

SPEKTRUM SEKVENČNÝCH VARIANTOV DETEGOVANÝCH U PACIENTOV S KARDIOMYOPATIOU Z VÝCHODNÉHO SLOVENSKA

Iveta Boroňová¹, Jarmila Bernasovská¹, Ján Kmec², Alexander Kiško², Michaela Zigová¹,
Eva Petrejčíková¹, Soňa Mačeková¹, Marta Mydlárová Blaščáková¹

¹ Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra biológie, ul. 17. novembra 1, 081 16 Prešov, Slovensko, e-mail: iveta.boronova@unipo.sk

² Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta zdravotníckych odborov, Partizánska 1, 080 01 Prešov, Slovensko, e-mail: kmecj@fnspresov.sk

Abstract: *Spectrum of sequence variants detected in patients with cardiomyopathy from Eastern Slovakia.* Cardiomyopathies represent a heterogeneous group of myocardial disorders including hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy and arrhythmogenic cardiomyopathy of the (right) ventricle. The development of the new laboratory diagnostics technologies presents new applications for clinical practice. The aim of our study was to perform next generation sequencing (NGS) analyzes of 14 patients (nine males, five females, mean age 57.5±11.9 years) with a clinical diagnosis of cardiomyopathy. NGS analyzes revealed a total of 2,729 sequence variants of 37 different genes including non-synonymous substitutions, synonymous substitutions, insertions, and deletions. 9.5 % of the detected sequence variants based on prediction software were classified as potentially pathogenic variants. Our results of NGS analyzes confirm the assumption that multiple mutations of different genes are likely to be responsible for clinical manifestations of the disease.

Key words: myocardial disorders, genetics, molecular analysis, next generation sequencing, Central Europe

Úvod

Kardiomyopatie sú skupinou heterogénnych idiopatických/familárnych srdcových ochorení, ktoré vykazujú štruktúrne a funkčné abnormality myokardu v dôsledku poškodení myocytov (Augustine a Howard 2018). Podľa klasifikácie Svetovej zdravotníckej organizácie vo vzťahu k morfológii a fyziológii myokardu sú kardiomyopatie klasifikované do štyroch hlavných kategórií: dilatačná kardiomyopatia (DCM), hypertrofická kardiomyopatia (HCM), reštrikčná kardiomyopatia (RCM) a arytmogénna kardiomyopatia pravej komory (ARVC/D; Maron et al. 2006).

Dilatačná kardiomyopatia (DCM) je definovaná ako ochorenie, pri ktorom dochádza k dilatácii a dysfunkcii ľavej srdcovej komory pri absencii hemodynamického alebo ischemického inzultu podmieňujúceho poruchu funkcie. Familiárne formy DCM sú podmienené širokým spektrom genetických defektov génov kódujúcich bielkoviny myokardu (40 génov; Elliott et al. 2008, Burkett a Hershberger 2005, Charron et al. 2010). Príčinné mutácie DCM boli objavené v génoch kódujúcich dystrofin, delta-sarkoglykán, laminín $\alpha 4$ a integrínovú kinázu. Klinicko-genetické štúdie potvrdili asociáciu mutácií génu pre lamín A/C s vyšším rizikom náhlejšej kardiálnej smrti (Malhotra a Mason 2009).

Hypertrofická kardiomyopatia (HCM) je autozómovo dominantne dedičné ochorenie klinicky diagnostikované na základe nejasnej srdcovej hypertrofiie. Epidemiologické štúdie potvrdili prevalenciu HCM približne u 1/500 mladých dospelých jedincov (Maron et al. 2014, Gersh et al. 2011), penetrancia ochorenia je podmienená vekom. Primárnou príčinou HCM sú mutácie génov kódujúcich srdcové sarkomerické proteíny: *TTN*, *MYH7*, *MYH6*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MBYP3*,

TNNC1, *MYH7* a *CTC1* (Goyal, Jassal a Dhalla 2016). Genetická variabilita HCM je pravdepodobne jednou z príčin výraznej fenotypovej variability ochorenia.

Reštrikčná kardiomyopatia (RCM) je stav s reštrikčnou poruchou komorového plnenia, bez zväčšenia komôr s normálnou hrúbkou srdcovej steny (Elliott et al. 2008). V patogenéze RCM zohrávajú dôležitú úlohu gény pre sarkomerické proteíny: troponín T, ľahký reťazec myozínu, ťažký reťazec β -myozínu a proteíny intermediárnych filamentov – desmín a príbuzné proteíny alfa-B-krystalín a plektín (Ashrafian a Watkins 2007, Willott et al. 2010).

V prípade arytmogénnej kardiomyopatie (ARVC) dochádza k nahradeniu myokardu pravej komory tukovým a fibróznym tkanivom a vzniku elektrokardiografických abnormalít (Elliott et al. 2008), u niektorých pacientov dominuje postihnutie ľavej komory (Marcus et al. 2010). Genetickým podkladom arytmogénnej kardiomyopatie sú najčastejšie mutácie génov kódujúcich desmozomálne proteíny plakofilín-2, desmogleín-2, desmocollín-2 (Marcus et al. 2010, Dalal et al. 2006, Basso et al. 2009).

Poznatky genetickej podstaty kardiomyopatií v posledných rokoch zahájili novú etapu v chápaní patofyziológie tohto ochorenia. Genetické mutácie asociované s kardiomyopatiami zohrávajú kľúčovú úlohu pri vzniku ochorenia. S dedičnými formami kardiomyopatií je asociovaných viac ako 80 rôznych génov (tab. 1).

Tab. 1: Prehľad kauzálnych génov kardiomyopatií (upravené podľa Li et al. 2019)

Table 1: Overview of cardiomyopathy causal genes (modified by Li et al. 2019)

Kardiomyopatia	Génové mutácie
Dilatačná	<i>LMNA, MYH7, TNNT2, RBM20, TTN, BAG3, SCN5A, FLNC, TPM1, PLN, TNNC1, TNNI3, EYA4, NEBL, NEXN, ANKRD1, CSRP3, DES, SGCD, ILK, PDLIM3, ACTC1, ABCC9, CRYAB, ACTN2, TCAP, LDB3, VCL, LAMA4, MYH6, MYBPC3, MYPN, CTF1, DEM, DNAJC19, DSC2, DSP, EMD, FHL2, FKTN, FOXD4, LAMP2, PSEN1, PSEN2, SDHA, SYNE1, SYNE2, TAZ, TCAP, TMPO</i>
Hypertrofická	<i>TTN, MYH7, MYH6, MYL2, MYL3, MYBPC3, MYLK2, TNNT2, TNNI3, TPM1, ACTC, TNNC1, LDB3, CSRP3, TCAP, VCL, ACTN2, MYOZ2, NEXN, JPH2, PLN, ANKRD1, CAV3, COX15, CRYAB, GLA, LAMP2, PRKAG2</i>
Reštriktívna	<i>TNNI3, TNNT2, TPNI, MYH7, DES, MYBPC3, LMNA, FLNC, LAMP2</i>
Arytmogénna	<i>DSP, PKP2, DSG2, DSC2, JUP, TMEM43, CTNNA3, DES, LMNA, PLN, RYR2, TGFB3, TTN, SCN5A, ARVC3, ARVC6</i>

Súbor a metódy

Cieľom našej štúdie bola realizácia analýz sekvenovania ďalšej generácie (NGS) u 14 pacientov s klinickou diagnózou kardiomyopatie (DCM: päť mužov a štyri ženy; HCM: traja muži a dve ženy; priemerný vek $57,5 \pm 11,9$ rokov) podľa doporučených postupov American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Diferenciálna diagnostika pacientov analyzovaného súboru bola vykonaná odborným lekármi špecialistami Kardiocentra Fakultnej nemocnice J. A. Reimana v Prešove podľa kritérií Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) a Európskej kardiologickej spoločnosti (ESC). Pacienti zahrnutí do štúdie boli informovaní o výskumnom zámere, účasť v štúdiu potvrdili informovaným súhlasom (EK FNŠP Prešov č. 05442-6/2010-OP; EK PU č. 3/2011).

Molekulárno-genetické analýzy sa realizovali na pracovisku Katedry biológie Fakulty humanitných a prírodných vied Prešovskej univerzity v Prešove v rámci vybudovaného Centra excelentnosti ekológie živočíchov a človeka. DNA odoberatých vzoriek periférnej krvi vybraných pacientov s klinickou diagnózou kardiomyopatie bola extrahovaná komerčne dostupným ReliaPrep™Blood gDNA (Promega, Madison, WI, USA) kitom podľa pokynov výrobcu. Genómová DNA v minimálnej koncentrácii 50 ng/μl sa použila na celoexómové sekvenovanie (WES) platformou IlluminaHiSeq2500. Na prípravu knižníc bol použitý komerčný kit IlluminaTruSeq DNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), na capturing exómov Nimblegen Sequence Capture EZ Library v2.0 (Roche, Madison, WI, USA) a protokoly odporúčané výrobcom. Priemerné pokrytie bolo 98,03 %. Kritériá pre calling sa nastavili na hĺbku pokrytia viac ako 30×. Klinický význam „de novo“ detegovaných sekvenčných variantov bol vyhodnotený predikčnými softvérmi (*Predict SNP*, *PhD-SNP*, *Polyphen 2*, *SIFTa SNAP*, *Mutation Taster*), revidovaný porovnaním s databázou sekvencií *Ensembl*. Potenciálne patogénne mutácie (N = 56) sa overili a potvrdili klasickým Sangerovým sekvenovaním.

Výsledky

Vykonalí sme NGS genomické testovanie s následnou identifikáciou sekvenčných variantov podľa doporučených postupov American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). NGS štúdie odhalili celkovo 2 729 sekvenčných variantov 37 rôznych génov zahrňujúce nesynonymné zámenny, synonymné zámenny, inzercie a delécie. Na základe vyhodnotenia pomocou predikčných softvérov (*Predict SNP*, *PhD-SNP*, *Polyphen 2*, *SIFTa SNAP*, *Mutation Taster*) bolo v prípadoch pacientov s DCM detegovaných 2,2 %, v prípadoch HCM 1,6 % sekvenčných variantov klasifikovaných ako potenciálne patogénne varianty. Najčastejšie sa detegovali sekvenčné varianty v géne pre titín (*TTN*), ktoré predstavovali 23,8 % analyzovaných potenciálne patogénnych variantov. Detekovali sme patogénne mutácie (N = 56), v odbornej literatúre opísané v súvislosti s rozvojom kardiomyopatií (mutácie génov *HFE*, *MYH7*), rovnako ako aj nové nesynonymné varianty, pri ktorých na základe vyhodnotenia predikčnými softvérmi predpokladáme, že majú potenciálne patologický dopad (deväť variantov). Prehľad typov detegovaných sekvenčných variantov u pacientov s HCM a DCM je uvedený v tab. 2.

NGS analýzami sa získalo množstvo údajov, ktoré indikujú diverzitu a polygénny charakter kardiomyopatií.

Tab. 2: Prehľad detegovaných sekvenčných variantov u pacientov s klinickou diagnózou kardiomyopatie

Table 2: Overview of sequence variants detected in patients with clinical diagnosis of cardiomyopathy

Pacient	Klin. dg.	Sekvenčné varianty						
		Celk. počet (N)	Syn.	INDEL	„Stop gain“	Nesyn.	Nové nesyn.	Susp. patog.
1	DCM	198	100	1	0	96	3	7
2	DCM	198	114	3	1	79	2	5
3	DCM	202	119	3	1	78	0	5
4	DCM	210	103	2	0	103	0	10
5	DCM	202	111	2	1	87	4	2
6	DCM	192	109	2	2	79	4	4
7	HCM	179	105	1	0	90	2	3
8	DCM	200	115	1	0	81	1	2
9	HCM	195	105	2	1	85	2	2
10	HCM	180	112	2	2	79	2	2
11	DCM	188	110	3	1	91	1	4
12	DCM	190	103	2	0	80	0	3
13	HCM	195	110	2	0	77	1	5
14	DCM	200	102	1	1	93	0	2

Klin. dg. – klinická diagnóza, Syn. – synonymné, Nesyn. – nesynonymné, Nové nesyn. – nové nesynonymné, Susp. patog. – suspektne patogénne

Klin. dg. – clinical diagnosis, Syn. – synonymous, Nesyn. – nonsynonymous, Nové nesyn. – new nonsynonymous, Susp. patog. – suspect pathogenic

Diskusia

Funkčný význam sekvenčných variantov detegovaných NGS analýzami je predmetom intenzívneho výskumu. Klinický význam DNA sekvenčných variantov sa analyzuje vrámci familiárnych štúdií, ako aj štúdií sporadických prípadov.

Prezentované výsledky predstavujú prvotné údaje štúdia problematiky kardiomyopatií na molekulárnej úrovni na východnom Slovensku, ktoré analyzujú detegované sekvenčné varianty. NGS analýzy našej štúdie 14 pacientov s klinickou diagnózou kardiomyopatie odhalili celkovo 2729 sekvenčných variantov zahrňujúcich aj opakujúce sa typy sekvenčných variantov. V prípadoch pacientov s DCM sa detegovalo 1 980 sekvenčných variantov, v prípadoch HCM pacientov bolo potvrdených 749 sekvenčných variantov. Vyhodnotením detegovaných sekvenčných variantov predikčnými softvérmi (*Predict SNP*, *PhD-SNP*, *Polyphen 2*, *SIFTa SNAP*, *Mutation Taster*) 97,9 % sekvenčných variantov bolo klasifikovaných ako varianty neznámej signifikancie, v prípadoch DCM predstavovali 97,8 %, v prípadoch HCM 98,4 % z celkového počtu detegovaných sekvenčných variantov. Výrazný podiel variantov neznámej signifikancie v prípadoch kardiomyopatií sa potvrdil vo viacerých štúdiách (Akinrinade et al., 2019, Thomson et al. 2019). Potenciálne patogénne varianty v prípadoch DCM predstavovali 2,2 %, v prípadoch HCM 1,6 % detegovaných sekvenčných variantov. Potenciálne patogénne sekvenčné varianty nemusia byť priamo etiopatogenetickými variantami, môžu predstavovať predisponujúce alely, ktorých účasť v etiopatogenéze kardiomyopatií vyžaduje ďalšie mutácie alebo zmeny. Najčastejšie detegovanými variantami v našej štúdií boli sekvenčné varianty v géne pre titín (TTN), ktoré predstavovali 23,8 % analyzovaných potenciálne patogénnych variantov. V prípadoch pacientov s DCM sa detegovali v 19,7 % prípadov, u pacientov s HCM v 4,1 % prípadov. Molekulárne analýzy v štúdií Lu et al. (2018) potvrdili prítomnosť TTN mutácií v 13 % prípadov DCM. Varianty v géne pre titín sú najčastejšie detegovanými variantami dilatačných kardiomyopatií, v prípadoch

hypertrofických kardiomyopatií sú vzácné (Gigli et al. 2016). Štúdia Yottiho, Seidmana a Seidmana (2019) poukázala na významnú prevalenciu sekvenčných variantov v TTN géne, ktoré znižujú kontraktilnú funkciu zníženou sarkomerogenezou. Štúdia Zhanga et al. (2017) potvrdila význam TTN variantov ako genetických modifikátorov HCM v súvislosti so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnej smrti. Prínosom našej štúdie je taktiež detekcia 22 novodetegovaných, v literatúre doposiaľ neopísaných sekvenčných variantov. Na objasnenie klinického významu novodetegovaných sekvenčných variantov sú nevyhnutné ďalšie analýzy početnejších súborov pacientov, ako aj funkčné analýzy.

NGS analýzy poskytujú obrovské množstvo genetických údajov, ktorých spracovanie si vyžaduje dôkladné vyhodnotenie porovnaním s referenčnými databázami ako aj bioinformatické analýzy. Porovnávacia štúdia Walsh et al. (2019) potvrdila, že analýzy distribúcie variantov identifikovaných oblastí s častou lokalizáciou sekvenčných variantov sú v porovnaní s výpočtovými funkčnými predikčnými algoritmami vhodnejším diskriminátorom patogenicity. Kombinácia uvedených prístupov v súčasnej dobe poskytuje v rámci kardiovaskulárnej genetickej medicíny v kontexte personalizovanej starostlivosti účinnejší a precíznejší prístup pre upresnenie stratifikácie rizika pre pacientov s klinickou diagnózou kardiomyopatie a ich rizikových príbuzných.

Záver

Rýchly rozvoj DNA sekvenačných technológií poskytuje nové možnosti identifikácie etiopatogenetických mutácií. V prípadoch detekcie kauzálnej mutácie, prípadne viacerých sekvenčných variantov zodpovedných za ochorenie, je nevyhnutné v spolupráci s odborníkmi klinickej praxe realizovať molekulárnu diagnostiku a začať včasnú profylaktickú liečbu aj u príbuzných pacientov. Naše výsledky NGS analýz zahŕňajúce detekciu celkovo 2729 sekvenčných variantov 37 génov potvrdzujú predpoklad, že za klinické prejavy kardiomyopatií je pravdepodobne zodpovedný väčší počet mutácií rôznych génov. Novodetegované sekvenčné varianty našej štúdie sú predmetom ďalších analýz. Výsledky molekulárno-genetických analýz, v spolupráci s odborníkmi klinickej praxe, umožňujú upresnenie diagnózy kardiomyopatie a identifikáciu asymptomatických jedincov s cieľom ich sledovania, začatia včasnej liečby a prevencie náhlejšej kardiálnej smrti.

PodĎakovanie

Táto štúdia bola podporená projektami APVV-0644-12 a 001PU-2-1/2018.

Literatúra

AKINRINADE, O., HELIÖ, T., LEKANNE DEPREZ, R. H., JONGBLOED, J. D. H., BOVEN, L. G., van den BERG, M. P., PINTO, Y. M., ALASTALO, T. P., MYLLYKANGAS, S., SPAENDONCK-ZWARTS, K. V., TINTELEN, J. P. V., van der ZWAAG, P. A., KOSKENVUO, J., 2019: Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. *Sci. Rep.*, 11, 9(1):1-9.

ASHRAFIAN, H., WATKINS, H., 2007: Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 49:1251-1264.

AUGUSTINE, D. X., HOWARD, L., 2018: Left Ventricular Hypertrophy in Athletes: Differentiating Physiology From Pathology. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, 20(12):2-11.

BASSO, C., CORRADO, D., MARCUS, F., NAVA, A., THIENE, G., 2009: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*, 373:1289-1300.

BURKETT, E. L., HERSHBERGER, R. E., 2005: Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 45:969-981.

DALAL, D., JAMES, C., DEVANAGONDI, R., TICHNELL, C., TUCKER, A., PRAKASA, K., SPEVAK, P. J., BLUEMKE, D. A., ABRAHAM, T., RUSSELL, S. D., CALKINS, H., JUDGE,

D. P., 2006: Penetrance of mutations in plakophilin-2 among families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 48(7):1416-24.

ELLIOTT, P., ANDERSSON, B., ARBUSTINI, E., BILINSKA, Z., CECCHI, F., CHARRON, P., DUBOURG, O., KUHL, U., MAISCH, B., McKENNA, W. J., MONSERRAT, L., PANKUWEIT, S., RAPEZZI, C., SEFEROVIC, P., TAVAZZI, L., KEREN, A., 2008: Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.*, 29:270-276.

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, CH. E., JEFFREY A., TOWBIN, J. A., UDELSON, J. E., CLYDE, W., YANCY, C.W., 2011: ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: Executive summary: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, 124:2761-2796.

GIGLI, M., BEGAY, R. L., MOREA, G., GRAW, S. L., SINAGRA, G., TAYLOR, M. R. G., GRANZIER, H., MESTRONI, L., 2016: A Review of the Giant Protein Titin in Clinical Molecular Diagnostics of Cardiomyopathies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 21(3):1-9.

GOYAL, V., JASSAL, D. S., DHALLA, N. S., 2016: Pathophysiology and prevention of sudden cardiac death. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 94(3):237-44.

CHARRON, P., ARAD, M., ARBUSTINI, E., BASSO, C., BILINSKA, Z., ELLIOTT, P., HELIO, T., KEREN, A., McKENNA, W. J., MONSERRAT, L., PANKUWEIT, S., PERROT, A., RAPEZZI, C., RISTIC, A., SEGGEWISS, H., van LANGEN, I., TAVAZZI, L., EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY WORKING GROUP ON MYOCARDIAL AND PERICARDIAL DISEASES, 2010: Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.*, 31:2715-2726.

LI, C. J., CHEN, C. S., YIANG, G. T., TSAI, A. P., LIAO, W. T., WU, M. Y., 2019: Advanced Evolution of Pathogenesis Concepts in Cardiomyopathies. *J. Clin. Med.*, 16:8(4):1-23.

LU, C., WU, W., LIU, F., YANG, K., LI, J., LIU, Y., WANG, R., SI, N., GAO, P., LIU, Y., ZHANG, S., ZHANG, X., 2018: Molecular analysis of inherited cardiomyopathy using next generation semiconductor sequencing technologies. *Transl. Med.*, 30, 16(1):1-9.

MALHOTRA, R., MASON, P. K., 2009: Lamin A/C deficiency as a cause of familial dilated cardiomyopathy. *Curr. Opin. Cardiol.*, 24(3):203-8.

MARCUS, F. I., McKENNA, W. J., SHERRILL, D., BASSO, C., BAUCE, B., BLUEMKE, D. A., CALKINS, H., CORRADO, D., COX, M. G., DAUBERT, J. P., FONTAINE, G., GEAR, K., HAUER, R., NAVA, A., PICARD, M. H., PROTONOTARIOS, N., SAFFITZ, J. E., SANBORN, D. M., STEINBERG, J. S., TANDRI, H., THIENE, G., TOWBIN, J. A., TSATSOPOULOU, A., WICHTER, T., ZAREBA, W., 2010: Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia (ARVC/D). *Circulation*, 6, 121(13):1533-41.

MARON, B. J., TOWBIN, J. A., THIENE, G., ANTZELEVITCH, C., CORRADO, D., ARNETT, D., MOSS, A. J., SEIDMAN, C.E., YOUNG, J. B. 2006: Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. An American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee, Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 11, 113(14):1807-16.

MARON, B. J., OMMEN, S. R., SEMSARIAN, C., SPIRITO, P., OLIVOTTO, I., MARON, M. S., 2014: Hypertrophic cardiomyopathy: Present and future, with translation into contemporary cardiovascular medicine. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 8, 64(1):83-99.

THOMSON, K. L., ORMONDROYD, E., HARPER, A. R., DENT, T., McGUIRE, K., BAKSI, J., BLAIR, E., BRENNAN, P., BUCHAN, R., BUESER, T., CAMPBELL, C., CARR-WHITE, G., COOK, S., DANIELS, M., DEEVI, S. V. V., GOODSHIP, J., HAYESMOORE, J. B. G.,

HENDERSON, A., LAMB, T., PRASAD, S., RAYNER-MATTHEWS, P., ROBERT, L., SNEDDON, L., STARK, H., WALSH, R., WARE, J. S., FARRALL, M., WATKINS, H. C., 2019: Analysis of 51 proposed hypertrophic cardiomyopathy genes from genome sequencing data in sarcomere negative cases has negligible diagnostic yield. *Genet. Med.*, 21(7):1576-1584.

WALSH, R., MAZZAROTTO, F., WHIFFIN, N., BUCHAN, R., MIDWINTER, W., WILK, A., LI, N., FELKIN, L., INGOLD, N., GOVIND, R., AHMAD, M., MAZAIKA, E., ALLOUBA, M., ZHANG, X., DE MARVAO, A., DAY, S. M., ASHLEY, E., COLAN, S. D., MICHELS, M., PEREIRA, A. C., JACOBY, D., HO, C.Y., THOMSON, K. L., WATKINS, H., BARTON, P. J. R., OLIVOTTO, I., COOK, S. A., WARE, J. S., 2019: Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases: the case of hypertrophic cardiomyopathy. *Genome Med.*, 29, 11(1):1-8.

WILLOTT, R. H., GOMES, A. V., CHANG, A. N., PARVATIYAR, M. S., PINTO, J. R., POTTER, J. D., 2010: Mutations in Troponin that cause HCM, DCM and RCM: what can we learn about thin filament function? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 48:882-892.

YOTTI, R., SEIDMAN, CH. E., SEIDMAN, J. G., 2019: Advances in the Genetic Basis and Pathogenesis of Sarcomere Cardiomyopathies. *Annu. Rev. Genom. Hum. G.*, 20: v tlači. Online. Available: <<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-genom-083118-015306>> 5. 7. 2019

ZHANG, C., ZHANG, H., WU, G., LUO, X., ZHANG, C., ZOU, Y., WANG, H., HUI, R., WANG, J., SONG, L., 2017: Titin-Truncating Variants Increase the Risk of Cardiovascular Death in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Can. J. Cardiol.*, 3(10):1292-1297.