septum (IVS) (Richardson, 1996). V makroskopickém a mikroskopickém (histologickém) obraze HCM převažuje zejména hypertrofie myokardu a abnormální struktura myokardu (Silver 2001) (**viz obr. 3**).



Obr. 3 Schéma normálního (vlevo) a hypertrofického srdce (vpravo)

Převzato z: <http://circ.ahajournals.org/content/108/19/e133>

3.2.1 Makroskopický fenotyp

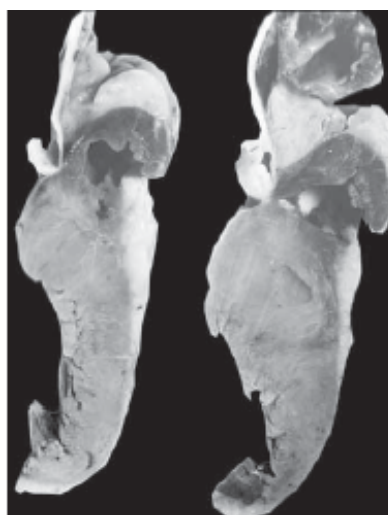
Zřetelnou patologickou změnou u pacientů s HCM je zvětšení hmotnosti srdce z obvyklých 400g u mužů a 350g u žen až na jeden kilogram. Příčinou je zvětšení buněk myokardu, tím pak zmohtnění srdeční svaloviny a zvýšení hmotnosti srdce (Silver, 2001).

HCM je charakterizována hypertrofií a narušením roztažnosti levé komory v diastole. Hypertrofie může být symetrická nebo asymetrická. Symetrická hypertrofie (**viz obr. 4**) neboli difúzní koncentrická hypertrofie LK bývá identifikována většinou u starších osob s četností 1 - 42 % (Silver, 2001). Častějším případem HCM je hypertrofie asymetrická. Klasickou anatomickou formu asymetrické hypertrofie srdce popsal již Teare (Teare, 1958). Dochází při ní k ztluštění interventrikulárního septa samostatně nebo společně s přední či zadní stěnou levé komory, která vytváří zřetelný val pod aortální chlopní a způsobuje zúžení výtokové části levé komory - obstrukční HCM (**viz obr. 5**). Asymetrická hypertrofie střední části septa může vést k midventrikulární obstrukci (což je obstrukční forma HCM na úrovni papilárních svalů). Z klinického hlediska má HCM tendenci spíše k asymetrické hypertrofii intraventrikulárního septa (Klues *et al.*, 1995).



Obr. 4 Symetrická hypertrofie LK

Převzato z: Šteiner, I., (2008). Patologie hypertrofické kardiomyopatie. Kardioforum, 6(2), 1-16.



Obr. 5 Obstrukční HCM - podélné řezy septem komor srdce, subalveolárně je val hypertrofické svaloviny

Převzato z: Šteiner, I., (2008). Patologie hypertrofické kardiomyopatie. Kardioforum, 6(2), 1-16.

Apikální HCM je vzácným typem asymetrické hypertrofie septa v hrotové oblasti. Tato forma HCM je neobstrukční a má lepší prognózu než jiné typy HCM. Odhaduje se, že přibližně 30 % HCM je obstrukčních a zbylých 70 % neobstrukčních (Hughes, 2004; Maron, 2002)

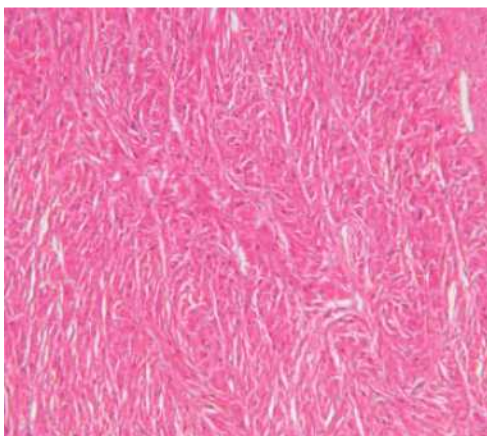
Hypertrofie je projev dlouhodobé zvýšené zátěže srdce. V hypertrofických oblastech myokardu, převážně v septu se vyskytuje abnormální uspořádání srdeční svaloviny. Ke strukturálním a funkčním změnám dochází i na úrovni intersticia - objevovat se může jak, intersticiální fibróza, tak postnekrotické jizvy. U více než 30 % případů HCM bývá identifikována fibróza endokardu septa komor v místě asymetrické hypertrofie, na vrcholu subaortálního valu.

Další postiženou srdeční strukturou kromě typického nálezu zesílení srdečních komor jsou papilární svaly, u kterých dochází taktéž k zesílení a také ke změně jejich lokalizace v dutině LK směrem k její přední stěně. Typický bývá také posun svalů apikálním směrem. Klinický význam uvedených změn je důležitý zejména proto, že přispívá k vzniku dopředného pohybu předního, často prodlouženého, cípu mitrální chlopně a šlašinek (SAM - systolic anterior motion). Výsledkem může být subaortální obstrukce (Veselka *et al.*, 2006).

3.2.2 Mikroskopický fenotyp

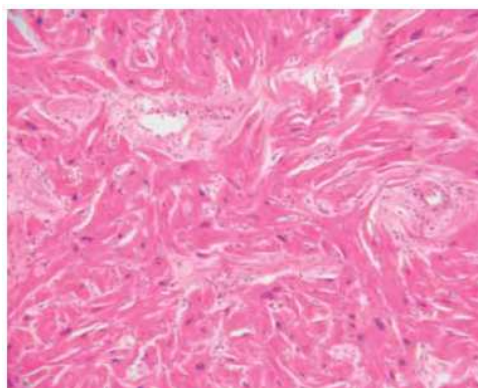
Kardiomyocyt se při hypertrofii ztlušťuje až na 90 μm , zvětšuje se jeho jádro, které se tmavěji barví a mění svůj tvar na obdélníkový až bizarní. Nahromaděný glykogen v postižených kardiomyocytech vytváří světlé vakuoly. Mikroskopický (histologický) nález HCM má dva typické znaky - zvýšení intersticiální fibrózy a dezorganizace. Ložiska dezorganizace tvoří u nemocných s HCM asi 20 % myokardu (Šteiner, 2008). Dezorganizace je charakterizována vzájemným nepravidelným proplétáním svalových snopců, které po barvení hematoxylin-eosinem zaujímají různé tvary např. uspořádání podobné rybí kosti či stromečku (**viz obr. 6**). Dezorganizace se týká také myocytů a myofibril, které bývají nepravidelně uspořádané a mívají charakter vírů. Vlivem těchto strukturálních změn dochází ke kontrakčním a arytmiickým poruchám u HCM. Dezorganizovanost je pro HCM diagnosticky průkazná, tvoří-li více než 20 % vyšetřeného myokardu (Hughes, 2004; Maron, 2002).

Fibróza se nachází zejména v septu mezi vlákny dezorganizované svaloviny v místech vírů jako ložiska světlého, řídké buněčnatého vaziva (intersticiální fibróza). Jedná se zřejmě o primární morfologickou součást kardiomyopatie (Hughes, 2004) (**viz obr. 7**).



Obr. 6 Proplétající se snopce myokardu (barvení hematoxylin-eozin, x 40)

Převzato z: Šteiner, I., (2008). Patologie hypertrofické kardiomyopatie. Kardiofórum, 6(2), 1-16.



Obr. 7 Dezorganizace HCM - nepravidelně probíhající vlákna hypertrofického myokardu a světlá ložiska řídké fibrózy (barvení hematoxylin-eozin, x 100)

Převzato z: Šteiner, I., (2008). Patologie hypertrofické kardiomyopatie. Kardioforum, 6(2), 1-16.

3.3 Patofyziologie

Jak již bylo zmíněno, hypertrofie LK u HCM je charakterizována toušťkou stěny LK nad 15 mm. Asi 20 % diagnostikovaných pacientů s HCM nemá oproti kontrolám vyšší hmotnost LK (Olivotto, 2008).

Jednoznačná příčina vzniku HCM není zcela jasná. Jednou z možností je snížení ATPázové aktivity a kontraktility myokardu, kterou předchází mnoho dalších kroků v důsledku genových mutací. Následkem těchto změn může dojít k *up-regulaci* růstových faktorů a tvorbě některých izoform fetálních proteinů charakteristických pro tlakové přetížení a také HCM. Vznik hypertrofie LK kompenzuje sníženou kontraktilitu a zároveň udržuje ejekční frakci.

Další možností je neefektivní využívání ATP. Abnormální sarkomerické proteiny spotřebovávají více ATP a nedostatek tohoto nukleotidu se následně projeví na intracelulární úrovni stoupáním koncentrace vápníku v cytosolu myocytů, protože odčerpávání vápníku do sarkoplazmatického retikula je energeticky náročný, ATP dependentní proces. Déle trvající vyšší koncentrace vápníku stimuluje vznik hypertrofie a aktivaci proteinkinázy aktivované AMP.

Hypertrofie při HCM vzniká v jakémkoli věku. Pokud je nalezná již v dětství, mívá závažnější prognózu. Častějším případem bývá nález v období adolescence. Kromě vzniku SAM a dysfunkce mitrální chlopně následkem patologického úponu papilárních svalů se mění také diastolické vlastnosti LK detekovatelné tkáňovou dopplerovskou echokardiografií. Vznik hypertrofie LK doprovází také diastolická dysfunkce, která se projevuje omezenou schopností plnění komor za normálních plicních tlaků. S vývojem HCM nejprve ubývá ložisek

s dezorganizací a zvyšuje se množství kolagenu (intersticiální fibróza). Klinickým projevem diastolické dysfunkce je syndrom srdečního selhání (dušnost, otoky, nevykonnost).

Přibližně třetina pacientů s HCM trpí anginou pectoris (pálivá, svíravá bolest za hrudní kostí) v průběhu běžných denních aktivit. Příčinou je ischemie myokardu způsobená nedostatečným přísunem kyslíku do myokardu. Kyslík je spotřebováván hypertrofickou tkání LK, která má zvýšenou bazální spotřebu kyslíku a již při nepatrném zvýšení tepové frekvence či zvýšené systémové tenzi vyvolává ischemii (Veselka *et al.*, 2006).

3.4 Průběh onemocnění

Mnoho pacientů je celý život s minimálními příznaky nebo zcela bez příznaků. Pacienti, u kterých se projevují symptomy HCM mají horší prognózu než asymptomatictí pacienti. Nepřítomnost symptomů ovšem nevyklučuje riziko náhlé srdeční smrti. (Maron, 2006).

Dalším rizikem je fibrilace síní. Její přítomnost u pacientů s HCM výrazně zhoršuje prognózu oproti zdravým pacientům se sinusovým rytmem. Fibrilaci předchází dva patofyziologické děje - diastolická dysfunkce LK a mitrální regurgitace, vedoucí k dilataci levé síně. Fibrilace síní může vyústit v srdeční selhání. Průběh HCM je tedy výrazně heterogenní a je ovlivněn přítomností rizikových faktorů náhlé srdeční smrti. Potřebná je celoživotní kontrola osob postižených rodin, jelikož poslední studie ukázaly, že fenotyp HCM se může rozvinout prakticky kdykoliv (Maron *et al.*, 2003).

3.5 Klinická diagnostika

Téměř u všech pacientů s HCM jsou zaznamenány změny elektrokardiografie (**EKG**) a v některých případech nespecifické změny na EKG předznamenávají pozdější rozvoj onemocnění. Nejčastější známky hypertrofie LK jsou hluboký S kmit ve svodech V1, V2 a naopak vysoký R kmit ve svodech V5 a V6. Vedlejším nálezem mohou být změny ST úseku a vlny T, ev. patologické kmity Q nebo QS. Hluboce negativní vlny T v prekordiálních svodech jsou typické pro apikální formu HCM (Brtko *et al.*, 2002).

Echokardiografie je v diagnostice HCM zcela zásadní. Umožňuje přesně rozpoznat a zmapovat hypertrofii myokardu. Můžeme s její pomocí diagnostikovat obstrukci, zjistit její velikost, rozpoznat mitrální insuficienci a posoudit případnou poruchu diastolického plnění. S její pomocí lze také odhalit kalcifikaci mitrálního prstence.

Magnetická rezonance (MR) srdce má ve srovnání s echokardiografií několik výhod. Nejlépe kvantifikuje hypertrofii, nejlépe posoudí papilární svaly a jde o jedinou techniku, která zobrazí ložiska myokardiální fibrózy. MR také umožní odlišit některé jednotky, které

mají hypertrofii, ale nevznikají na podkladě sarkomerických mutací (např. amyloidóza, Fabryho choroba)

Katetrizace srdeční je indikována především u nemocných s podezřením na ischemickou chorobu srdeční, stavů s typickým echokardiografickým nálezem, a u těžce symptomatických nemocných, u nichž je plánován kardiochirurgický výkon.

HCM u dětí vykazuje některé odlišné rysy oproti onemocnění u dospělých. V úvodních fázích se projevuje městnavá srdeční slabost, s případnou těžkou oboustrannou srdeční nedostatečností a centrální cyanózou. Často dochází k výraznému zhoršování a letálnímu zakončení, méně často pak k náhlé smrti. U dětí bývá také častá obstrukce v pravé komoře.

Obraz podobný HCM může způsobit např. těžká hypertenze, feochromocytom, neurofibromatóza, hyperparatyreóza, lentiginóza. Hypertrofie myokardu je také typicky přítomna u Friedreichovy ataxie, syndromu Noonanové a syndromu LEOPARD. Asymetrická hypertrofie se nachází také u dětí diabetických matek (Gregor, 2002).

3.6 Terapie

Terapie HCM spočívá v ovlivnění symptomatologie a snížení rizika náhlé srdeční smrti.

3.6.1 Farmakoterapie

Pro potlačení příznaků HCM jako je námahová dušnost a palpitace se nejprve nasazuje terapie **β -blokátory**, která se posléze různě modifikuje (Elliot, 2004). Účinnost těchto medikamentů však závisí na individuální intenzitě zmíněných obtíží. Nejvýraznější úlevu poskytují β -blokátory u nemocných se středně těžkou dušností, anginou pectoris a případně lehčí systémovou hypertenzí. Mezi účinky β -blokátorů patří zpomalení srdeční frekvence, snížení kontraktility myokardu a systolického krevního tlaku.

Jestliže jsou β -blokátory pacientem nesnášené či kontraindikované, používá se alternativa - **verapamil** nebo **diltiazem** (Elliot, 2004), které mají negativně chronotropní i ionotropní účinek, který vede k prodloužení diastoly při poklesu tepové frekvence a snížení nároků srdce na kyslík.

V zahraniční literatuře se často objevuje použití farmaka **disopyramidu** u pacientů s klidovou nitrokomorovou obstrukcí vyššího stupně. V České republice však disopyramid není dostupný.

Blokátory AT₁ pro angiotenzin II se jeví jako přínosné v oblasti snížení hmotnosti LK při potlačení intersticiální fibrózy myokardu. Naznačují to práce na zvířecích modelech (Lim, 2001) a také klinické studie (Yamazaki, 2007).

Dále se objevují informace o možnosti využití vysokých dávek **statinů** k ovlivnění hypertrofie myokardu a zmenšení fibrózy (Patel, 2001).

Fibrilace síní je u většiny nemocných příčinou akutní kardiální dekompenzace, která vyžaduje rychlou elektrickou nebo farmakologickou kardioverzi, ke které se nejčastěji používá **amiodaron**.

3.6.2 Nefarmakologická terapie

V případě výrazné symptomatologie HCM trvající i přes farmakologickou léčbu přichází v úvahu další možnost, kterou je nefarmakologická terapie. Tato terapie sebou však přináší malé (1 - 2%) riziko fatálních komplikací.

Alkoholová septální ablace (ASA) je katetrizační metoda, která je doporučovaná jako alternativa k myektomii. Doporučuje se její provedení u symptomatických pacientů s HCM. Metoda zahrnuje aplikaci absolutního alkoholu do první septální větve zásobující bazální část IVS, čímž je vyvolána nekróza v tomto povodí. To má za následek vytvoření jizvy se ztenčením původně hypertrofického IVS.

Nejstarší nefarmakologickou metodou je chirurgická **myektomie**, která byla zavedena do praxe v šedesátých letech 20. století a je stále považována, především ve Spojených Státech, za metodu volby. Jde o přístup vyžadující sternotomii, při které je provedena resekce části IVS, zejména jeho bazální oblasti, podílející se na obstrukci ve výtokovém traktu levé komory (Gersh *et al.*, 2011; Agarwal *et al.*, 2010; Ommen *et al.*, 2005).

Další modalitou v terapii HCM je **kardiostimulace**. Komorová stimulace vede k asynchronní kontrakci hypertrofické LK, čímž klesá srdeční výdej a snižuje se obstrukční gradient. U pacientů s vysokým rizikem náhlé srdeční smrti (a u některých pacientů se středním rizikem SCD) se implantuje ICD – implantabilní kardioverter/defibrilátor, který je, kromě výše zmíněného efektu na obstrukční gradient, schopen detekovat vznik komorových arytmií (setrvalá / nesetrvalá komorová tachykardie, fibrilace komor) a tyto arytmie elektrickou kardioverzí terminovat (Gersh *et al.*, 2011).

3.7 Prevalence HCM

Hypertrofická kardiomyopatie byla dříve považována za vzácné onemocnění. Dnes je popisována jako kardiovaskulární choroba s prevalencí přibližně 0,2 % (1: 500) v populaci, což z ní činí nejčastější dědičné kardiovaskulární onemocnění (Maron *et al.*, 1995). Mnoho

postižených jedinců však zůstává nediodagnostikovaných, protože se u nich neprojevují klinické příznaky (Adabag *et al.*, 2006). Díky nálezům na elektrokardiogramu (EKG) a jiných zobrazovacích technikách se však zvyšuje náhodné odhalení HCM během rutinního klinického nebo rodinného screeningu (Knickelbine *et al.*, 2009).

3.8 Genetika HCM

HCM je nejčastější monogenně dědičné onemocnění, které je většinou autozomálně dominantní a v přibližně 66 % případů vykazuje familiární výskyt (Bos *et al.*, 2007). Dalšími možnými typy dědičnosti mohou být X recesivní, autozomálně recesivní a mitochondriální dědičnost, které jsou ovšem velmi vzácné. Jak již bylo řečeno, geneticky je HCM velmi heterogenní onemocnění a stále dochází k identifikaci dalších genů, které mají spojitost s tímto onemocněním. Mnoho rodin má také unikátní mutace, což znamená, že screening známých patogenních variant je bezvýznamný. Asi 5 % pacientů má více než jednu sekvenční variantu s patogenním „statusem“ a to buď ve stejném, nebo v různých genech. Dalším úskalím může být neúplná penetrance, která při zdánlivě sporadickém výskytu onemocnění může skrývat familiární formu HCM.

3.8.1 Geny související se vznikem HCM

Není známo jak mutace v genech kódujících sarkomerické proteiny vedou k hypertrofii srdečního svalu a problémům se srdečním rytmem. Sekvenční změny mohou vést k pozměnění kódovaného sarkomerického proteinu, k jeho zkrácení nebo ke snížení množství kódovaného proteinu. Abnormalita nebo nedostatek kteréhokoliv z těchto proteinů může negativně ovlivnit funkci sarkomery a narušit normální srdeční svalovou kontrakci. Výzkum ukazuje, že u postižených jedinců je kontrakce a relaxace srdečního svalu abnormální, ještě předtím, než se hypertrofie vyvine. Nicméně, není jasné, jak jsou tyto problémy kontrakce spojené s hypertrofií nebo s příznaky hypertrofické kardiomyopatie (Frey *et al.*, 2012).

Těžký řetězec β -myozinu je protein produkovaný genem **MYH7** a je hlavní složkou silných myofilament v sarkomeře. Defekt v této bílkovině může vést k rozvoji HCM. Mutace v **MYH7** představují dle literatury spolu s mutacemi v genu **MYBPC3** největší podíl případů HCM. Jedná se především o bodové mutace, kdy bývá postižena hlava myozinu. (Van Driest, 2005).

Genem **MYBPC3** je produkován myozinový vazebný protein C. Tento polypeptid má v sarkomeře strukturální a regulační funkci. Během srdeční embryogeneze se může myozinový vazebný protein C podílet na uspořádání silných myofilament, zatímco v dospělém myokardu,

fosforylace tohoto proteinu ovlivňuje dynamickou regulaci srdeční kontrakce jako odpověď na adrenergní stimul. HCM mohou způsobovat změny v genu myozinového vazebného proteinu C, jako jsou např. missence a splicing mutace, ale také inserce a delece (Watkins, 1995), které vedou ke ztrátě poměrného úseku DNA a vzniku nefunkčního proteinu. Výsledkem je pak narušení struktury silných myofilament a také celé struktury sarkomery (Flashmann, 2004).

Protein kódovaný genem *ACTC1* (alpha cardiac actin 1) patří do skupiny aktinů, která se skládá ze tří hlavních skupin aktinových isoform, alfa, beta a gama. Alfa aktiny se nacházejí ve svalových tkáních a jsou hlavní složkou kontraktálního aparátu. Poruchy tohoto genu byly spojeny s familiární hypertrofickou kardiomyopatií (Matsson *et al.*, 2008).

Geny *TNNT2* a *TNNI3* kódují srdeční troponin T a srdeční troponin I. Jedná se o dva ze tří proteinů, které tvoří troponinový komplex v buňkách srdečního svalu. Troponinový komplex asociuje s tenkými vlákny sarkomer a řídí svalové kontrakce a relaxace pomocí regulace interakce silných a tenkých vláken myofilament. Různé vady genů srdečního troponinu T způsobují hlavně missense mutace a malé delece.

Mutace v genu pro alfa-tropomyosin - *TPM1* představují pouze malé procento HCM. Bylo však identifikováno několik případů HCM způsobených missense mutacemi, které postihují vazebná místa pro troponin T a aktin (Jongbloed *et al.*, 2003).

Další vzácnou příčinou HCM mohou být mutace v genu *ACTA1* pro α -aktin (Olson *et al.*, 2000) a *TTN* (Sato *et al.*, 1999), které společně tvoří méně než 1 % nahlášených případů. Poškozený aktin se hůře váže na myozin, což má za následek sníženou kontraktilitu jednotlivých sarkomer.

Popsány jsou také extrasarkomerické mutace. Nejčastěji jde o proteiny cytoskeletu, které odpovídají za organizaci a umístění sarkomery uvnitř buňky. Defekty těchto bílkovin mohou také vést k HCM. Základní součástí cytoskeletu je velmi dlouhý protein titin - produkt genu *TTN*, který má důležitou roli v kosterní a srdeční svalovině. Ve svalových buňkách je titin nezbytnou součástí sarkomer. Poskytuje sarkomeře pružnost a stabilitu. Má elastickou část, která se napíná během diastoly a zvyšuje tak účinnost kontrakce během systoly. Spolupracuje s aktinem a myozinem a udržuje části sarkomer na místě, kde dochází ke svalové kontrakci a relaxaci. Kromě toho vědci zjistili, že titin hraje roli v chemické signalizaci a také při tvorbě nové sarkomery. Mutace v genu *TTN* se vyskytují zejména v případech dilatační kardiomyopatie, ale ve vzácných případech mohou způsobovat také HCM (Lewinter *et Granzier*, 2014).

HCM může být také způsobena mutacemi v genech kódujících proteiny Z-disku jako **CSRP3** (Geier *et al.*, 2003) a **TCAP** (Hayashi *et al.*, 2004). Titin-cap protein (T-cap protein), kódovaný genem **TCAP** navzájem spojuje tenké myofibrily. Prozatím nalezené mutace narušují vazbu s titinem a jsou příčinou HCM u několika rodin s typickým fenotypem HCM. T-cap protein je důležitý během diferenciací srdečního svalu, což může znamenat, že HCM může být podmíněna změnami již v období embryogeneze.

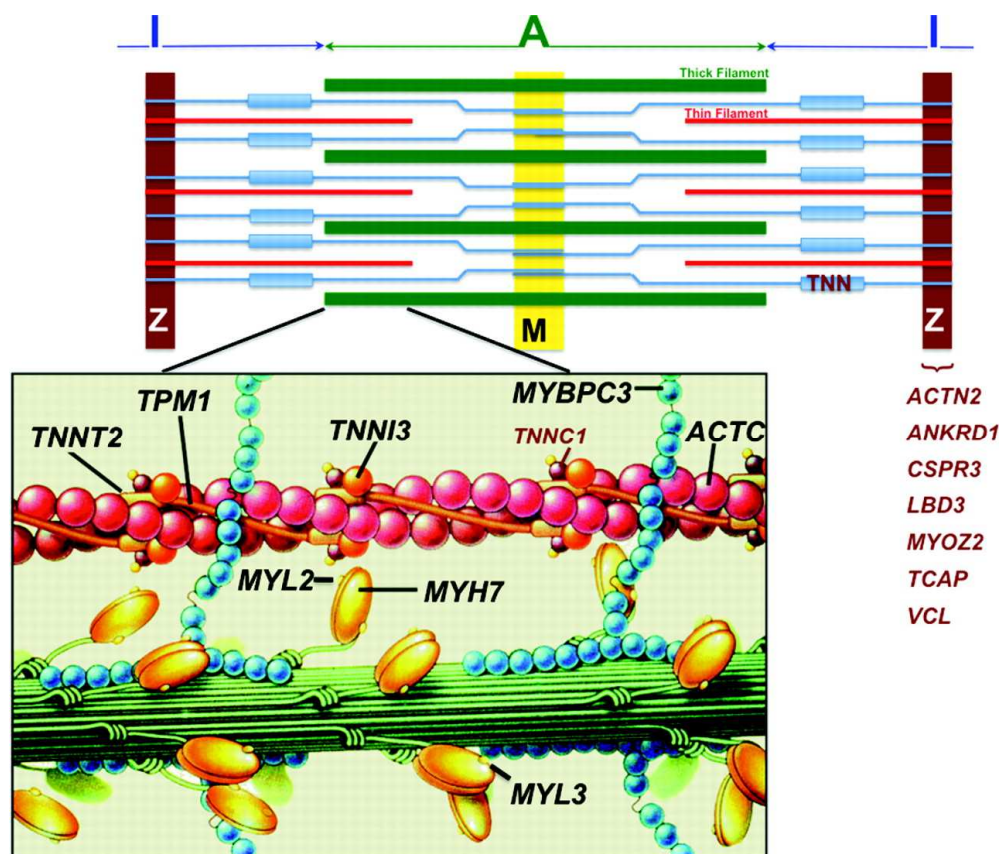
γ 2 podjednotku svalové cAMP-dependentní proteinkinázy kóduje gen **PRKAG2**. Poškození tohoto enzymu vede ke skladování glykogenu v kardiomyocytu a svalů a dochází tak k jeho hypertrofii (Blai *et al.*, 2001).

Další z možných příčin HCM může být mutace genu **JPH2** (junctophilin 2). Proteiny kódované tímto genem jsou spojovány s distribucí vápníku v srdeční svalovině (Landstrom *et al.*, 2007).

Existuje také mnoho dalších kandidátních genů, které mohou mít diagnostický význam pro HCM. V rámci diplomové práce byly analyzovány následující geny: **ANKRD1** (Ankyrin repeat domain 1) - Studie na potkaních kardiomyocytech ukazují, že tento gen funguje jako transkripční faktor. Může působit také jako nukleární faktor transkripce, který negativně reguluje expresi srdečních genů (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ANKRD1>). **CALR3** (Calreticulin 3) - Protein kódovaný tímto genem patří do rodiny kalretikulínů, jejímiž členy jsou chaperony vázající vápník, lokalizované zejména v endoplazmatickém retikulu. Calreticulin 3 je lokalizován na endoplazmatickém retikulu lumen. Mutace tohoto genu byly spojeny s familiární hypertrofickou kardiomyopatií (Chiu *et al.*, 2007). **CAV3** (Caveolin 3) - kóduje protein, který hraje roli v mechanismu opravy sarkolemy kosterního svalstva a kardiomyocytů, kterým umožňuje rychlé opětovné uzavření membrán narušených mechanickým poškozením. Komunikuje přímo s podjednotkami G-proteinu α a může funkčně regulovat jejich aktivitu (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CAV3>). Gen **DES** (Desmin) - kóduje protein desmin, který se nachází v srdečním svalů. V příčně pruhovaném svalstvu tvoří vláknitou síť, spojující myofibrily k sobě navzájem a z periferie Z-disků k plazmatické membráně (Milner *et al.*, 1999). **GLA** (Galactosidase Alpha) - poskytuje instrukce k syntéze enzymu alfa-galaktosidázy A, která je aktivní v lysozomech (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GLA>). **LDB3** (LIM Domain Binding 3) - kóduje homodimerní glykoprotein, který hydrolyzuje terminální alfa-galaktosylové zbytky z glykolipidů a glykoproteinů. Nachází se taktéž v srdečním svalů (Bos *et al.*, 2009). **MYLK2** (Myosin Light Chain Kinase 2) - tento gen kóduje lehký řetězec kinázy myosinu, což je kalcium/kalmodulin dependentní enzym, který je exprimován výlučně v dospělém kosterním svalů

(Aoki *et al.*, 2000). **MYOM1** (Myomesin 1) - jeho protein váže myosin, titin a tenký paměťový myosin. Titin, spolu se svými přidruženými proteiny, propojuje hlavní struktury sarkomery - M pásy a Z disky (Siegert *et al.*, 2011). **MYOZ2** (Myozenin 2) - kóduje sarkomerický protein, který váže kalcineurin a fosfatázu, jež se podílí na přenosu kalcium-dependentních signálů v různých typech buněk. Může hrát také roli v myofibrilogenezi (Osio *et al.*, 2007). **NEXN** (Nexilin F-actin binding protein) - gen kóduje protein vázající filamentární aktin, který může fungovat v buněčné adhezi a migraci. Podílí se na regulaci migrace buněk přes spojení s aktinovým cytoskeletem. Má zásadní roli v udržování Z linie a integrity sarkomer (Wang *et al.*, 2010). **RAF1** (Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase) - kóduje protein, který je součástí signální dráhy RAS / MAPK, která přenáší signály z vnější strany buňky do buněčného jádra. RAS / MAPK signalizace pomáhá kontrolovat růst a proliferaci buněk, při které buňky dozrávají a získávají specifické vlastnosti (diferenciace). Gen RAF1 patří do skupiny genů známých jako onkogeny (Carcavilla *et al.*, 2013). **VCL** (Vinculin) – produkt tohoto genu je cytoskeletální protein důležitý pro těsná mezibuněčná spojení a uchycení buněk k extracelulární matrix. Předpokládá se, že funguje jako jeden z několika interagujících proteinů podílejících se ukotvení F-aktinu do buněčné membrány (Alcalai *et al.*, 2008).

Genetickým testováním můžeme odhalit přibližně 60 % případů HCM, ale jelikož i zbylé procento případů vykazuje familiární výskyt, lze předpokládat i tady genetický podtext. Mutace se mohou objevovat v nekódujících anebo regulačních oblastech výše popsaných genů nebo jiných, dosud neznámých genech. Lokalizaci některých zmíněných genů znázorňuje **obr. 8**. Frekvenci záchytu patogenních sekvenčních variant způsobujících HCM ve vybraných genech přibližuje **tab. 1**.



Obr. 8 Lokalizace genů spojených s HCM v sarkomeře a její těsné blízkosti

Tabulka 1 Frekvence záchytu patogenních sekvenčních variant způsobujících HCM ve vybraných genech (Cirino et Ho, 2014)

Protein	Gen	Frekvence
Myozin-7	<i>MYH7</i>	40 %
Myozinový vazebný protein C	<i>MYBPC3</i>	40 %
Srdeční troponin T	<i>TNNT2</i>	5 %
Srdeční roponin I	<i>TNNI3</i>	5 %
α-tropomyozin	<i>TPM1</i>	2 %
Regulační podjednotka lehkého řetězce myozinu	<i>MYL2</i>	Neurčena
Esenciální podjednotka lehkého řetězce myozinu	<i>MYL3</i>	1 %
α -aktinin-1	<i>ACTC1</i>	Neurčena
Cysteine and glycine-rich protein 3	<i>CSRP3</i>	Neurčena
α -aktinin-2	<i>ACTN2</i>	Neurčena
Myozin-6	<i>MYH6</i>	Neurčena
Titin-Cap	<i>TCAP</i>	Neurčena
Troponin C	<i>TNNC1</i>	Neurčena
Srdeční fosfolambdan	<i>PLN</i>	Neurčena
Myozenin-2	<i>MYOZ2</i>	Neurčena
Nexilin	<i>NEXN</i>	Neurčena

3.9 Molekulární podstata HCM

Ve vyvíjejících se srdečních komorách závisí růst a zrání kardiomyocytů na signálech ze sousedních tkání. Peptid endokardu - **neuregulin** je nutný k vývoji srdečních komor a je ligandem ErbB receptoru v myokardu. Při narušení této signalizace mutací dochází ke vzniku příliš tenké komory v průběhu embryogeneze a úmrtí plodu (Masopust, 2005). Dalším zdrojem chemických signálů, které ovlivňují vývoj myokardu, jsou buňky epikardu.

Vývoj srdečních chlopní a povrchové vrstvy endokardu je zprostředkován signálními proteiny **TGF- β** (transforming growth factor- β) kardiomyocytů. Při chybění BMP receptoru pro TGF- β dochází k abnormalitám chlopní a defektům komorového septa.

Dalšími důležitými komponenty signálních drah jsou **endothelin-1** a již zmíněný neuregulin, které se podílí na vývoji Purkyňových buněk převodního systému srdečního, které ovládají rytmické stahy myokardu.

Patologická hypertrofie je odpovědí na stresové signály a poškození myokardu. Následkem této hypertrofie dochází ke změně využívání energie v kardiomyocytech z aerobní na anaerobní – glykolytickou formu typickou pro fetální období. Dochází k aktivaci genů, které regulují svalovou kontrakci a přesuny Ca^{2+} . Je pravděpodobné, že blokáce těchto stresových signálů může být cílem terapie HCM.

Hypertrofii může doprovázet dilatace komor, která je důsledkem nerovnováhy mezi proapoptóзовými a antiapoptóзовými signály. Nedostatek cytokinového receptoru glykoproteinu 130, který je důležitý pro přežívání srdečních buněk způsobuje jejich nadměrnou apoptózu. Terapie srdečního selhání a kardiomyopatií by pak mohla spočívat v potlačení apoptózy.

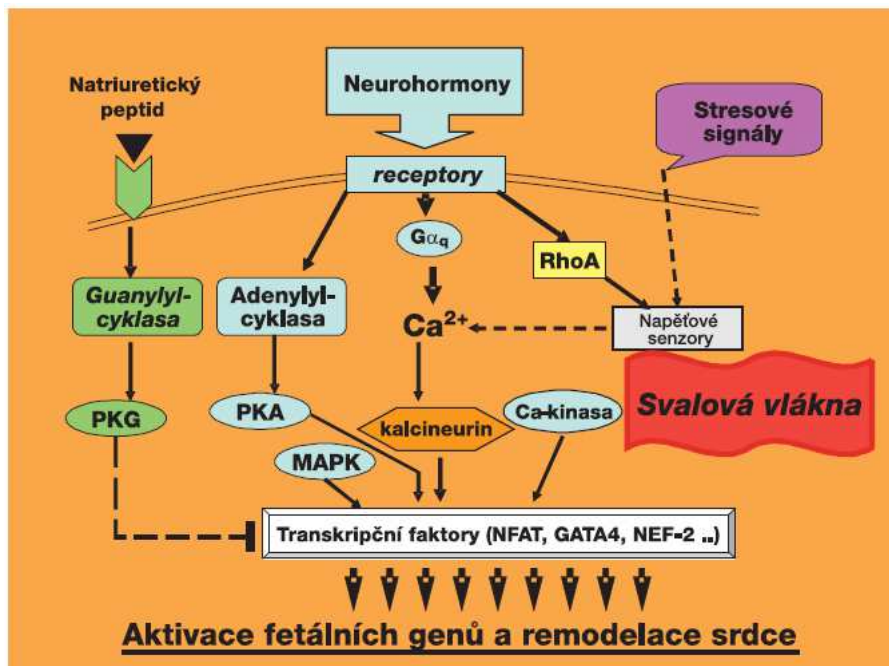
3.9.1 Signální dráhy spojené s HCM

Za vznik srdeční hypertrofie jsou z molekulárního hlediska zodpovědné některé signální dráhy: kalcium dependentní signální dráha, kalcineurinová dráha a β -adrenergní signalizace. Takzvaní druzí poslové těchto drah jsou cyklické molekuly cAMP a cGMP.

3.9.1.1 Ca^{2+} signalizace

Vápenaté ionty hrají majoritní roli v regulaci růstu srdce a jeho kontraktlní funkci. Ca^{2+} ionty vstupují do kardiomyocytů během srdečního stahu (Masopust, 2005). Nahromadění vápníku uvnitř buněk způsobí další uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula přes ryanodinové receptory (RyR). Intracelulární koncentrace Ca^{2+} se 10x zvýší a dojde k jeho vazbě na troponin C kontraktlního aparátu. Tento děj stimuluje svalovou kontrakci (systolu). K relaxaci (diastole) pak dojde po návratu Ca^{2+} zpět do

sarkoplazmatického retikula za účasti specifické Ca^{2+} -ATPasy (SERCA), která je schopna pumpovat vápenaté ionty zpět po interakci s fosfolambdanem. V případě, že je fosfolambdan nefosforylovaný, zamezuje návratu Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula působením SERCA. Fosforylace proteinu prostřednictvím proteinkinázy PKA snižuje jeho inhibiční funkci a bude docházet k relaxaci myokardu (viz obr. 9).



Obr. 9 Ca^{2+} signalizace spojená s HCM

Převzato z: http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2005/LA0105/molekulova.pdf

3.9.1.2 β -adrenergní signalizace

Agonisté membránových β -adrenergních receptorů stimulují srdeční činnost. Po vazbě katecholaminu na receptor spojený G-proteinem s adenylátcyklázou se zvýší intracelulární koncentrace cAMP a dojde k aktivaci PKA. Tato signalizace je porušena v případě srdečního selhání. Odpovědí na srdeční kolaps je chronická aktivace sympatiku a tím také trvalý vzestup katecholaminů v oběhu, na což reagují kardiomyocyty sníženou citlivostí a downregulací β -adrenergních receptorů. Porucha β -adrenergní signalizace je jedním z hlavních patogenetických mechanismů srdečního selhání (Masopust, 2005).

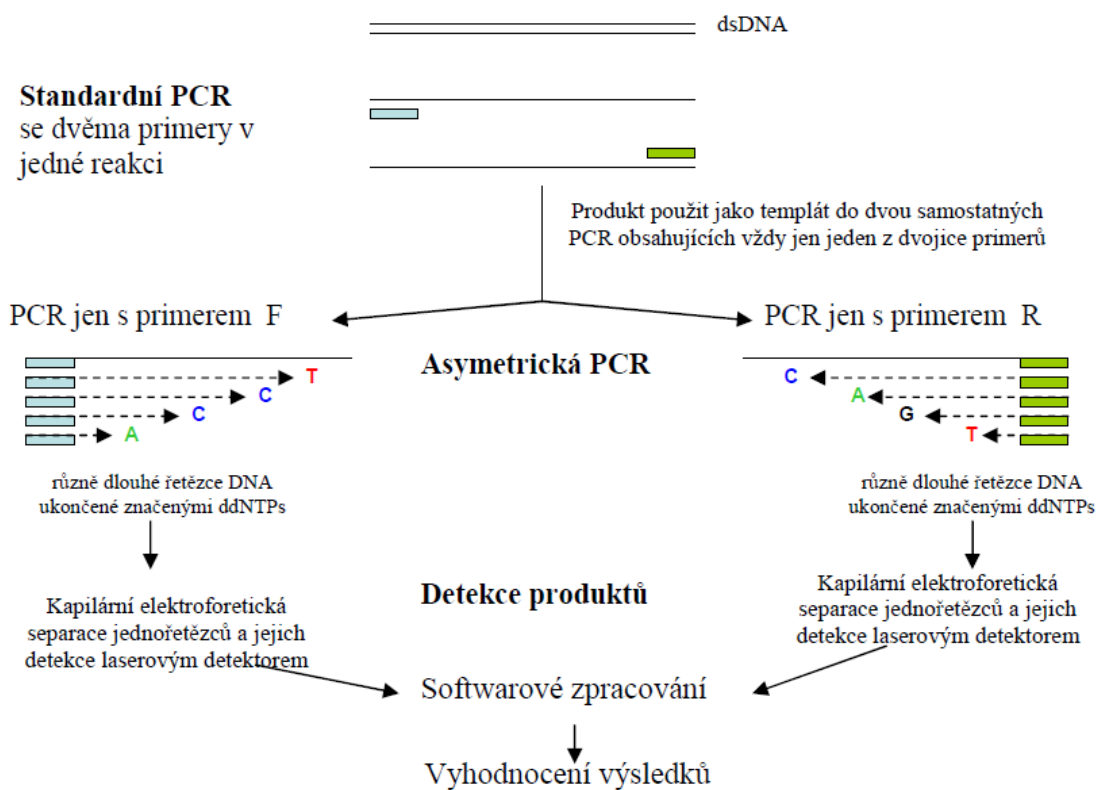
3.10 Molekulární diagnostika

3.10.1 Sangerova metoda sekvenování

Frederik Sanger v roce 1977 (Sanger *et al.*, 1977) vynalezl enzymatickou metodu sekvenování, která byla první generací komerčně dostupného sekvenování. I přes své limity jako časová náročnost a pracnost se Sangerovo sekvenování stalo velmi rozšířenou metodou, která je v novější, automatizované verzi využívána dodnes v celém světě. První automatický sekvenátor (ABI370) uvedla na trh firma Applied Biosystems. Přístroj využívá k separaci úseků DNA kapilární elektroforézu a fluorescenčně značené primery, které velmi usnadňují následnou analýzu. Sekvenátor ABI370 umožňoval osekvenovat 500 kb za den (Liu *et al.*, 2012). Pomocí sekvenátorů založených na Sangerově metodě byl poprvé přečten první lidský genom. V průběhu tohoto procesu však vyšlo najevo několik limitací této metody jako je potřeba vyšší výkonosti, přesnosti a nižší náklady. Sangerova metoda sekvenování má stále své využití a to především pro sekvenování PCR produktů a malé sekvenační projekty. Pro náročnější projekty o větší kapacitě se využívají sekvenátory druhé generace, které snížily dobu potřebnou k přečtení dlouhých DNA sekvencí a také cenu (Koubková *et al.*, 2014).

Sekvenování je metoda, která slouží ke stanovení primární struktury DNA. Sangerova metoda sekvenování je enzymová metoda, která využívá při stanovení sekvence DNA matrici ve formě PCR produktu, ke které se pomocí DNA-polymerázy komplementárně syntetizují různě dlouhé řetězce DNA. Tato metoda je používána při automatickém sekvenování. Materiálem pro automatické sekvenování jsou fragmenty DNA, které vznikají při asymetrické PCR. První část tohoto uspořádání PCR probíhá standardně, tzn. se dvěma primery v jedné reakci. V druhé části probíhá vlastní asymetrická PCR, kdy je v jedné reakci použit vždy jen jeden primer. Dochází tak k amplifikaci jen jednoho ze dvou řetězců. V reakční směsi jsou spolu se standardními deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTPs) použity i jejich čtyři fluorescenčně značené analogy dideoxyribonukleozidtrifosfáty (ddNTPs), které se inkorporují do rostoucího řetězce a fungují jako koncové inhibitory elongace, neboť postrádají terminální 3'-hydroxylovou skupinu. To umožňuje vytvořit dle matrice různě dlouhé značené fragmenty DNA. Takto získané fluorescenčně značené produkty jsou následně elektroforeticky za denaturačních podmínek rozděleny v kapiláře automatického sekvenátoru a detekovány. U automatických přístrojů je délka fragmentů snímána pomocí laserového detektoru. Laserem excitované fluorescenční barvičky emitují záření různých vlnových délek podle typu použitého fluorochrómu. Pořadí nukleotidů je automaticky odečítáno detektorem a

zaznamenáváno. Sekvence je následně komplexně analyzována speciálním softwarovým programem (viz obr. 10).



Koncové inhibitory elongace (dideoxynukleotidy) - A C G T

Obr. 10 : Schéma Sangerova sekvenování

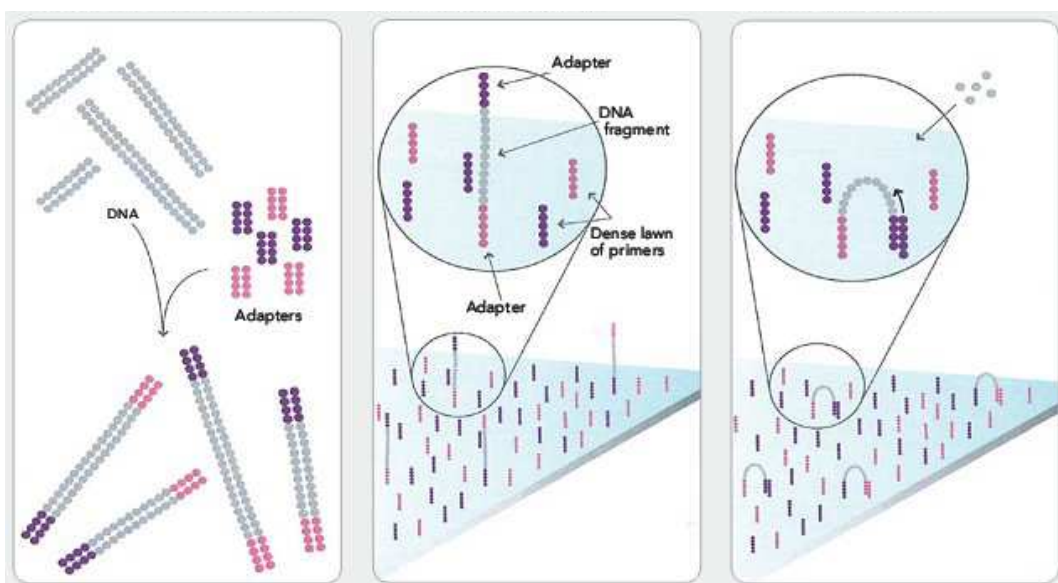
3.10.2 Sekvenování nové generace (NGS)

Zavedení metody masivně paralelního sekvenování do výzkumu v oblasti genomiky mělo poprvé dovolit osekvenovat celý lidský genom za pouhý zlomek ceny a času. Stalo se tak nejen v oblasti genomiky, ale také v onkologickém výzkumu a výzkumu dědičných nemocí. Vše zprostředkovaly sekvenátory tzv. druhé generace, které poskytují sekvenování tisíců molekul DNA zároveň za významně kratší dobu potřebnou k přečtení dlouhých DNA sekvencí. Od roku 2005 vstoupily na trh tři platformy: Roche 454 genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System. V současné době na trhu převládají platformy firmy Illumina (Zhou *et al.*, 2010). Všechny technologie sekvenování druhé generace využívají různou chemii, ale sdílejí stejný princip, který spočívá v úpravě templátové DNA a vytvoření knihovny amplikonů, sekvenování a detekce inkorporovaných nukleotidů a následné analýze dat. Rozdíly mezi jednotlivými platformami jsou pouze v kombinaci přístupů v jednotlivých krocích sekvenačního běhu.

3.10.2.1 *Illumina/Solexa*

Jednou z platforem využívající technologii založenou na amplifikaci DNA templátu (PCR-based technologies) syntézou je Illumina/Solexa, která uvedla na trh první sekvenátor založený na principu tzv. bridge PCR (můstková amplifikace), kdy předem upravená genomická DNA hybridizuje na transparentní povrch reakční komůrky, tzv. flow cell za současného využití reverzibilně modifikovaných nukleotidů (Xuan *et al.*, 2013).

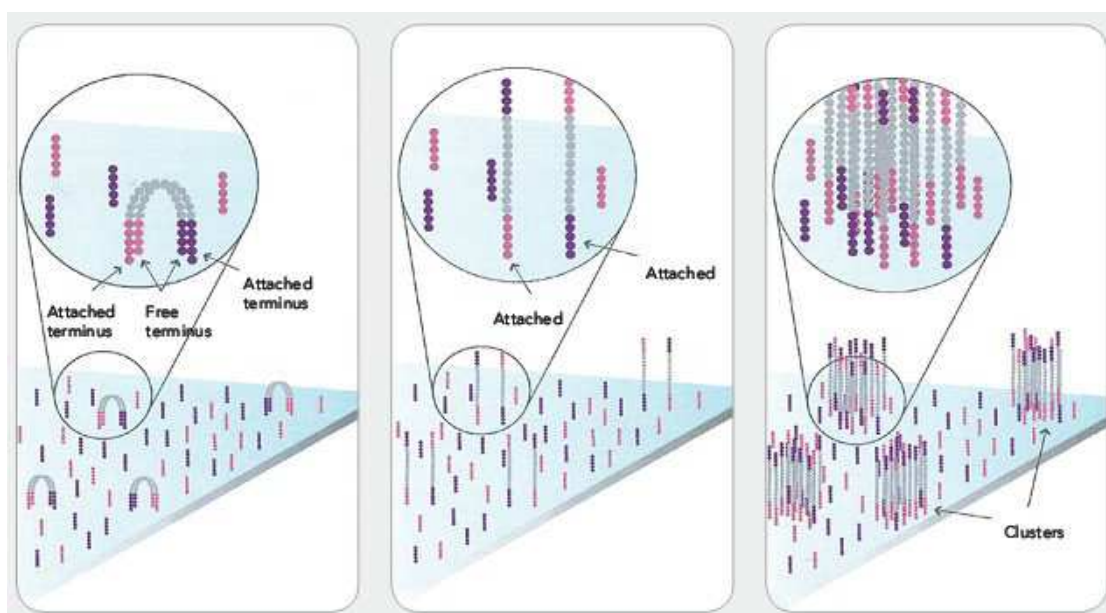
Předem modifikovaná DNA je po denuraci pomocí připojených adaptorů pevně nahybridizována k reakční komůrce, která je hustě pokryta komplementárními adaptory. Po přidání reakční směsi nutné k proběhnutí amplifikace je DNA prodlužována z adaptorů (tvorba ds DNA), které slouží zároveň jako primery. Vzniklá dvouvláknová DNA je denaturována, původní templátové vlákno se odmyje a nově nasyntetizované vlákno DNA zůstává pevně navázáno na povrchu flow cell. Toto vlákno se „ohne“ a svým volným koncem hybridizuje k dalším adaptorům/primerům na povrchu reakční komůrky (**viz obr. 11**).



Obr. 11 První fáze bridge PCR - navázání adaptorů na templát, připojení templátového vlákna k adaptorům na flow cell, zahájení elongace ssDNA vlákna z adaptoru

Převzato a upraveno z: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>

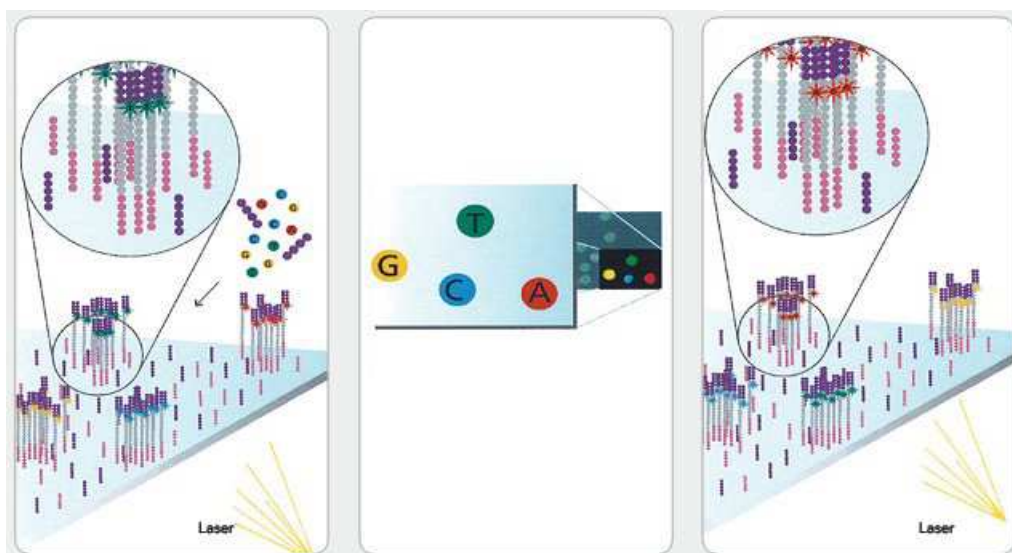
Během dalšího PCR cyklu je adaptor opět prodloužen polymerázou a vzniká tak dvouvláknový „most“. Proces se cyklicky opakuje a po vytvoření mnohonásobného počtu mostů dojde k denuraci, odštěpení a odmytí reverzních řetězců. Na flow cell tak zůstanou pouze tzv. klastry tvořené asi tisícem identických kopií DNA fragmentů vhodných k sekvenaci (**viz obr. 12**).



Obr. 12 Druhá fáze bridge PCR - dvouvláknové mosty, denaturované dsDNA mosty, klastry naamplifikované DNA

Převzato a upraveno z: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>

Sekvenování začíná po hybridizaci sekvenačních primerů k adaptorovým sekvencím v přítomnosti polymerázy a 4 různě fluorescenčně značených nukleotidů s inaktivní 3'-OH skupinou (nedochází tak dále k elongaci řetězce a inkorporován je vždy pouze jeden nukleotid). Po začlenění nukleotidu do DNA je zaznamenána pozice a typ tohoto nukleotidu CCD kamerou (**viz obr. 13**). Terminační skupina na 3' nukleotidu a fluorescenční barvička musí být před proběhnutím dalšího cyklu odstraněna. Cyklus se stále opakuje a sekvenace každého klastru je generována speciální algoritmem, který každé bázi přiděluje jedinečnou hodnotu, na jejímž základě jsou následně vyřazovány sekvenace nízké kvality (Shokralla *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2013, Zhou *et al.*, 2010).



Obr. 13 Třetí fáze bridge PCR – Určení první inkorporované báze, zobrazení první báze, určení druhé inkorporované báze

Sekvenátory Illumina jsou limitovány relativně krátkou délkou sekvenačních čtení v závislosti na typu přístroje. V našem případě byla sekvenace prováděna na přístroji Miseq, který nabízí délku čtení 2x300 bp. V porovnání se Sangerovým sekvenováním produkují sekvenátory Illumina mnohem více dat za kratší časový úsek a méně peněz, avšak s vyšší chybivostí, která vede např. k falešné pozitivitě či negativitě při odečítání sekvenačních variant. Další nevýhodou může být nerovnoměrné pokrytí v AT a CG bohatých oblastech DNA sekvence. Největší nevýhodou pak představuje samotné množství produkovaných dat, která potřebují své uložení, což může nakonec celý sekvenační proces mnohonásobně prodražit (Zhou *et al.*, 2010).

3.10.2.2 Cílené sekvenování (*Target Enrichment*)

Technika cíleného sekvenování umožňuje sekvenovat vybrané oblasti genomu nebo geny, což je další značnou úsporou času, financí a také prostoru ke skladování dat. NGS v tomto případě umožňuje identifikaci takových vzácných variant, které jsou Sangerovým sekvenováním nezachytitelné nebo je jejich identifikace příliš drahá. Při cíleném sekvenování s vysokým pokrytím (coverage) mohou být charakterizovány sekvenační varianty s frekvencí v populaci pod 1 % (Koubková *et al.*, 2014).

Jedním ze způsobů přípravy amplifikované knihovny je tzv. targeted capture. Jedná se o techniku, která využívá specifické sondy pro záchyt námi vybraných oblastí DNA a následné obohacení vzorku o tyto oblasti multiplex PCR. V našem případě byla použita hybridizační technika SeqCap EZ technology společnosti Roche NimbleGen, která je vhodná k sekvenaci stovek genů v malém i větším počtu vzorků. Na trhu je nabídka standardních kitů, které jsou

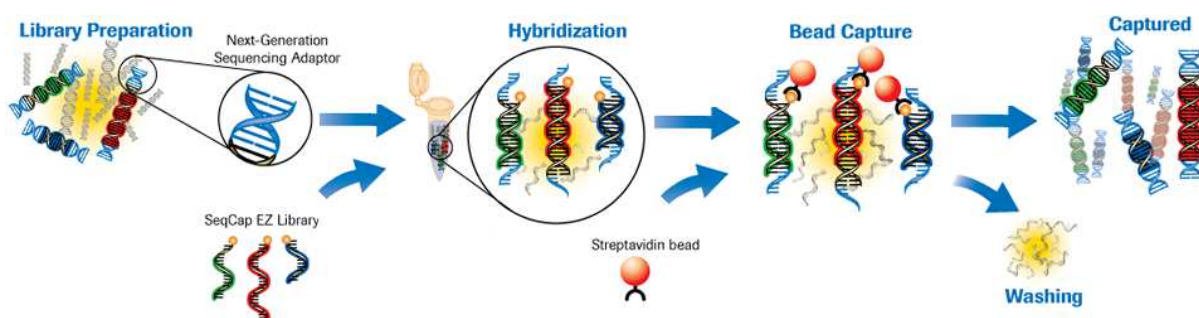
navrženy pro záchyt nejběžnějších mutací, nebo lze využít možnost navržení vlastních DNA sond se specifickou oblastí zájmu (Sikkema-Raddatz *et al.*, 2013).

3.10.2.3 *Nimble Gen Seq Cap EZ Choice Systém*

SeqCap EZ Choice Library system (NimbleGen Roche, Madison, WI, USA) je metoda obohacování cílových sekvencí, která pokrývá region zájmu mnoha oligomery (80-105 bp dlouhými) DNA prób (www.nimblegene.com).

První fází celého procesu je příprava sekvenační knihovny, která začíná fragmentací genomické DNA. Nejčastěji využívaná délka fragmentů pro platformu Illumina je přibližně 150-300 bp. DNA může být štěpena fyzikálně - nebulizací dusíkem či sonikací pomocí ultrazvukových vln nebo enzymaticky. Nevýhodou fyzikálního štěpení je potřeba úpravy (zatupení) vzniklých tzv. „lepivých“ konců fragmentů DNA pomocí enzymů (Knierim *et al.*, 2011).

Po fragmentaci DNA jsou na konce fragmentů naligovány sekvenační adaptory a indexy v předvychytávací LM-PCR (Ligation-mediated PCR). Takto jsou fragmenty připraveny k vychytání cílových sekvencí. K fragmentům DNA s adaptory jsou přidány specifické sondy značené biotinem a proběhne první hybridizace. Dále je do reakce přidán streptavidin, který se naváže na biotinem značené sondy. Následuje přečištění. Cílové fragmenty s námi hledanými oblastmi jsou dále ammplifikovány v další LM-PCR (**viz obr. 14**). Na konci tohoto procesu je vzorek připraven pro analýzu na sekvenátoru (<https://roche-biochem.jp/products/NimbleGen/20-seqcapez/>).



Obr. 14 Příprava NibleGen knihovny ampliconů obohacováním o cílové sekvence metodou SeqCap

Převzato z: <https://roche-biochem.jp/products/NimbleGen/20-seqcapez/>

3.10.2.4 *Analýza sekvenačních dat*

Nejsložitější částí sekvenačního procesu je vyhodnocení a interpretace získaných dat. Bioinformatici, kteří musí během analýzy spolupracovat s pracovníky laboratoří, zpracovávají

obrovské množství dat. Analýza dat má 3 základní fáze – primární, sekundární a terciální. Primární analýza spočívá v převedení signálu z CCD kamery, která detekuje přesnou polohu inkorporovaných nukleotidů, na digitální signál. Sekundární analýza vyhodnocuje kvalitu dat z primární analýzy, filtruje je podle konkrétních parametrů a polohy nukleotidů v sekvenovaných úsecích jsou porovnávány s referenční genomovou sekvencí. Nejnovější verze genomové sekvence, GRCh38/hg38, byla zveřejněna v prosinci 2013 referenčním genomovým konzorciem a od GRCh37.p13 (hg 19) se liší novým objasněním centromerických oblastí, vyšší přesností duplikovaných segmentů a menším množstvím mezer v sestavených sekvencích (Cunningham *et al.*, 2015). Terciální analýza zahrnuje posouzení kauzality nalezených sekvenčních variant pomocí databází záchytů, predikčních programů a odborných publikací. Jedná se o detailní analýzu získaných sekvencí vyšetřovaného souboru vzorků (Majewski *et Rosenblatt*, 2012). Jedním z vhodných programů k vyhodnocování dat je program SeqNext společnosti JSI medical systems, který je zároveň kompatibilní s výstupními raw daty sekvenátoru. SeqNext přirovnává získané sekvence k referenčnímu genomu (alignment) a detekuje SNP (single nucleotide polymorphism), inserce a delece o libovolné délce, stejně jako CNV (copy number variants). Nabízí přístup k SNP databázím 1000 genomes, COSMIC a CLINVITAE. Další informace program získává ze zdrojů, jako jsou NCBI, PubMed, HGMD atd. K hodnocení patogenity nalezených sekvenačních variant jsou používány online predikční programy jako např. PolyPhen-2, AlignGVGD, SIFT, Mutation Tester, UMD-Predictor (<http://www.jsi-medisys.de/>).

Predikční program **PolyPhen-2** (Polymorphism Phenotyping v2) hodnotí možný dopad aminokyselinové záměny na strukturu a funkci proteinu na základě fyzikálních vlastností a evoluční konzervovanosti aminokyseliny v dané pozici. Výstupem programu jsou 2 parametry – HumDiv a HumVar, které jsou vyjádřeny číselným skóre, které je převedeno na kvalitativní hodnocení vlivu dané missense mutace na funkci proteinu: benign (tolerovaná záměna, která s nejvyšší pravděpodobností nebude mít vliv na funkci proteinu), possibly damaging (s určitou pravděpodobností by záměna mohla mít vliv na funkci proteinu) a probably damaging (netolerovaná záměna, která s nejvyšší pravděpodobností bude mít vliv na funkci proteinu) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Analytický algoritmus predikčního softwaru **SIFT** (Sorting Intolerant From Tolerant) posuzuje konzervovanost dané mutované aminokyseliny u příbuzných sekvencí proteinů jiných organismů. SIFT vyhledává sekvence těchto příbuzných proteinů pomocí nástroje PSIBLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool). Výstupem tohoto posouzení je predikce tolerance aminokyselinové záměny v dané pozici (tolerated/

damaging). Jedná se o tzv. SIFT score, které nabývá hodnot v rozmezí 0-1. Pokud má sekvenční změna vliv na funkci proteinu, nabývá hodnot $\leq 0,05$ (damaging). Tolerované sekvenční změny nabývají hodnot $> 0,05$ (tolerated) (<http://sift.jcvi.org/>).

AlignGVGD kombinuje biofyzikální vlastnosti aminokyselin a alignment proteinových sekvencí. Odhaduje riziko vlivu dané sekvenční změny na funkci proteinu, které je rozděleno do 7 stupňů (C0 – C65) od nejmenšího po nejvyšší. Zařazení změny do skupiny s určitým rizikem je dáno jako průběh hodnot GV (Grantham Variation score) a GD (Grantham Difference score) (<http://agvgd.hci.utah.edu/>).

Webový server **SROOGLE** (Splicing Regulation Online Graphical Engine), umožňuje analýzu sestřihových mutací. Vstupní data zahrnují sekvence exonu a lemujících intronů. Grafický výstup prohlížeče zobrazuje čtyři jádrové sestřihové signály se skóre založeným na devíti různých algoritmech a nejdůležitějších sekvencích, které patří k 13 různým skupinám SRS (splicing regulatory sequence). Rozhraní nabízí také možnost zkoumat vliv bodových mutací v libovolné pozici, stejně jako řadu dalších metrik a statistických opatření týkajících se každého potenciálního signálu. SROOGLE je k dispozici na adrese <http://sroogle.tau.ac.il>.

Vliv na sestřih u exonických a intronických mutací, které vedou ke změnám sestřihu DNA, hodnotí online predikční program **Human Splicing Finder**. Tento nástroj pomáhá při studiu sestřihu pre-mRNA. Pro výpočet konsenzuálních hodnot potenciálních sestřihových míst a hledání míst větvení využívá HSF speciální algoritmy a dostupné matice k identifikaci exonických a intronových motivů (<http://www.umd.be/HSF3/>).

3.10.2.5 *Interpretace sekvenačních dat*

Sekvenační varianty lze považovat za patogenní (nebo pravděpodobně patogenní) na základě převahy následujících kritérií:

- 1 Kosegregace HCM fenotypu (hypertrofie LK) u členů rodiny.
- 2 Dřívější publikace nebo identifikace jako příčina HCM.
- 3 Není nalezena u nepříbuzných etnicky shodných zdravých kontrol.
- 4 Změna struktury nebo funkce proteinu (posun čtecího rámce, zkrácení transkriptu).
- 5 Změna aminokyselinové sekvence v evolučně mezidruhově konzervované oblasti proteinu (důležité pro zachování buněčné funkce).

Na druhou stranu, existuje mnoho aminokyselinových substitucí DNA, které jsou považovány za benigní i když jejich procento v populaci dosahuje rozmezí 0,5 - 1 %, což obecně odpovídá patogenním variantám. Význam pro vznik onemocnění v těchto případech

zůstává nejasný i po aplikaci kritérií pro patogenitu. Ve výsledku pak predikční genetické programy zařadí tyto sekvenační varianty do skupiny nejasného významu - UV/VUS (Variant of uncertain significance) s prakticky žádnou klinickou použitelností pro screening v rodinách (Tester *et* Ackerman, 2011).

Odlišení patogenní varianty od UV je stále častějším problémem a to hlavně kvůli interpretaci výsledků. To, že se UV vyskytují častěji v kontrolních lidských populacích, než bylo doposud známo (genetická variabilita souhrnně označována jako „šum pozadí“) zdůrazňuje potřebu více definitivních kritérií pro rozlišení patogenních mutací a benigního genetického „šumu“ (Landstrom *et* Ackerman, 2010).

Laboratorní testovací strategie pro vytváření výsledkových zpráv se velmi liší, za použití 3 až 7 popisných tříd pro patogenitu. Vzniká tedy možnost různé interpretace jedné a též mutace u různých laboratoří.

Navíc v klinické praxi existují případy, kdy se patogenní klasifikace variant může v průběhu času měnit díky nově dostupným relevantním informacím (např. VUS může být přidělen patogenní význam nebo naopak) (Maron *et al.*, 2012).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Soubor pacientů

Diplomová práce vznikla ze souboru 170 pacientů s klinickou diagnózou HCM. V první fázi byly hodnoceny výsledky NGS analýzy „hlavního souboru genů“ (*ACTC1*, *ACTN2*, *CSPR3*, *JPH2*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *PLN*, *MYL2*, *MYL3*, *MYPN*, *PRKAG2*, *TCAP*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPMI*, *TRIM54*, *TRIM55* a *TRIM63*). Tyto výsledky pocházely z rutinních i z granových analýz Laboratoře molekulární biologie, Oddělení lékařské genetiky, LAG, Nový Jičín.

Po vyhodnocení „hlavní skupiny genů“ bylo vybráno 30 pacientů bez nálezu patogenní sekvenční varianty. V tomto selektovaném souboru byla hodnocena NGS analýza „doplňující skupiny genů“ (*ANKRD1*, *CALR3*, *CAV3*, *DES*, *GLA*, *LDB3*, *MYLK2*, *MYOM1*, *MYOZ2*, *NEXN*, *RAF1*, *TTN* a *VCL*).

Ověření pozitivních záchytů z NGS analýz bylo provedeno pomocí Sangerova sekvenování.

4.1.2 Biologický materiál

Biologickým materiálem pro hledání mutací byla nesrážlivá krev odebraná do zkumavky s EDTA.

4.1.3 Použité chemikálie

Puregene Blood Core Kit C (Qiagen), 70% ethanol (Repharm a.s), 85% ethanol (Repharm), Isopropylalkohol (Repharm a.s), PCR H₂O (Top-Bio), HPLC voda (Merck), Agencourt CleanSeq (Beckman Coulter), FastStart PCR Master (Roche), Primery (Generi Biotech), Exonuclease I, (ThermoScientific), FastAP Thermosensitive alkaline Phosphatase (ThermoScientific), BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

4.1.4 Přístrojové vybavení

Stolní centrifuga *SpeedMill* (AnalytikJena)

Stolní centrifuga *Multi-Spin* (Biosan)

Termoblok *TS-100* (Biosan)

Termostat *Incucell* (BMT)

Vortex *BIO Vortex V1* (Biosan)

Pipetor *Biomek 4000* (Beckman Coulter)

Centrifuga *Ccentifuge 5804* (Eppendorf)

Spektrofotometr *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific)

Termocycler *T100* (Biorad)

Sekvenátor *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems)

Lednice *UR 400* (4 °C - Nordline)

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace DNA z periferní krve - vysolovací metoda

Vysolování je jednou z nejjednodušších izolačních metod, která poskytuje vysoce kvalitní DNA (Turtinen a Juran, 1998). Principem metody je změna rozpustnosti molekul DNA v závislosti na změně koncentrace iontů v roztoku, kdy s rostoucí koncentrací iontů rozpustnost nejdříve roste a DNA se do roztoku vsoluje. Po dosažení maxima začne rozpustnost molekuly klesat a tím se DNA z roztoku vysoluje. Nejčastěji používanou solí k vysolování je síran amonný, vyznačující se mimořádně velkou rozpustností, která se příliš nemění s teplotou (Káš *et al.*, 2005).

Pracovní postup:

Do 50ml zkumavky bylo napipetováno 2,5 ml krve. Poté bylo přidáno 9 ml RBC Lysis solution. Směs byla promíchána a inkubována při pokojové teplotě 10 min. Během inkubace byla směs 1x promíchána. Dále byly vzorky centrifugovány 15 min./ 3850 rpm, 4°C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant tak, aby na dně zůstal pelet bílých krvinek a nebyl porušen. Následně bylo přidáno 2,5 ml RBC Lysis solution a vše po zvortexování centrifugováno 10 min./ 3850 rpm, 4°C. Po centrifugaci byl opět odsán supernatant a bylo přidáno 1,5 ml Cell lysis solution. Po zvortexování byly vzorky inkubovány v termostatu při 37 °C do rozpuštění. Po vyjmutí z termostatu byly vzorky vytemperovány na pokojovou teplotu. Dále bylo přidáno 450 µl Protein precipitation solution a zvortexováno při maximální rychlosti 20 - 30 sec. Následovala centrifugace 10 min./2000 rpm. Do 15 ml zkumavky bylo napipetováno 1,5 ml Isopropylalkoholu. Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 100 µl 70% ethanolu. Po centrifugaci byl odsán supernatant do 15 ml zkumavky s Isopropylalkoholem a postupně promícháván do vysrážení DNA. Vysrážená DNA byla přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky se 70% ethanolom, kde byla DNA 2 - 3 x proplachována. Poté bylo přidáno 100 µl čistého 70% ethanolu a DNA byla opět proplachována. Následně byl veškerý ethanol odsán a DNA byla vysušena při pokojové teplotě přes noc. Po vysušení byla k DNA přidána sterilní voda (100 - 300 µl podle velikosti

DNA) a byla rozpuštěna při pokojové teplotě přes noc, případně v termobloku (1hod při 56°C). Vvyzolovaná DNA byla uchovávána v lednici, při delším skladování při -20°C.

4.2.2 Měření koncentrace nukleových kyselin

Koncentrace a čistota vzorků byla měřena na přístroji Nanodrop 2000 od firmy Thermo Scientific. Jedná se o spektrofotometr, který je založen na principu pohlcování UV světla nukleovými kyselinami, což je jejich přirozenou vlastností. Koncentrace nukleových kyselin je pak přímo úměrná množství pohlceného UV záření. Čistota nukleových kyselin je stanovena z poměru absorbcí při vlnových délkách 260 a 230 nm. Čistota DNA by měla nabývat hodnot 1,8 - 1,85, kdy je dosaženo optimální kvality. Jako slepý vzorek (blank) byla použita sterilní voda. Pro měření byl použit vždy 1 µl vzorku.

4.2.3 Navrhování primerů

Návrh primerů je prvním krokem polymerázové řetězové reakce a sekvenační analýzy. Primery jsou syntetické oligonukleotidy, které hybridizují na 5' a 3' cílové DNA a řídí syntézu nových vláken. Pár primerů (F-forward a R-reverse) musí být vždy navržen tak, aby sekvence mezi F a R primerem pokryla tížené místo hledané sekvenční změny. Všechny navržené primery splňovaly následující kritéria: délka primeru v rozmezí 18 - 25 bp (optimum 20 bp), obsah GC bází v sekvenci primeru v rozmezí 30 - 80 %, velikost amplifikovaného produktu v rozmezí 150 - 500 bp, teplota tání primeru (T_m) v rozmezí 58 - 60°C, maximální rozdíl 5 °C mezi T_m (melting temperature) přímého (F) a zpětného (R) primeru, na 3' konci primeru posledních 5 nukleotidů neobsahovalo více než 2 G či C báze, vyloučení případných repetitiv, zejména opakování 4 a více G za sebou a 100% specifita primerů. K návrhu primerů jsou dále nezbytné genomové sekvence, které byly získány z online databáze Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) dle referenčního lidského genomu - H. sapiens, GRCh38/hg38. Samotné navrhování primerů bylo provedeno pomocí programu Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) viz obr. 15.

Primer-BLAST Primer-Blast results

NCBI/Primer-BLAST : results: Job id=HRICeyb8K1QMai5vhw8KXVkuG290BwBydQ [more...](#)

Input PCR template
Range 1 - 575
Specificity of primers Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
Other reports [Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Detailed primer reports

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGTACATGGCCCCCTGAAGTT	Plus	20	222	241	59.67	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	CTCTGGCACTCGGTGACATC	Minus	20	476	457	60.46	60.00	6.00	3.00
Product length	255								
Primer pair 2									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCTCCTCTCCCCAGTAGTT	Plus	21	356	376	59.71	57.14	3.00	0.00
Reverse primer	CCTCCCAAAGGTTTCATCGC	Minus	20	505	486	59.19	55.00	4.00	2.00
Product length	150								

Obr. 15 Výstup z programu Primer-BLAST

Prevzato z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

4.2.4 Sangerovo sekvenování

Prvním krokem Sangerova sekvenování je polymerázová řetězová reakce, během které je cílový úsek DNA namnožen pomocí specifických primerů. Druhým krokem je enzymatické přečištění získané namplifikované DNA. Následuje asymetrická PCR reakce, během které k jednořetězcové DNA přisedá 15 - 25 bp dlouhý primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa. Syntéza DNA probíhá od navázaného primeru za přítomnosti dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a končí navázáním jednoho z fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP nebo ddTTP), které jsou v reakci zastoupeny jen v relativně malém množství. Po sekvenační reakci následuje analýza vzorků kapilární elektroforézou, během které laser excituje fluorescenční barvy a emitované světlo je zachyceno citlivou kamerou.

Pracovní postup:

Polymerázová řetězová reakce

Lyofilizované primery (F-forward- a R-reverse) byly naředěny na zásobní roztoky o koncentraci 100 pmol/μl, přidáním odpovídajícího množství sterilní vody. Z těchto zásobních

roztoků byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci 10 μM smícháním 10 μl zásobního roztoku primeru a 90 μl sterilní vody.

Reakční směs byla připravena dle **tabulky 2** pro všechny reakce.

Tabulka 2 Složení reakční směsi pro amplifikační reakci

Reagencie	Objem (μl)
FastStart PCR Master	10
sterilní voda	8
Primer F	0,5
Primer R	0,5

Připravená reakční směs byla rozpipetována do 0,2 ml zkumavek po 19 μl . Do každé 0,2 μl zkumavky s reakční směsí byl přidán 1 μl DNA. Takto připravené vzorky byly zcentrifugovány a vloženy do termocycleru s vhodným amplifikačním programem (**viz tab. 3**).

Tabulka 3 Amplifikační program

teplota ($^{\circ}\text{C}$)	čas (min:s)	opakování
94	5:00	
95	0:30	35x
50/55/58/60	0:30	
72	0:45	
72	10:00	
4	hold (∞)	

Přečištění PCR produktu

Dále bylo provedeno enzymatické přečištění PCR produktů pomocí mixu enzymů Exonuclease I a alkalické fosfatázy FastAP, který byl připraven smícháním 30 μl Exonuclease I a 60 μl FastAP. Pro každý vzorek z předchozí PCR reakce byly připraveny nové 0,2 μl zkumavky, do kterých bylo přidáno 1,5 μl mixu enzymů a 5 μl PCR produktu. Vzorky byly opět vloženy do termocykléru s teplotním profilem, který je uveden v **tab. 4**.

Tabulka 4 Teplotní profil programu EXO/FastAP

teplota ($^{\circ}\text{C}$)	čas (min:s)
37	15:00
85	15:00

Asymetrická sekvenační PCR

Reakční směs pro sekvenační PCR byla připravena podle **tab. 5**. Jednotlivé reagensie byly rozpipetovány po 3,7 μ l do připravených 0,2 μ l zkumavek. Dále bylo k mastermixu přidáno 0,5 μ l primeru F nebo R, tak, aby měl vždy jeden vzorek F a R variantu primeru. Poté bylo do zkumavky přidáno 0,8 μ l enzymaticky přečištěného PCR produktu. Připravené vzorky byly vloženy do termocykléru s amplifikačním programem uvedeným v **tab. 6**.

Tabulka 5 Složení master mixu pro sekvenační reakci

Reagensie	Objem (μ l)
sterilní voda	2,7
BigDye Terminator v3.1	0,5
Sequencing buffer v3.1	0,5

Tabulka 6 Teplotní profil amplifikačního programu sekvenace.

teplota ($^{\circ}$ C)	Čas (min:s)	opakování
96	1:00	
96	0:10	25x
50	0:05	
60	4:00	
4	Hold	

Po sekvenační PCR byly vzorky automaticky přečištěny pomocí magnetických kuliček na přístroji Biomek 400 (Beckman Coulter) a poté byla provedena jejich sekvenační analýza na sekvenátoru ABI PRISM 3130.

4.2.5 Analýza sekvenačních dat

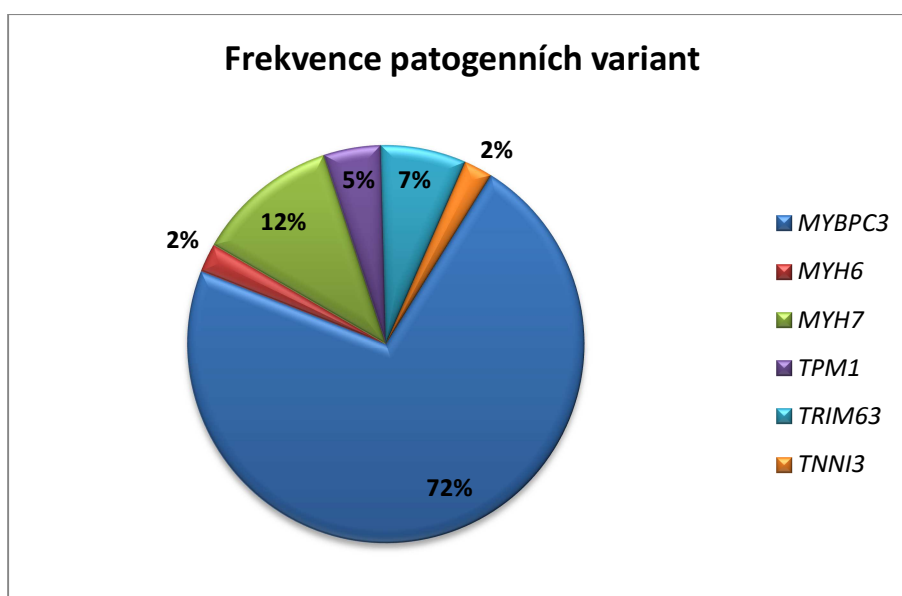
Analýza získaných dat probíhala pomocí programu Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Analyzované sekvence byly uloženy a porovnány s referenční sekvencí daného exonu (genu) v programu Sequencher (Gene Code Corporation).

Referenční sekvence daného genu byly získány z databáze NCBI. V případě, že se sekvence shoduje s referenční sekvencí, je pacient negativní (wild type). V případě záchytu sekvenační změny na obou alelách je pacient mutovaný homozygot. V případě, že je zjištěna změna pouze na jedné alele genu je pacient heterozygot pro sledovaný úsek DNA.

5 Výsledky

Soubor 170 pacientů byl podroben analýze 20 genů souvisejících s HCM - *ACTC1*, *ACTN2*, *CSPR3*, *JPH2*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *PLN*, *MYL2*, *MYL3*, *MYPN*, *PRKAG2*, *TCAP*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TRIM54*, *TRIM55* a *TRIM63* (hlavní skupina genů), které mají v populaci dle literatury častý záchyt a byla u nich stanovena frekvence patogenních variant.

V souboru bylo nalezeno 43 sekvenčních variant popsanych v genetických databázích jako jednoznačně patogenní (kauzální) varianty, způsobující HCM. V šesti případech byly nalezeny dvě patogenní varianty současně (digenní varianty). Procentuální záchyt mutací v jednotlivých genech je znázorněn v **grafu 1**. Počet nalezených patogenních sekvenčních variant v analyzovaných genech shrnuje **tab. 7**. Konkrétní nálezy patogenních sekvenčních variant v hlavní skupině vyšetřovaných genů jsou popsány v **tab. 8**.



Graf 1: Frekvence patogenních variant v hlavní skupině genů spojených s HCM

Zahrnuto celkem 43 nalezených patogenních variant v souboru 170 pacientů.

Tabulka 7 Počet nalezených patogenních sekvenčních variant v analyzovaných genech

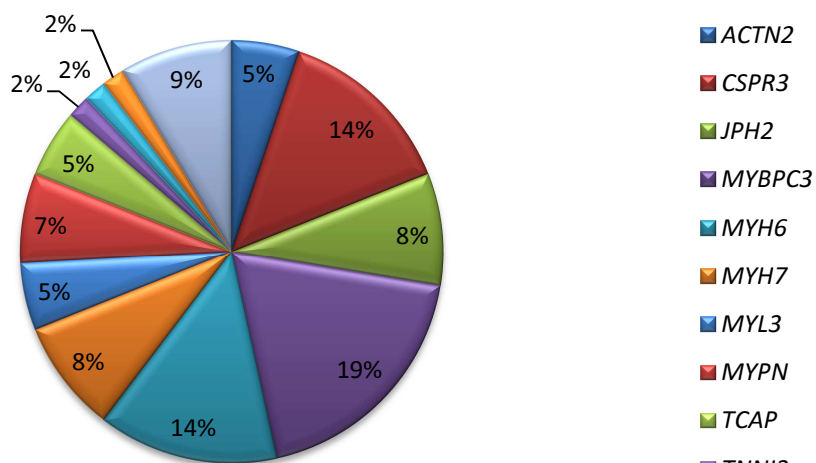
Gen	Počet sekvenčních variant
<i>MYBPC3</i>	31
<i>MYH6</i>	1
<i>MYH7</i>	5
<i>TPM1</i>	2
<i>TRIM63</i>	3
<i>TNNI3</i>	1

Tabulka 8 Konkrétní nálezy patogenních sekvenčních variant v hlavní skupině vyšetřovaných genů

Gen	Nukleotidový zápis	Proteinový zápis
TNNI3	c.422G>A	p.Arg141Gln
MYBPC3	c. 2905+1G>A	-
	c.1028del	p.Thr343Metfs*7
	c.2067+1G>A	-
	c.2431A>T	p.Lys811*
	c.2459G>A	p.Arg820Gln
	c.3040del	p.Leu1014Trpfs*6
	c.3190+5G>A	-
	c.3276_3298dup	p.Tyr1100Serfs*97
	c.3407_3409del	p.Tyr1136_1137PhedelinsPhe
	c.3407_3409del	p.Tyr1136del
	c.3490+1G>T	-
	c.3697C>T	p.Gln1233*
	c.755del	p.Phe252Serfs*48
	c.772+1G>A	-
	c.309_315dup	p.Pro106Alafs*9
c.3697C>T	p.Gln1233*	
MYH6	c.3195G>C	p.Gln1065His
MYH7	c.2012G>A	p.Arg671His
	c.2011C>T	p.Arg671Cys
	c.2770G>A	p.Glu924Lys
	c.2882T>G	p.Leu961Arg
TPM1	c.523G>A	p.Asp175Asn
	c.574G>A	p.Glu192Lys
TRIM63	c.143C>T	p.Ala48Val

Dále bylo nalezeno 58 pravděpodobně patogenních variant, které genetické databáze spojují s HCM nebo jim predikční programy přidělily pravděpodobně patogenní vliv na funkci proteinu (např. ovlivnění konzervativního místa splicingu, změna aminokyseliny v proteinové sekvenci). Zjištěnou frekvenci záchyty znázorňuje **graf 2**. Počet těchto variant je uveden v **tab 9** a konkrétní nálezy jsou popsány v **tab 10**. V sedmi případech byly nalezeny digenní varianty a ve dvou případech byly nalezeny tři varianty současně (trigenní varianty).

Frekvence pravděpodobně patogenních variant



Graf 2: Frekvence pravděpodobně patogenních variant v hlavní skupině genů spojených s HCM
Zahrnuto celkem 58 nalezených pravděpodobně patogenních variant v souboru 170 pacientů

Tabulka 9 Počet nalezených pravděpodobně patogenních sekvenčních variant v hlavní skupině genů

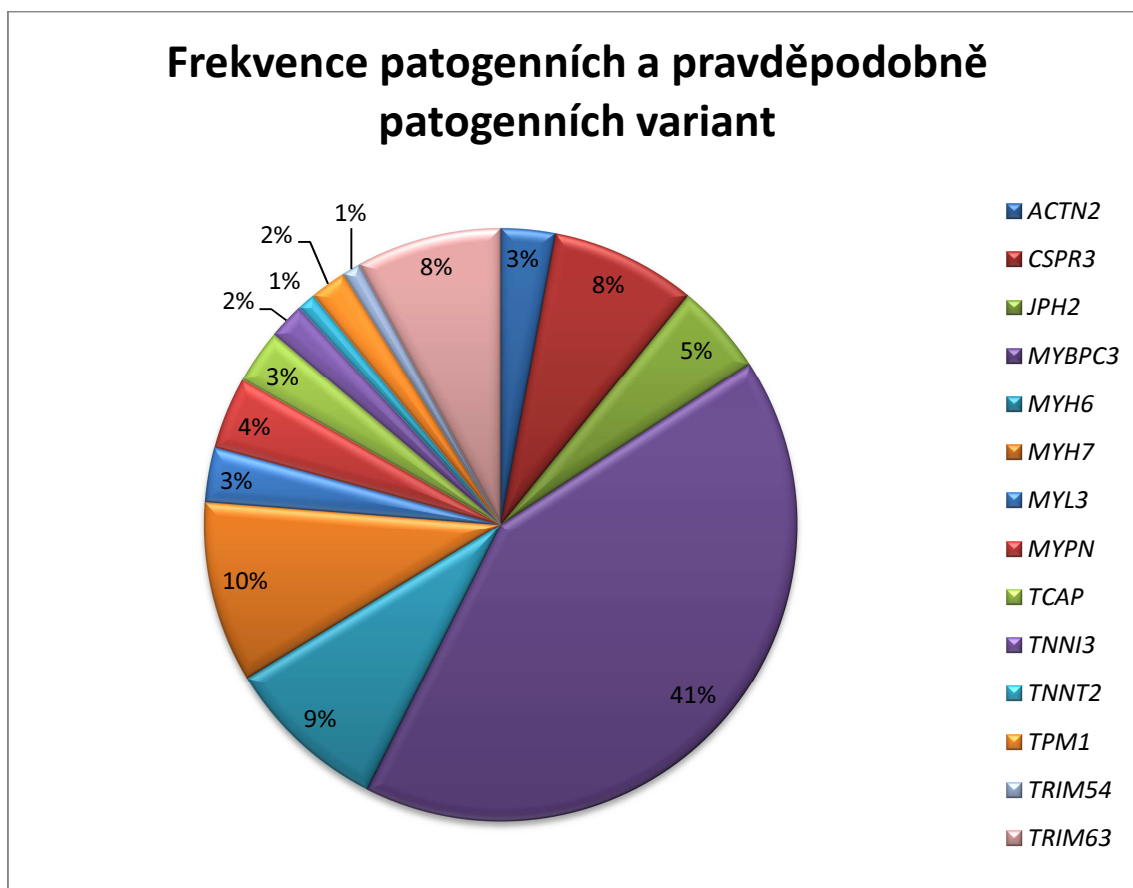
Gen	Počet sekvenčních variant
<i>ACTC1</i>	0
<i>ACTN2</i>	3
<i>CSPR3</i>	8
<i>JPH2</i>	5
<i>MYBPC3</i>	11
<i>MYH6</i>	8
<i>MYH7</i>	5
<i>MYL2</i>	0
<i>MYL3</i>	3
<i>MYPN</i>	4
<i>PLN</i>	0
<i>PRKAG2</i>	0
<i>TCAP</i>	3
<i>TNNC1</i>	0
<i>TNNI3</i>	1
<i>TNNT2</i>	1
<i>TPM1</i>	0
<i>TRIM54</i>	1
<i>TRIM55</i>	0
<i>TRIM63</i>	5

Tabulka 10 Konkrétní nálezy pravděpodobně patogenních sekvenčních variant v hlavní skupině genů

Gen	Nukleotidový zápis	Proteinový zápis
ACTN2	c.1090G>A	p.Glu364Lys
	c.1549C>T	p.Leu517Phe
	c.628G>A	p.Gly210Arg
CSPR3	c.10T>C	p.Trp4Arg
	c.112+5G>A	-
	c.208G>T	p.Gly70Trp
	c.215G>T	p.Gly72Val
	c.509-3_509-2del	-
	c.208G>T	p.Gly70Trp
JPH2	c.1513G>A	p.Gly505Ser
MYBPC3	c.442G>A	p.Gly148Arg
	c.1484G>A	p.Arg495Gln
	c.2309-3C>G	-
	c.3767_3769del	p.Thr1256del
	c.649A>G	p.Ser217Gly
	c.1227-13G>A	-
MYH6	c.1753G>A	p.Gly583Ser
	c.2928+5G>A	-
	c.3584G>A	p.Arg1195His
	c.4556_4558del	p.Gly1519del
	c.4594C>T	p.Arg1532Cys
	c.4651-3C>A	-
	c.4726C>T	p.Arg1576Trp
	c.5348G>A	p.Arg1783His
MYH7	c.2366A>T	p.Gln789Leu
	c.2652_2654del	p.Lys884del
	c.3367G>C	p.Glu1123Gln
	c.1358G>T	p.Arg453Leu
MYL3	c.446T>C	p.Met149Thr
	c.59C>A	p.Ala20Asp
MYPN	c.1130G>A	p.Arg377Gln
	c.2739G>A	p.Met913Ile
	c.2863C>T	p.Arg955Trp
TCAP	c.316C>T	p.Arg106Cys
	c.388C>T	p.Arg130Cys
	c.52C>T	p.Arg18Trp
TNNI3	c.104C>T	-
TNNT2	c.83C>T	p.Ala28Val
TRIM54	c.993G>A	-
TRIM63	c.1012G>T	p.Asp338Tyr
	c.739C>T	p.Gln247*
	c.547C>G	p.Arg183Gly
	c.805G>A	p.Glu269Lys

Celkem bylo v souboru 170 pacientů nalezeno 101 sekvenčních variant, které mají jednoznačně patogenní nebo pravděpodobně patogenní význam. Zjištěnou celkovou frekvenci záchytu těchto variant znázorňuje **graf 3**.

Všech 101 nalezených jednoznačně patogenních a pravděpodobně patogenních variant pomocí NGS bylo dle odborných doporučení ověřeno Sangerovým sekvenováním.



Graf 3: Frekvence patogenních a pravděpodobně patogenních variant v HCM genech

Zahrnuto celkem 101 nalezených patogenních a pravděpodobně patogenních variant v souboru 170 pacientů.

Po konzultaci s klinickým genetikem byla u vybraných třiceti pacientů bez jednoznačně patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty ve výše zmíněných genech provedena analýza dalších dvanácti genů - *ANKRD1*, *CALR3*, *CAV3*, *DES*, *GLA*, *LDB3*, *MYLK2*, *MYOM1*, *MYOZ2*, *NEXN*, *RAF1*, *TTN* a *VCL* (doplňující skupina genů), ve kterých byly dle databáze HGMD taktéž nalezeny patogenní sekvenční varianty, ovšem s daleko nižší frekvencí. V tomto doplňujícím souboru genů byly nalezeny pouze 3 pravděpodobně patogenní varianty, které jsou uvedeny v genetických databázích (ClinVar nebo HGMD), ale jejich klinický význam není jasný. Softwarové predikční programy je interpretují sporně.

Konkrétně se jednalo o následující substituční záměny - c.13316A>G (p.Tyr4439Cys) v genu *TTN*, c.3904G>A (p.Glu1302Lys) v genu *MYOM1* a c.197G>A (p.Arg66Gln) v genu *ANKRD1* viz tab 11.

Tabulka 11 Nalezené UV sekvenční varianty v doplňující skupině genů.

	Gen - sekvenční varianta		
	<i>TTN</i> - c.13316A>G p.Tyr4439Cys	<i>MYOM1</i> - c.3904G>A p.Glu1302Lys	<i>ANKRD1</i> - c.197G>A p.Arg66Gln
ClinVar	Conflicting interpretations of pathogenicity	Conflicting interpretations of pathogenicity	Conflicting interpretations of pathogenicity
HGMD	-	-	Effect in cardiac disease
SIFT	Damaging	Damaging	Damaging
AlignGVGD	C0	C15	C0
PolyPhen-2	Benign	Probable damaging	Benign
UMD-Predictor	Pathogenic	Pathogenic	Probable polymorphism
MutationTaster	Polymorphism	Disease causing	Disease causing

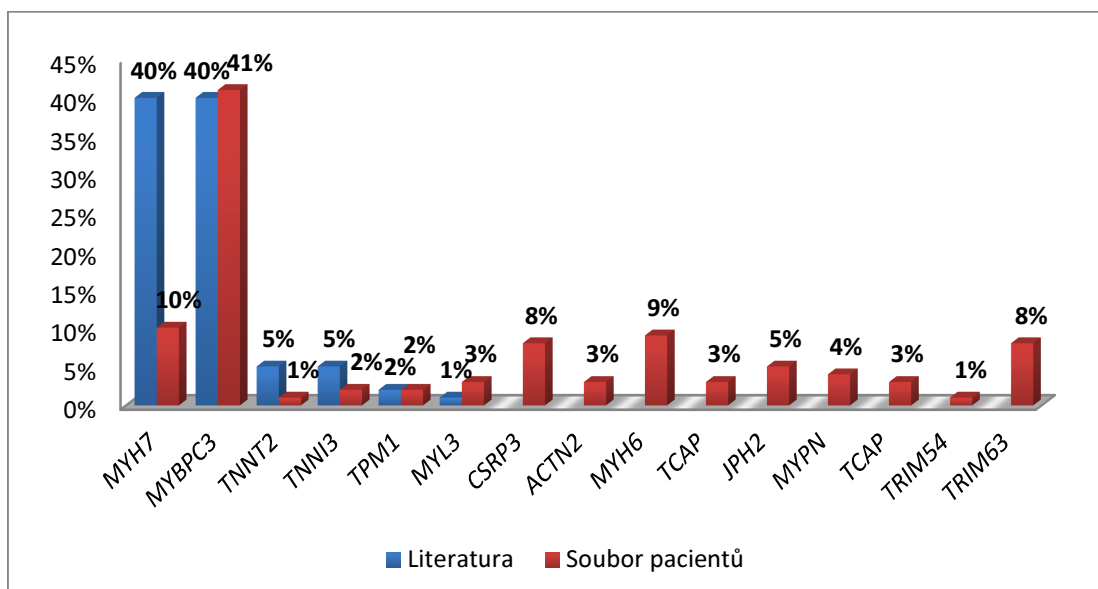
5.1 Frekvence záchytu sekvenčních variant ve vybraných genech

Dále bylo provedeno porovnání frekvence záchytu kauzálních sekvenčních variant uvedené v literatuře se zjištěnou frekvencí v námi analyzovaném souboru pacientů s HCM. Frekvence byla stanovena z celkového počtu 101 nalezených jednoznačně a pravděpodobně patogenních variant (viz tab. 12 a graf 4).

Tabulka 12 Porovnání frekvence záchytu kauzálních sekvenčních variant uvedené v literatuře se zjištěnou frekvencí v námi analyzovaném souboru pacientů s HCM.

Gen	Frekvence v literatuře*	Zjištěná frekvence
MYH7	8 - 40 %	10 %
MYBPC3	16 - 40 %	41 %
TNNT2	3 - 5 %	1 %
TNNI3	5 %	2 %
TPM1	2 %	2 %
MYL2	Neurčena	0
MYL3	1 %	3 %
ACTC1	Neurčena	0
CSRP3	Neurčena	8 %
ACTN2	Neurčena	3 %
MYH6	Neurčena	9 %
TCAP	Neurčena	3 %
TNNC1	Neurčena	0
PLN	Neurčena	0
JPH2	Neurčena	5 %
MYPN	Neurčena	4 %
TRIM54	Neurčena	1 %
TRIM63	Neurčena	8 %

*(Cirino *et* Ho, 2014; García-Castro *et al.*, 2009; Marian, 2010)

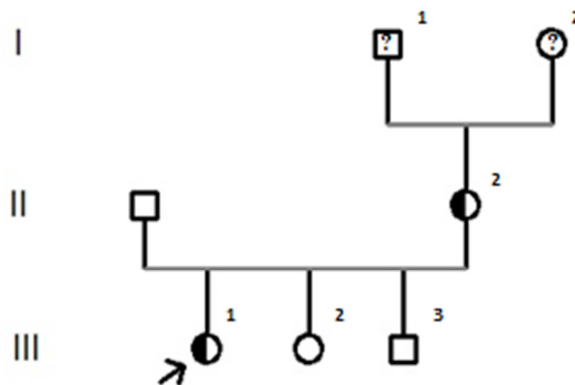


Graf 4: Grafické srovnání frekvence záchytu kauzálních sekvenčních variant ve vybraných genech s analyzovaným souborem pacientů

5.2 Rodokmeny vybraných pacientů s HCM

Následující schémata rodokmenů zobrazují segregaci námi nalezených vybraných sekvenčních variant v různých genech.

V prvním rodokmenu rodiny A je vidět segregace patogenní sekvenční varianty c.574G>A (p.Glu192Lys) v genu *TPM1*, která je uvedena v genetické databázi HGMD jako kauzální pro HCM (Mango *et al.*, 2016). V rodině probanda byla HCM zaznamenána také u matky probanda II/2 (viz obr. 16).

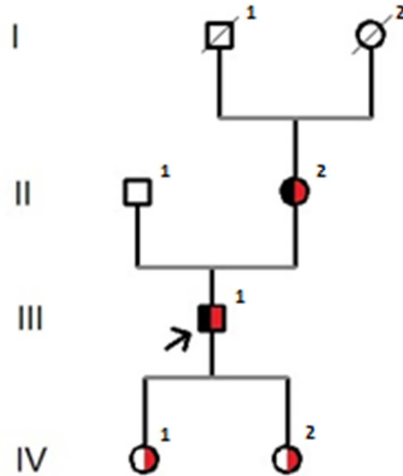


Obr. 16 Rodokmen rodiny A s výskytem HCM

Černá šipka označuje probanda.

Černě jsou označeni nosiči patogenní sekvenční varianty c.574G>A (p.Glu192Lys) v genu *TPM1*

V následujícím rodokmenu rodiny B je zobrazena segregace dvou sekvenčních variant a to pravděpodobně patogenní UV varianty c.1513G>A (p.Gly505Ser) v genu *JPH2*, která je v genetické databázi HGMD uvedena ve spojitosti s HCM (Abouelhoda *et al.*, 2016) a jednoznačně patogenní sekvenční varianty c.3697C>T (p.Gln1233*) v genu *MYBPC3*, která je uvedena v genetické databázi HGMD i ClinVar jako kauzální pro HCM (Helms *et al.*, 2014). Proband III/1 a jeho matka II/2 mají diagnostikovanou HCM. U dcer probanda IV/1 a IV/2 byla nalezena pouze UV varianta c.1513G>A v genu *JPH2*. V době odběru (7 a 10 let) nebyla u dcer prokázána patologická tloušťka srdečního svalu (viz obr 17).



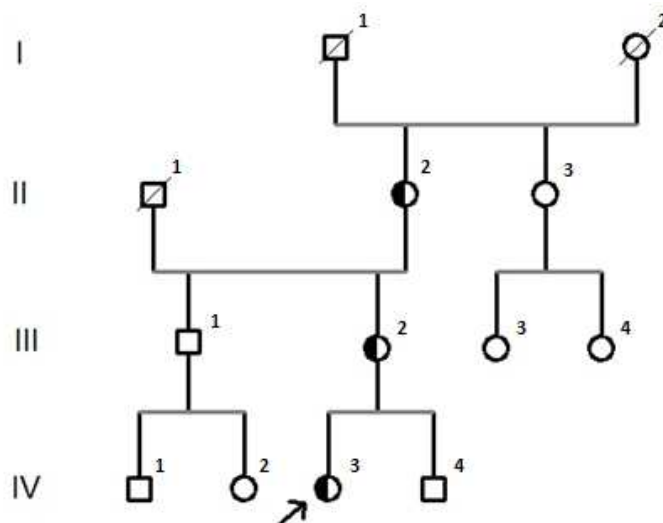
Obr. 17 Rodokmen rodiny B s výskytem HCM

Černá šipka označuje probanda.

Černě jsou označeni nosiči jednoznačně patogenní sekvenční varianty c.3697C>T (p.Gln1233*) v genu *MYBPC3*.

Červeně jsou označeni nosiči pravděpodobně patogenní UV varianty c.1513G>A (p.Gly505Ser) v genu *JPH2*.

Další rodokmen rodiny C zobrazuje segregaci podle pravděpodobně patogenní varianty c.1227-13G>A v genu *MYBPC3* (ClinVar), která způsobuje porušení původního akceptorového splicingového místa a aktivaci intronového kryptického místa. Celopopulační frekvence této varianty je podle ExAC 0.00001 %. Popsaná varianta s velkou pravděpodobností způsobuje HCM, jelikož všichni nosiči IV/3, III/2 a II2 jsou postižení (**viz obr. 18**).

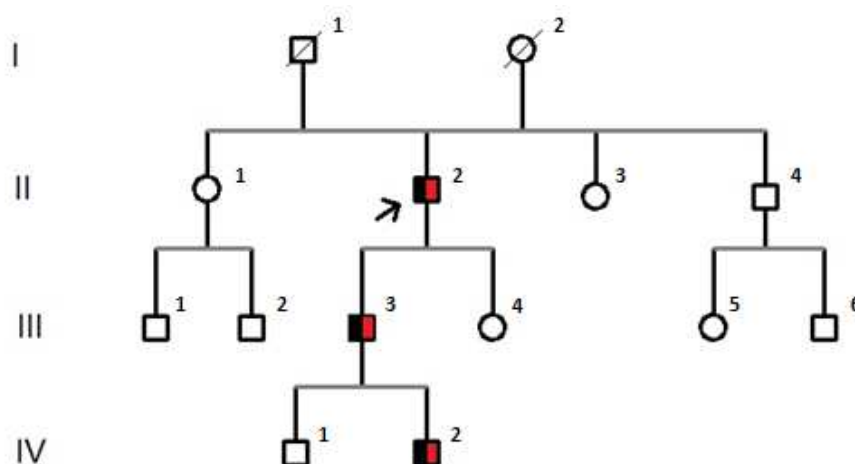


Obr. 18 Rodokmen rodiny C s výskytem HCM

Černá šipka označuje probanda.

Černě jsou označeni nosiči pravděpodobně patogenní varianty c.1227-13G>A v genu *MYBPC3*

Rodokmen rodiny D ukazuje přenos dvou pravděpodobně patogenních UV variant c.442G>A (p.Gly148Arg) v genu *MyBPC3*, která je v genetické databázi HGMD uvedena ve spojitosti s HCM (Zuo *et al.*, 2013) a c.547C>G (p.Arg183Gly) v genu *TRIM63*. Obě varianty nalezené u probanda II/2 kosegregují ve třech generacích. Sourozenci probanda a jejich potomci ještě nebyli klinicky ani molekulárně geneticky vyšetřeni (**viz obr. 19**).



Obr. 19 Rodokmen rodiny D s výskytem HCM

Černá šipka označuje probanda.

Černě jsou označeni nosiči varianty nejasného významu c.442G>A (p.Gly148Arg) v genu *MYBPC3*

Červeně jsou označeni nosiči varianty nejasného významu c.547C>G (p.Arg183Gly) v genu *TRIM63*

6 Diskuze

Diplomová práce shrnuje výsledky molekulárně genetických analýz pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Vyšetření HCM v Laboratoři molekulární biologie, Oddělení lékařské genetiky, Laboratoře AGEL a.s. Nový Jičín probíhá od roku 2007.

Od roku 2015 je v laboratořích využívána nová technologie NGS, která pracuje na principu masivního paralelního sekvenování (MPS). U pacientů je standardně prováděna analýza celkem 32 genů (hlavní skupina 20 genů a doplňující skupina 12 genů) souvisejících s HCM. Pacienti z období 2007 - 2015 byli postupně reanalyzováni pomocí NGS. V souboru 170 pacientů bylo nalezeno 43 variant popsanych v genetických databázích jako patogenní (kauzální) varianty. V šesti případech byly nalezeny dvě patogenní varianty současně (digenní varianty). Dále bylo nalezeno 58 pravděpodobně patogenních variant. V sedmi případech byly nalezeny digenní varianty a ve dvou případech byly nalezeny tři pravděpodobně patogenní varianty současně (trigenní varianty).

Výsledky analýz v případě frekvence záchytu, rozložení mutací v jednotlivých genech a výskytu di- a trigenních mutací odpovídají publikovaným údajům (Cirino *et al.*, 2014; García-Castro *et al.*, 2009; Marian, 2010). V našem souboru převažují, s výjimkou genu *MYBPC3*, individuální mutace, jejichž frekvence je u pacientů s HCM v indoevropské populaci nízká nebo dosud nebyla odborně stanovena. Tyto rozdíly mohou být dány velikostí souboru a jeho složením.

Potvrzení patogenicity u nově nalezené sekvenační varianty není jednoduché a vyžaduje hledání v databázích, používání predikčních programů a sledování jejich segregace v rodině HCM pacienta. Potvrzení či vyloučení kauzality stěžuje klinická heterogenita onemocnění a variabilní věk nástupu prvních příznaků u nosičů sledované sekvenční změny.

Přibližně před deseti lety se v odborné literatuře udávala celková frekvence záchytu mutací ve třech genech *MYBPC3*, *MYH7*, a *TNNT2* až 80 % (v rozmezí 35 - 85 %) (Kapplinger *et al.*, 2014, Chung *et al.*, 2003). V následujících letech odhalením dalších genů souvisejících s HCM a jejich mutační analýzou na větších souborech pacientů se poměr zastoupení mutací měnil. Výsledky z posledních let s přibývajícím počtem vyšetřených pacientů snížily procentuální záchyt ve třech zmíněných genech z 80 % (Chung *et al.*, 2003) na přibližně 30 % (Kapplinger *et al.*, 2014).

Nové NGS platformy sekvenování urychlují a značně usnadňují přípravu a analýzu velkého počtu genů. Uspěšná identifikace kauzálních mutací vedla ke snaze sjednotit genetické analýzy velkého počtu vyšetřovaných sekvencí, které mohou trvat i několik měsíců

v jednu platformu genů sekvenování nové generace, které se mohou vyšetřit během několika dní (Bagnall *et Semsarian*, 2011). Vysoká kapacita vyšetření splňuje maximalizaci záchytů v několika desítkách genů zodpovědných za danou diagnózu. Na druhé straně je třeba nalezené sekvenční změny ověřovat cíleně klasickým sekvenováním dle Sanger. Největším problémem v současné době je obrovské množství získaných dat, což sebou nese další požadavky jako spolupráce pracovníků genetických laboratoří s bioinformatikem, databázovým expertem atd.

Mnoho aminokyselinových substitucí v sekvenci DNA nezpůsobuje onemocnění a je považováno za benigní varianty (tzn., obecně se neočekává, že jsou škodlivé), i přesto, že se v etnicky specifické normální kontrolní populaci vyskytují s frekvencí pod 1 %. Význam těchto variant pro dané onemocnění zůstává nejasný i po uplatnění všech kritérií pro patogenitu. Výsledkem je zařazení nalezených variant predikčními programy do nejednoznačné kategorie (tj. Varianty s nejasným významem UV) (Tester *et Ackerman*, 2011; Landstrom *et Ackerman*, 2010; Richards *et al.*, 2007).

Rozlišování patogenních mutací od UV nebo vzácných nepatogenních variant je dilematem zejména pro interpretaci výsledků testů HCM (Tester *et Ackerman*, 2011). Tento problém ještě umocnilo snížení nákladů na technologie, které nyní umožňují komplexní sekvenování DNA exomů či celého genomu (Meder *et al.*, 2011). Ačkoli tyto technologie poskytují nové vědecké poznatky, tento vývoj také podstatně zvyšuje frekvenci nálezů UV. To, že se UV v lidské kontrolní populaci objevují častěji než dříve (genetická variace souhrnně označovaná jako "šum pozadí") podtrhuje potřebu definitivnějších kritérií pro odlišení patogenních mutací od benigního genetického "šumu".

V klinické praxi není uznáváno přiřazení konkrétních mutací k patogennímu stavu a diagnóze pacienta. Molekulární diagnostika určuje pouze pravděpodobnost vzniku onemocnění. Tento princip spojení klinické praxe a komplexní molekulární diagnostiky s péčí o pacienty se ukázal jako náročnější, než se původně předpokládalo.

Kromě toho také existuje možnost, že se patogenní klasifikace sekvenčních variant mohou v průběhu času měnit s tím, jak budou přístupné nové relevantní informace (např. UV může být nově klasifikováno jako patogenní varianta nebo alternativně mohou být patogenní sekvenční varianty považovány za UV). Vše souvisí s aktuálností genetických databází mutací (neustále se doplňují a revidují nalezené změny). Odpovědnost za oznamování takových změn lékařům a pacientům převzaly genetické laboratoře. Doposud však nebyly stanoveny standardní postupy k vyřešení těchto unikátních situací (Maron *et al.*, 2012).

Ranné období genetiky HCM bylo charakterizováno značným optimismem a nerealistickým očekáváním, že by specifické missense mutace (v jediném genu) mohly být spojeny s prognózou vyšetřovaných pacientů. Zatímco v minulosti byly některé HCM geny a sekvenční varianty spojovány se závažnějším průběhem onemocnění než jiné, nyní je na základě studií velkého počtu pacientů a screeningem specifických mutací jasné, že nalezené sekvenční změny nelze jednoznačně a spolehlivě spojit s klinickou závažností HCM (Seidman *et Seidman* 2011; Watkins *et al.*, 1992; Ho *et Ackerman*, 2010).

Prostřednictvím rozsáhlého genového sekvenování se v diagnostice HCM objevily data, naznačující, že dvojití (digenní), trojití (trigenní) nebo složení heterozygoté (compound heterozygote) mohou být spojeny se závažnějším projevem onemocnění a nepříznivou prognózou (např. pokročilým srdečním selháním nebo náhlou smrtí, dokonce i bez uplatnění rizikových faktorů (Ingles *et al.*, 2005; Kelly *et Semsarian*, 2009). Je proto možné, že se v budoucnosti mnohonásobné mutace stanou prognostickými markery. Stávající důkazy jsou ovšem předběžné a vyžadují dlouhodobé studie velkých populací (Maron *et al.*, 2012).

Interpretace výsledků molekulárně genetického vyšetření a predikce onemocnění je z důvodu variabilní expresivity obtížná. Avšak nalezení kauzální mutace u pacientů může pomoci zjistit a dispenzarizovat asymptomatické rodinné příslušníky, u kterých byla nalezena stejná mutace jako u nemocného.

7 Závěr

Soubor 170 pacientů byl podroben analýze hlavní skupiny 20 genů *ACTC1*, *ACTN2*, *CSPR3*, *JPH2*, *MYBPC3*, *MYH6*, *MYH7*, *PLN*, *MYL2*, *MYL3*, *MYPN*, *PRKAG2*, *TCAP*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TRIM54*, *TRIM55* a *TRIM63*, ve kterých bylo nalezeno 43 sekvenčních variant popsanych v genetických databázích jako jednoznačně patogenní (kauzální) varianty. V šesti případech byly nalezeny dvě patogenní varianty současně (digenní varianty). U pacientů, kteří jsou nosiči těchto mutací, byla potvrzena klinická diagnostika HCM na molekulární úrovni. V těchto případech bylo klinickým genetikem nabídnuto molekulárně-genetické vyšetření rodinným příslušníkům.

Dále bylo nalezeno 58 variant s nejasným klinickým významem (UV), které genetické databáze spojují s HCM nebo je predikční programy hodnotí jako pravděpodobně patogenní s vlivem na funkci proteinu.

U vybraných třiceti pacientů bez jednoznačně patogenní varianty nebo pravděpodobně patogenní varianty ve výše zmíněných 20 genech byla provedena analýza dalších dvanácti genů - *ANKRD1*, *CALR3*, *CAV3*, *DES*, *GLA*, *LDB3*, *MYLK2*, *MYOM1*, *MYOZ2*, *NEXN*, *RAF1*, *TTN* a *VCL* (doplňující skupina genů), ve kterých byly dle databáze HGMD také nalezeny patogenní sekvenční varianty související s HCM, ovšem s daleko nižší frekvencí. V tomto doplňujícím souboru genů byly nalezeny 3 UV varianty. Protože jejich patogenita je v genetických databázích a pomocí predikčních programů hodnocena rozdílně, je nutno interpretovat výsledky v korelaci s klinickým stavem pacientů a s výskytem těchto UV variant v jejich rodinách.

Publikované frekvence patogenních variant byly srovnány s vyšetřovaným souborem 170 pacientů. Nalezené rozdíly mezi námi zjištěnou a publikovanou frekvencí (zejména u genu *MYH7*) mohou být způsobeny rozdílnými kritérii pro klasifikaci patogenicity nalezených variant, jinou velikostí a složením vyšetřovaného souboru pacientů. Frekvence v našem souboru pacientů byla stanovena z nalezených jednoznačně patogenních i pravděpodobně patogenních variant.

8 Seznam použité literatury

- Abouelhoda, M., Faquih, T., El-Kalioby, M., Alkuraya, F. S. (2016). Revisiting the morbid genome of Mendelian disorders. *Genome Biology*, 17(1), 235.
- Ackerman, M. J., VanDriest, S. L., Ommen, S. R., Will, M., L., Nishimura M., D., Tajik A., J., Gersh B., J. (2002): Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy: a comprehensive outpatient perspective. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 2042–2048.
- Adabag, A. Selcuk; Kuskowski, Michael A.; Maron, Barry J. (2006): Determinants for clinical diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *The American journal of cardiology*, 98(11), 1507-1511.
- Agarwal, S., Tuzcu, E. M., Desai, M. Y., Smedira, N., Lever, H. M., Lytle, B. W., Kapadia, S. R. (2010). Updated meta-analysis of septal alcohol ablation versus myectomy for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(8), 823-834.
- Alcalai, R., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (2008). Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 19(1), 104-110.
- Aoki, H., Sadoshima, J., Izumo, S. (2000). Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nature medicine*, 6(2), 183-188.
- Bagnall, R. D., Ingles, J., Semsarian, C. (2011). *Molecular Diagnostics of Cardiomyopathies*.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Östman-Smith, I., Watkins, H. (2001). Mutations in the $\gamma 2$ subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Human molecular genetics*, 10(11), 1215-1220.
- Bos, J. M., Ommen, S. R., Ackerman, M. J. (2007). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases?. *Current opinion in cardiology*, 22(3), 193-199.
- Bos, J. M., Towbin, J. A., Ackerman, M. J. (2009). Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(3), 201-211.

- Brock, R. (1956). Functional obstruction of the left ventricle; acquired aortic subvalvar stenosis. *Guy's Hospital reports*, 106(4), 221-238.
- Brtko, M., Šťásek, J., Vojáček, J., Polanský, P., Tuna, M., Praus, R., Mědílek, K., Bis, J., Dušek, J. (2008). Hypertrofická kardiomyopatie – současné možnosti léčby. *Interv Akut Kar diol*, 7, 100-105.
- Carcavilla, A., Santomé, J. L., Pinto, I., Sánchez-Pozo, J., Guillén-Navarro, E., Martín-Frías, M., Lapunzina, P., Ezquieta, B. (2013). LEOPARD syndrome: a variant of Noonan syndrome strongly associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 66(5), 350-356.
- Cirino, A. L., Ho, C. (2014). Hypertrophic cardiomyopathy overview. Dostupné online z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1768/>
- Cunningham, F., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C. G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S. E., Janacek, S. H., Johnson, N., Juettemann, T., Kähäri, A. K., Keenan, S., Martin, F. J., Maurel, T., McLaren, W., Murphy, D. N., Nag, R., Overduin, B., Parker, A., Patricio, M., Perry, E., Pignatelli, M., Riat, H. S., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Wilder, S. P., Zadissa, A., Aken, B. L., Birney, E., Harrow, J., Kinsella, R., Muffato, M., Ruffier, M., Searle, S. M., Spudich, G., Trevanion, S. J., Yates, A., Zerbino, D. R., Flicek, P. (2015): Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D662-D669.
- Dhandapany, P. S., Sadayappan, S., Xue, Y., Powell, G. T., Rani, D. S., Nallari, P., Rai, T. S., Khullar, M., Soarez, P., Bahl, A., Tharkan, J. M., Vaideesewar, P., Rathinavel, A., Narasimhan, C., Ayapati, D. R., Ayub, Q., Mehdi, Q., Oppenheimer, S., Richards, M., B., Price, A. L., Patterson, N., Reich, D., Singh, L., Tyler-Smith, Ch., Thangara, K. (2009): A common MYBPC3 (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. *Nature Genetics*, 41, 187–191.
- Elliott, P., Mckenna, W. J., (2004). Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet*, 363(9424), 1881-1891.
- Elliott, P., Spirito, P. (2008). Prevention of hypertrophic cardiomyopathy-related deaths: theory and practice. *Heart*, 94(10), 1269-1275.
- Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J., Watkins, H. (2004). Cardiac myosin binding protein C. *Circulation research*, 94(10), 1279-1289.
- Frenneaux, M. P. (2004): Assessing the risk of sudden cardiac death in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*, 90(5), 570-575.

- Frey, N., Luedde, M., Katus, H. A. (2012). Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(2), 91-100.
- García-Castro, M., Coto, E., Reguero, J. R., Berrazueta, J. R., Álvarez, V., Alonso, B., Sainz, R., Martín, M., Morís, C. (2009). Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 62(1), 48-56.
- Geier, C., Perrot, A., Ozcelik, C., Binner, P., Counsell, D., Hoffmann, K., Pilz, B., Martiniak, Y., Gehmlich, K., van der Ven, P. F. M., Fürst D. O., Vornwald A., von Hodenberg E., Nürnberg P., Scheffold T., Dietz R., Osterziel K. J. (2003). Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 107, 1390–1395.
- Gersh, B. J., Maron, B. J., Bonow, R. O., Dearani, J. A., Fifer, M. A., Link, M. S., Naidu, S., S., Nishimura, R., A., Ommen, S., R, Rakowski, H., Seidman, C., E., Towbin, J., A., Udelson., J., E., Yancy, C., W. (2011). 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 124(24), e783-e831
- Gregor, P., (2002). Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie. *Interní medicína pro praxi*, 2002(3), 23-24.
- Hayashi, T., Arimura, T., Itoh-Satoh, M., Ueda, K., Hohda, S., Inagaki, N., Takahashi, M., Hori, H., Yasunami, M., Nishi, H., Koga Y., Nakamura H., Matsuzaki M., Choi B. Y., Bae, S. W., You C. W., Han K. H., Park J. E., Knöll R., Hoshijima M., Chien K. R., Kimura A. (2004). Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol*, 44, 2192–2201.
- Helms, A. S., Davis, F., Coleman, D., Bartolone, S., Glazier, A. A., Pagani, F., Yob, J. M., Sadayappan, S., Pedersen, E., Lyons, R., Westfall, M. V., Jones, R., Russel, M. W., Day, S. M. (2014). Sarcomere mutation-specific expression patterns in human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(4), 434–443.
- Ho, C. Y., Landstrom, A. P. Ackerman, M. J. (2010). Genetics and Clinical Destiny: Improving Care in Hypertrophic Cardiomyopathy Response to Ho. *Circulation*, 122(23), 2430-2440.
- Huang, X. C., Quesada, M. A., Mathies, R. A. (2002). DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Analytical chemistry*, 64(18), 2149-2154.
- Hughes, S. E., (2004) The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology*, 44(5), 412-427.

- Chiu, C., Tebo, M., Ingles, J., Yeates, L., Arthur, J. W., Lind, J. M., Semsarian, C. (2007). Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 43(3), 337-343.
- Chung, M. W., Tsoutsman, T., Semsarian, C. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease. *Cell research*, 13(1), 9-20.
- Ingles, J., Doolan, A., Chiu, C. L., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Semsarian, C. (2005). Compound and double mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients: implications for genetic testing and counselling. *Journal of Medical Genetics*, 42(10).
- Jongbloed, R. J., Marcelis, C. L., Doevendans, P. A., Schmeitz-Mulkens, J. M., Van Dookum, W. G., Geraedts, J. P., Smeets, H. J. (2003). Variable clinical manifestation of a novel missense mutation in the alpha-tropomyosin (TPM1) gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(6), 981-986.
- Journal of the American College of Cardiology*, 116, 63-5.
- Kapplinger, J. D., Landstrom, A. P., Bos, J. M., Salisbury, B. A., Callis, T. E., Ackerman, M. J. (2014). Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations from background genetic noise. *Journal of cardiovascular translational research*, 7(3), 347-361.
- Káš, J., Koldíček, M., Valentová, O. (2005). *Laboratorní techniky biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. 1, 143-155. ISBN 80-7080-586-2.
- Kelly, M., Semsarian, C. (2009). Multiple mutations in genetic cardiovascular disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(2), 182-190.
- Klues, H. G., Schiffers, A., Maron, B. J. (1995). Phenotypic spectrum and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: morphologic observations and significance as assessed by two-dimensional echocardiography in 600 patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 26(7), 1699-1708.
- Knickerbine T., Lesser R. J., Brandenburg E. R., Gleason-Han, B. K., Flygenring, B., Longe, T. F., Schwartz, R. S., Maron, B. J. (2009) Identification of unexpected nonatherosclerotic cardiovascular disease with CT angiography. *J Am Coll Cardiol Img*, 2(9), 1085-1092
- Knierim, E., Lucke, B., Schwarz, J. M., Schuelke, M., Seelow, D. (2011). Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *PloS one*, 6(11), e28240.

- Kokado, H., Shimizu, M., Yoshio, H., Ino, H., Okeie, K., Emoto, Y., Matsuyama, T., Yamaguchi, M., Yasuda, T., Fujino, N., Ito, H., Mabuchi, H. (2000): Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by a Lys183 deletion mutation in the cardiac troponin I gene. *Circulation*, 102, 663–669.
- Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R. (2014). Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická onkologie*, 27(3).
- Landstrom, A. P., Ho, C. Y., Ackerman, M. J. (2010). Mutation Type Is Not Clinically Useful in Predicting Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*, 122(23), 2441-2450.
- Landstrom, A. P., Weisleder, N., Batalden, K. B., Bos, J. M., Tester, D. J., Ommen, S., Wehrens, X. H., Claycomb, W. C., Ko, J. K., Hwang, M., Pan, Z., Ma, J., Ackerman, M. J. (2007). Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 42(6), 1026-1035.
- LeWinter, M. M., Granzier, H. L. (2014). Cardiac titin and heart disease. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 63(3), 207.
- Lim, D. S., Lutucuta, S., Bachireddy, P., Youker, K., Evans, A., Entman, M., Roberts, R. Marian, A. J. (2001). Angiotensin II blockade reverses myocardial fibrosis in a transgenic mouse model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 103(6), 789-791.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*, 2012, 251364.
- Lopes, L. R., Zekavati, A., Syrris, P., Hubank, M., Giambartolomei, C., Dalageorgou, C., McKenna, W., UK10k Consortium, Plagnol, V., Elliott, P. M. (2013). Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *Journal of medical genetics*, 50(4), 228-39
- Majewski, J., Rosenblatt, D. S. (2012). Exome and whole-genome sequencing for gene discovery: The future is now!. *Human mutation*, 33(4), 591-592.
- Mango, R., Luchetti, A., Sangiuolo, R., Ferradini, V., Briglia, N., Giardina, E., Ferrè, F., Helmer Citterich, M., Romeo, F., Novelli, G., Sangiuolo, F. (2016). Next generation sequencing and linkage analysis for the molecular diagnosis of a novel overlapping syndrome characterized by hypertrophic cardiomyopathy and typical electrical instability of Brugada syndrome. *Circulation Journal*, 80(4), 938-949.

- Marian, A. J. (2010). Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *European journal of clinical investigation*, 40(4), 360-369.
- Maron B. J., Maron M.S., Semsarian C. (2012) Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* 60:705–715
- Maron, B. J. (2002): Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *The Journal of the American Medical Association*, 287:1308 –20.
- Maron, B. J. (2004). Hypertrophic cardiomyopathy: an important global disease. *The American journal of medicine*, 116(1), 63-65.
- Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M., Gidding, S. S., Kurosaki, T. T., Bild, D. E. (1995). Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. *Circulation*, 92(4), 785-789.
- Maron, B. J., Maron, M. S., Semsarian, C. (2012). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(8), 705-715.
- Maron, B. J., McKenna, W. J., Danielson, G. K., Kappenberger, L. J., Kuhn, H. J., Seidman, C. E., Shah, P. M., Spencer, W. H., Spirito, P., Ten Cate, F. J., Wigle, E. D. (2003): American College of Cardiology/European Society of Cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology foundation task force on clinical expert consensus documents and the European Society of Cardiology committee for practice guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(9), 1687-1713.
- Maron, B. J., Seidman J. G., Seidman C. E.(2004): Proposal for contemporary screening strategies in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(11), 2125-2132.
- Maron, B. J., Shen, W. K., Link, M. S., Epstein, A. E., Almquist, A. K., Daubert, J. P., Bardy, G. H., Favale, S., Rea, R. F., Boriani, G., Estes, N. A., Spirito, P. (2000). Efficacy of implantable cardioverter–defibrillators for the prevention of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 342(6), 365-373.
- Matsson, H., Eason, J., Bookwalter, C. S., Klar, J., Gustavsson, P., Sunnegårdh, J., Enell, H., Jonzon, A., Vikkula, M., Gutierrez, I., Granados-Riveron. J., Pope, M., Bu'Lock, F., Cox, J., Robinson, T. E., Song, F., Brook, D. J., Marston, S., Trybus, K. M., Dahl, N.

- (2008). Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Human molecular genetics*, 17(2), 256-265.
- Meder, B., Haas, J., Keller, A., Heid, C., Just, S., Borries, A., Boisguerin, V., Scharfenberger-Schmeer, M., Stähler, P., Beier, M., Weichenhan, D., Strom, T. M., Pfeufer, A., Korn, B., Katus, H. A., Rottbauer, W. (2011). Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, (2), 110-122.
- Milner, D. J., Taffet, G. E., Wang, X., Pham, T., Tamura, T., Hartley, C., Gardes, A. M., Capetanaki, Y. (1999). The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 31(11), 2063-2076.
- Minamisawa, S., Oshikawa, J., Takeshima, H., Hoshijima, M., Wang, Y., Chien, K. R., Ishikawa, Y., Matsuoka, R. (2004). Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(3), 852-856.
- Olivotto, I., Girolami, F., Ackerman, M. J., Nistri, S., Bos, J. M., Zachara, E., Ommen, S. R., Theis, J. L., Vaubel, R. A., Re, F., Armentano, C., Poggesi, C., Torricelli, F., Cecchi, F. (2008): Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clinic Proceedings*, 83, 630–638.
- Olson, T. M., Doan, T. P., Kishimoto, N. Y., Whitby, F. G., Ackerman, M. J., Fananapazir, L. (2000): Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32(9), 1687-1694.
- Ommen, S. R., Maron, B. J., Olivotto, I., Maron, M. S., Cecchi, F., Betocchi, S., Gersh, B. J., Ackerman, M. J., McCully, R. B., Dearani, J. A., Schaff, H. V., Danielson, G. K., Tajik, A. J., Nishimura, R. A., (2005). Long-term effects of surgical septal myectomy on survival in patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(3), 470-476.
- Osio, A., Tan, L., Chen, S. N., Lombardi, R., Nagueh, S. F., Shete, S., Roberts, R., Willerson, J. T, Marian, A. J. (2007). Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research*, 100(6), 766-768.
- Patel, R., Nagueh, S. F., Tsybouleva, N., Abdellatif, M., Lutucuta, S., Kopelen, H. A., Quinones, M. A., Zoghbi, W. A., Entman, M. L., Roberts, R., Marian, A. J. (2001). Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves

- cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*, 104(3), 317-324.
- Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Pichereau, C., Benaiche, A., Isnard, R., Dubourg, O., Burban, M., Gueffet, J. P., Millaire, A., Desnos, M., Schwartz, K., Hainque, B., Komajda, M. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*, 107(17), 2227-2232.
- Richards, C. S., Bale, S., Bellissimo, D. B., Das, S., Grody, W. W., Hegde, M. R., Lyon, E., Ward, B. E; Molecular Subcommittee of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2008). ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genetics in Medicine*, 10(4), 294-300.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell J., Olsen E., Thiene G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I., Nordet, P. (1996). Report of the 1995 World Health organization/International Society and Federation of cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*, 93, 841-842.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Satoh, M., Takahashi, M., Sakamoto, T., Hiroe, M., Marumo, F., Kimura, A. (1999): Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 262(2), 411-417.
- Seidman C. E., Seidman J. G. (2011) Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ Res*, 108:743–750.
- Seidman, C. (2002). Genetic causes of inherited cardiac hypertrophy: Robert L. Frye Lecture. *Mayo Clin Proc*, 77(12), 1315-1319.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, 21(8), 1794-1805.
- Schwartz, K., Carrier, L., Guicheney, P., Komajda, M. (1995). Molecular basis of familial cardiomyopathies. *Circulation*, 91(2), 532-540.
- Siegert, R., Perrot, A., Keller, S., Behlke, J., Michalewska-Włodarczyk, A., Wycisk, A., Tandra, M., Morano, I., Özcelik, C. (2011). A myomesin mutation associated with

- hypertrophic cardiomyopathy deteriorates dimerisation properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 405(3), 473-479.
- Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L. F., Boer, E. N., Almomani, R., Boven, L. G., Berg, M. P., Spaendonck-Zwarts, K. Y., Tintelen, J.P., Sijmons, R. H., Jongbloed, J. D. H., Sinke, R. J. (2013). Targeted Next-Generation Sequencing can Replace Sanger Sequencing in Clinical Diagnostics. *Human mutation*, 34(7), 1035-1042.
- Silver, M. D., Gotlieb, A. I., Schoen, F. J. (2001). *Cardiovascular pathology*. Churchill Livingstone, 3, 249-302. ISBN 0443065357.
- Šteiner, I., (2008). Patologie hypertrofické kardiomyopatie. *Kardioforum*, 6(2), 1-16.
- Teare, D. (1958). Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *British heart journal*, 20(1), 1-8.
- Tester, D. J., Ackerman, M. J. (2011). Genetic testing for potentially lethal, highly treatable inherited cardiomyopathies/channelopathies in clinical practice. *Circulation*, 123(9), 1021-1037.
- Turtinen, L. W., Juran, B. D. (1998). Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24, 238-239.
- Van Driest, S. L., Ommen, S. R., Tajik, A. J., Gersh, B. J., Ackerman, M. J. (2005): Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clinic Proceedings*, 80(4), 463-469
- Veselka, J. (2006). *Hypertrofická kardiomyopatie a příbuzná témata*. Praha: Galén. *Klinická kardiologie*. ISBN 80-726-2443-1.
- Wang, H., Li, Z., Wang, J., Sun, K., Cui, Q., Song, L., Zou, Y., Wang, X., Liu, X., Hui, R., Fan, Y. (2010). Mutations in NEXN, a Z-disc gene, are associated with hypertrophic cardiomyopathy. *The American Journal of Human Genetics*, 87(5), 687-693.
- Ware, J. S., John, S., Roberts, A. M., Buchan, R., Gong, S., Peters, N. S., Robinson, D. O., Lucassen, A., Behr, E. R., Cook, S. A. (2013). Next generation diagnostics in inherited arrhythmia syndromes. *Journal of cardiovascular translational research*, 6(1), 94-103.
- Watkins, H., Conner, D., Thierfelder, L., Jarcho, J. A., MacRae, C., McKenna, W. J., Maron, B. J., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (1995): Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics*, 11(4), 434-437.
- Watkins, H., Rosenzweig, A., Hwang, D. S., Levi, T., McKenna, W., Seidman, C. E., Seidman, J. G. (1992). Characteristics and prognostic implications of myosin missense

- mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 326(17), 1108-1114.
- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L., Shi, L. (2013). Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer letters*, 340(2), 284-295.
- Yamazaki, T., Suzuki, J. I., Shimamoto, R., Tsuji, T., Ohmoto-Sekine, Y., Ohtomo, K., Nagai, R. (2007). A new therapeutic strategy for hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy in humans. *International heart journal*, 48(6), 715-724.
- Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y., Yu, J. (2010). The next-generation sequencing technology and application. *Protein & cell*, 1(6), 520-536.
- Zou, Y., Wang, J., Liu, X., Wang, Y., Chen, Y., Sun, K., Gao, S., Zhang, C., Wang, Z., Zhang, Y., Feng, X., Song, Y., Wu, Y., Zhang, H., Jia, L., Wang, H., Wang, D., Yan, C., Lu, M., Zhou, X., Song, L., Hui, R. (2013). Multiple gene mutations, not the type of mutation, are the modifier of left ventricle hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Molecular biology reports*, 40(6), 3969-3976.

8.1 Použité internetové zdroje

AlignGVGD [online], Salt Lake City, Utah 84112 USA: Human Cancer Institute University Of Utah [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://agvgd.hci.utah.edu/>

ANKRD1 gene - ankyrin repeat domain 1 [online], 2017. Genetics Home Reference [cit. 2017-05-09]. Dostupné z:

Ensembl [online], 2017. [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.ensembl.org/index.html>

GLA gene - galactosidase alpha [online], 2017. Genetics Home Reference [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/GLA>

HCM Risk-SCD Calculator [online], 2014. European Society of Cardiology [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.doc2do.com/hcm/webHCM.html>

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ANKRD1><http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CAV3>

Human Splicing Finder [online], 2017. Marseille: Aix Marseille Université [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.umd.be/HSF3/>

Hypertrophic Cardiomyopathy: A Patient Perspective, *Circulation* [online]. 2003(108), e133-e135 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://circ.ahajournals.org/content/108/19/e133>

JSI medical systems [online], [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.jsi-medisys.de/>

MASOPUST, Jaroslav, 2005. Molekulová patobiochemie: srdečního selhání (1 část). *Labor Aktuell* [online]. 5(1), 4-8 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2005/LA0105/molekulova.pdf

PolyPhen-2 [online], [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

PrimerBLAST [online], [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

SEQanswers [online], 2017. [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>

SeqCap EZ [online], Roche [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <https://roche-biochem.jp/products/NimbleGen/20-seqcapez/>

SIFT [online], 2006. J. Craig Venter Institute [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.umd.be/HSF3/>

SROOGLE [online], [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://sroogle.tau.ac.il/>