

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



**Využití sekvenování nové generace pro identifikaci  
dědičných poruch způsobujících kardiomyopatie**

**Bakalářská práce**

**Lenka Vysloužilová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

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

### **Prohlášení**

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

V Olomouci dne .....

.....

Podpis

### **Poděkování**

Touto cestou bych chtěla poděkovat panu Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Ústavu molekulární a translační medicíny, paní Miroslavě Rabčanové a Veronice Holinkové, DiS., za pomoc a spolupráci v laboratoři a celé mojí rodině za morální podporu během studia.

## SOUHRN

Kardiomyopatie je onemocnění srdečního svalu spojené s jeho dysfunkcí. Často jsou tato onemocnění spojena s život ohrožující arytmií a jsou jednou z nejčastějších příčin náhlé srdeční smrti, zejména u mladých lidí. Jednou z nejčastějších kardiomyopatií je dilatační kardiomyopatie. V některých případech je příčina nemoci neznámá, ale většinou se jedná o familiární typ onemocnění. Dosud je známo velké množství mutací v různých genech, u nichž byla prokázána asociace se vznikem tohoto onemocnění. V současné době je však samotné genetické vyšetření ekonomicky i časově náročné. I přesto se předpokládá, že se genetické testování stane rutinním vyšetřením.

Z těchto důvodů je teoretická část bakalářské práce zaměřena na problematiku kardiomyopatií, na jejich klasifikaci a familiární typy tohoto onemocnění a na sekvenování nové generace, které lze využít právě k rozšířené identifikaci těchto chorob.

V experimentální části byla připravena DNA knihovna 11 vzorků pacientů s diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií. Následně bylo provedeno sekvenování 46 genů pomocí platformy Illumina na přístroji MiSeq. Detekované varianty byly filtrovány a celkem bylo vytipováno 28 mutací v 9 genech, z nichž 4 varianty byly zhodnoceny jako potenciálně patogenní.

## **SUMMARY**

Cardiomyopathy is an illness of myocardium connected to its dysfunction. Often, these diseases are associated with life-threatening arrhythmias and are one of the most common causes of sudden cardiac death, especially among young people. One of the most common cardiomyopathy is dilated cardiomyopathy. In some cases, the cause of the disease is unknown, but it is usually a familial type of illness. A large number of mutations in various genes have been associated with the development of the disease. However, the actual genetic examination is currently economically and time-consuming. Despite these facts, it is believed that genetic testing will become a routine examination.

For these reasons, the theoretical part of the thesis focused on cardiomyopathy, the classification and familial forms of the disease, and next generation sequencing, which can be used to precisely identify these diseases.

In the experimental part, DNA library of 11 patient samples with dilated cardiomyopathy was prepared. Subsequently sequencing of 46 genes was performed using the Illumina platform on the device MiSeq. Detected variants were filtered and 28 mutations in 9 genes were identified in total. Four variants were evaluated as potentially pathogenic.

## OBSAH

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. ÚVOD .....</b>                                        | <b>8</b>  |
| <b>2. CÍL PRÁCE .....</b>                                   | <b>9</b>  |
| <b>3. KARDIOMYOPATIE .....</b>                              | <b>10</b> |
| 3.1. Klinické projevy .....                                 | 10        |
| 3.2. Léčba .....                                            | 11        |
| 3.3. Historické souvislosti .....                           | 11        |
| 3.4. Klasifikace kardiomyopatií .....                       | 11        |
| 3.4.1. Klasifikace Americké kardiologické asociace .....    | 12        |
| 3.4.2. Klasifikace Evropské kardiologické společnosti.....  | 13        |
| 3.5. Genetika familiárních kardiomyopatií.....              | 14        |
| 3.6. Prevalence a penetrance kardiomyopatií.....            | 18        |
| 3.7. Hypertrofická kardiomyopatie (HCM).....                | 19        |
| 3.8. Dilatační kardiomyopatie (DCM) .....                   | 21        |
| 3.8.1. Genetika familiární DCM.....                         | 22        |
| 3.9. Restriktivní kardiomyopatie (RCM) .....                | 24        |
| 3.10. Arytmogenní kardiomyopatie (pravé komory) (ARVC)..... | 25        |
| 3.11. Nonkompaktní kardiomyopatie (LVNC) .....              | 26        |
| <b>4. SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE.....</b>                    | <b>28</b> |
| 4.1. Platforma společnosti Illumina.....                    | 29        |
| 4.2. Přístupy k sekvenování.....                            | 31        |
| 4.2.1. Celogenomové sekvenování.....                        | 31        |
| 4.2.2. Exomové sekvenování.....                             | 31        |
| 4.2.3. Transkriptomové sekvenování .....                    | 32        |
| 4.2.4. Cílené sekvenování (targeted sequencing).....        | 32        |
| 4.3. Formáty sekvenačních dat .....                         | 32        |
| 4.3.1. Formát FASTQ.....                                    | 32        |
| 4.3.2. Soubor SAM/BAM .....                                 | 33        |
| 4.3.3. Formát VCF.....                                      | 33        |
| <b>5. MATERIÁL A METODIKA .....</b>                         | <b>34</b> |
| 5.1. Materiál .....                                         | 34        |
| 5.1.1. Biologický materiál .....                            | 34        |
| 5.1.2. Použité kity a chemikálie .....                      | 34        |
| 5.1.3. Přístrojové vybavení.....                            | 34        |
| 5.2. Metodika.....                                          | 35        |

|            |                                            |           |
|------------|--------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1.     | Izolace a příprava DNA.....                | 37        |
| 5.2.2.     | Příprava DNA knihovny.....                 | 38        |
| 5.2.3.     | Sekvenace na přístroji MiSeq.....          | 45        |
| <b>6.</b>  | <b>VÝSLEDKY .....</b>                      | <b>46</b> |
| 6.1.       | Dílčí výsledky přípravy DNA knihovny ..... | 46        |
| 6.2.       | Výsledky analýzy DNA.....                  | 48        |
| 6.3.       | Kvalita sekvenačních dat.....              | 50        |
| <b>7.</b>  | <b>DISKUZE .....</b>                       | <b>53</b> |
| <b>8.</b>  | <b>ZÁVĚR.....</b>                          | <b>57</b> |
| <b>9.</b>  | <b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>            | <b>58</b> |
| <b>10.</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>      | <b>67</b> |

## 1. ÚVOD

Kardiomyopatie je označení pro skupinu onemocnění srdečního svalu, která vedou k poruše srdeční funkce. Tato onemocnění jsou spojena s vysokým rizikem život ohrožujících arytmí a jsou jednou z nejčastějších příčin náhlé srdeční smrti, zejména u mladých lidí. Kardiomyopatie vedou k oslabení srdečního svalu a v důsledku toho, má srdce menší schopnost pumpovat krev do celého těla a udržovat normální elektrický rytmus. Rozlišujeme 5 typů tohoto onemocnění, které se liší původem svého vzniku a klinickými projevy, jedná se o kardiomyopatii dilatační, hypertrofickou, restriktivní, arytmogenní a skupinu neklasifikovaných kardiomyopatií.

Ve většině případů je vznik těchto onemocnění geneticky podmíněn. Dědičné formy kardiomyopatií se vyznačují velkou genetickou variabilitou. Dosud bylo identifikováno velké množství mutací v několika různých genech asociovaných s tímto onemocněním. Samotné genetické vyšetření je v současné době ekonomicky i časově náročné. Lze však v budoucnosti očekávat, že se genetické testování stane rutinním vyšetřením v diagnostice dědičných forem kardiomyopatií. Identifikace konkrétních mutací by mohla vést k určitým typům léčby právě na základě genotypu.



## **2. CÍL PRÁCE**

- 1.** Sepsat rešerši na téma kardiomyopatie se zaměřením na kardiomyopatii dilatační a rešerši na téma sekvenování nové generace a problematika sekvenování na platformě Illumina MiSeq.
- 2.** Připravit sekvenační knihovnu DNA pomocí kitu Illumina Trusight Cardiomyopathy panel, sekvenovat vzorky pacientů s kardiomyopatií a pokusit se v kooperaci se spolupracovníky identifikovat patogenní mutace potenciálně související s onemocněním.

### 3. KARDIOMYOPATIE

Pojmem kardiomyopatie označujeme onemocnění srdce spojené s dysfunkcí srdečního svalu. Jedná se o důležitou komplexní skupinu onemocnění srdečního svalu s různou etiologií a heterogenní fenotypovou expresí (Maron *et al.*, 2006). Postihuje lidi všech věkových kategorií, avšak u některých jistých věkových skupin je větší pravděpodobnost určitých typů kardiomyopatií. Je také hlavní příčinou náhlého úmrtí u lidí mladších pětatřiceti let (Cardiomyopathy UK, 2016). Ve většině případů se jedná o onemocnění dědičné. Kardiomyopatie se vyznačuje tím, že je srdeční sval zvětšený, tlustý, případně tuhý a ve vzácných případech je svalová tkáň srdce dokonce nahrazena tkání zjizvenou. Postupně dochází ke slábnutí srdečního svalu a v důsledku toho má srdce menší schopnost pumpovat krev do celého těla a udržovat normální elektrický rytmus. Následkem poté může být srdeční selhání nebo arytmie. Toto oslabení srdce může také zapříčinit další komplikace, jako například problémy srdečních chlopní (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2015).

Kardiomyopatie mohou být získané nebo zděděné. Získanými máme na mysli ty nemoci, se kterými se pacient nenarodil, ale objevily se u něj v důsledku nějakého onemocnění, stavu nebo jiného faktoru. Pokud byl gen zapříčiňující nemoc přenesen z rodiče na potomka, jedná se o kardiomyopatii dědičnou (familiární). V mnoha případech, zejména kardiomyopatie u dětí, není příčina kardiomyopatie známa (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2015).

#### 3.1. Klinické projevy

Někteří pacienti trpící kardiomyopatií žádné příznaky nepociťují a nepodrobují se tak léčbě. U nemocných, u kterých se nemoc vyvíjí rychle, jsou symptomy závažné a často se u nich vyskytují další komplikace. Mezi klasické příznaky patří dušnost nebo potíže s dýcháním, spojené nejčastěji s fyzickou námahou, dále pak celkové vyčerpání, únava a otoky kotníků, dolních končetin, břicha a krčních žil. Mezi další příznaky můžeme zahrnout závratě, točení hlavy, mdloby při fyzické aktivitě, nepravidelný srdeční tep, bolest na hrudi a srdeční šelesty, tedy zvláštní nebo neobvyklé zvuky ozývající se během srdečního tepu (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2015).

### 3.2. Léčba

Jedná se o nevyléčitelné onemocnění, avšak obvykle lze příznaky úspěšně léčit, přičemž většina z postižených vede dlouhý a plnohodnotný život.

Jak již bylo uvedeno, pacienti, u kterých nebyly zaznamenány příznaky, nepodstupují léčbu. U ostatních nemocných je nutná léčba, která ovšem závisí na typu kardiomyopatie, závažnosti příznaků a komplikací, věku a celkovém zdravotním stavu. Léčba zahrnuje změnu životního stylu, léky, chirurgické ošetření, implantace přístrojů ke korekci arytmií a další nechirurgické postupy. Hlavním cílem léčby je kontrolovat projevy nemoci, snížit komplikace a riziko náhlé srdeční zástavy a zabránit v jejím zhoršování (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2015). Jedinou možnou kurativní léčbou by mohla být genová terapie. Cílem lékařské vědy by mělo být právě nalezení možnosti ovlivnění genetické poruchy (Veselka *et al.*, 2009). Předpokládá se, že samotná identifikace různých mutací, by v budoucnosti mohla vést k diferencovanému přístupu k léčbě kardiomyopatií na podkladě různých genotypů (Špinarová *et al.*, 2007).

### 3.3. Historické souvislosti

Poprvé byl termín *kardiomyopatie* použit v roce 1957 (Maron *et al.*, 2006). V následujících letech bylo prosazováno velké množství definic kardiomyopatie. V roce 1968 definovala Světová zdravotnická organizace (WHO) kardiomyopatie jako onemocnění odlišné a často neznámé etiologie, v němž je dominantním prvkem kardiomegalie a srdeční selhání (Abelmann, 1984). V původní klasifikaci WHO, z roku 1980, je kardiomyopatie popsána jako onemocnění srdečního svalu neznámé etiologie. Tato definice je odrazem nedostatku dostupných informací o příčinách a základních mechanismech nemoci. V roce 1995 byla definice aktualizována a představila kardiomyopatie jako myokardiální onemocnění spojená se srdeční dysfunkcí, která poprvé zahrnovala i restriktivní kardiomyopatie, arytmogenní kardiomyopatie a nonkompaktní kardiomyopatie (Richardson *et al.*, 1996).

### 3.4. Klasifikace kardiomyopatií

Mnohé kardiomyopatie jsou způsobeny mutacemi v genech, které kódují různé srdeční proteiny, a proto se jako alternativní přístup pro klasifikaci kardiomyopatií nabízí rozdělení podle vyvolávajícího genetického defektu (Thiene *et al.*, 2004). I když je však genetický defekt v rodině znám, je nutné identifikaci klinicky relevantního onemocnění prokázat morfologickým fenotypem. Z tohoto důvodu je nejužitečnější metodou

pro diagnostiku klinicky orientovaný klasifikační systém, ve kterém jsou srdeční poruchy rozděleny do skupin podle morfologie a funkce srdečního svalu (Elliott *et al.*, 2008).

V současné době existují dva klasifikační systémy, publikované americkou kardiologickou asociací (Maron *et al.*, 2006) a evropskou kardiologickou společností (Elliott *et al.*, 2008). Oba systémy obsahují mnoho společných kritérií, ale rovněž několik odlišností, které vedou k jisté nejednoznačnosti v nomenklatuře (Maron *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2008).

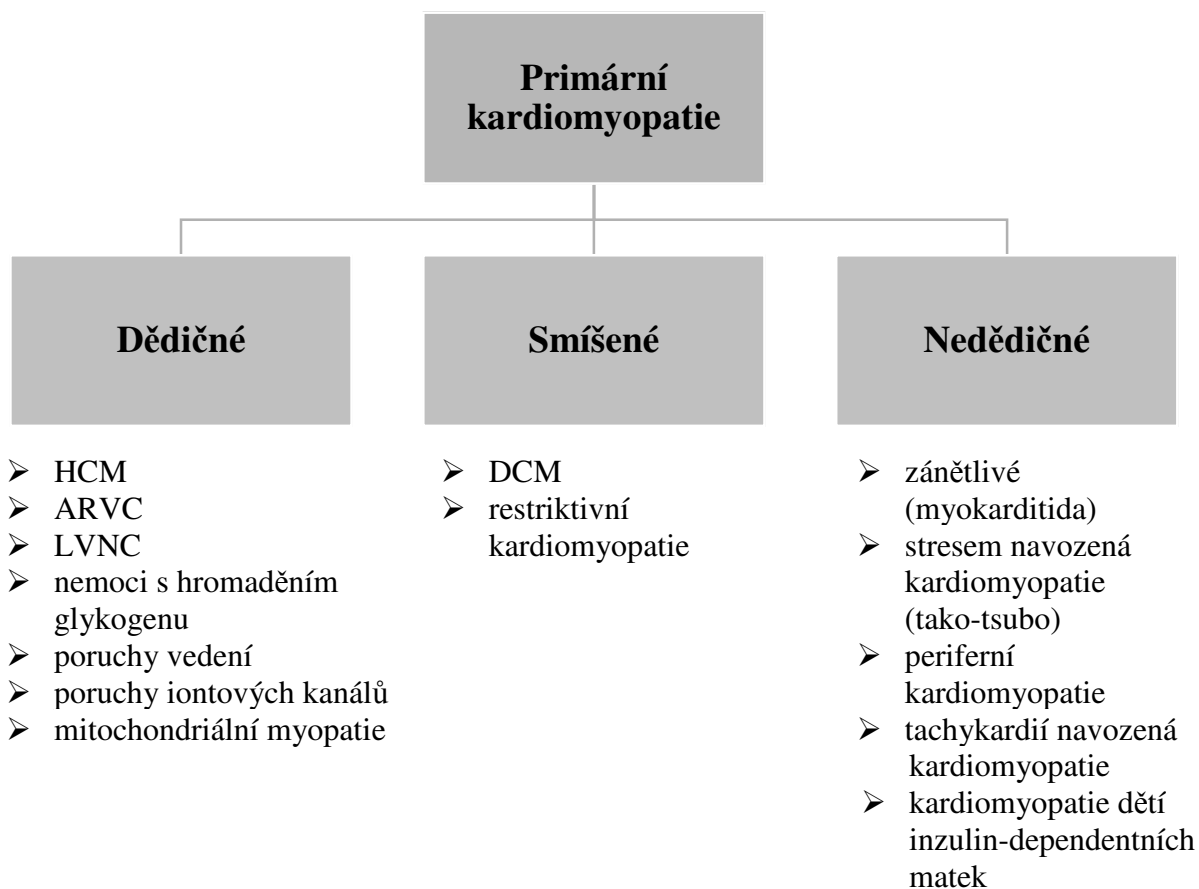
#### **3.4.1. Klasifikace Americké kardiologické asociace**

Podle Americké kardiologické asociace (American Heart Association – AHA) je kardiomyopatie definována jako heterogenní skupina onemocnění myokardu spojená s mechanickou a/nebo elektrickou dysfunkcí, která obvykle (ale ne nevyhnutelně) vykazují nepřiměřenou ventrikulární hypertrofii anebo dilataci a jsou způsobena různými příčinami, často genetickými. Kardiomyopatie jsou buď omezeny na srdce, nebo jsou součástí generalizovaných systémových onemocnění. Mnohdy také vedou ke kardiovaskulárnímu úmrtí nebo snížení kvality života v důsledku srdečního selhání (Maron *et al.*, 2006).

Objev dědičných poruch iontových kanálů kardiomyocytů jako příčiny jejich dysfunkce s možným vznikem maligních arytmií a zejména výrazný pokrok v kardiogenetice umožnil vznik nové klasifikace. Stavy, při kterých dochází k poškození myokardu v důsledku ischemie, chlopenní vady, systémové hypertenze, vrozené srdeční vady, postižení v důsledku nádorové infiltrace a onemocnění endokardu bez významného poškození myokardu, nejsou v americké klasifikaci zařazeny (Maron *et al.*, 2006).

Kardiomyopatie jsou rozděleny do dvou hlavních skupin na základě zapojení převládajícího orgánu – primární a sekundární kardiomyopatie. Primární kardiomyopatie postihují výhradně nebo převážně srdeční sval a jsou dále členěny na dědičné, smíšené a nedědičné (viz **Obr. 1**). Sekundární kardiomyopatie zahrnují takové postižení srdce, které je součástí systémového nebo multiorgánového onemocnění. Ty se dále dělí do mnoha podkategorií podle základního onemocnění (Maron *et al.*, 2006).

**Obr. 1: Klasifikace primárních kardiomyopatií podle American Heart Association:** hypertrofická kardiomyopatie (HCM), arytmogenní kardiomyopatie (ARVC), nonkompaktní kardiomyopatie (LVNC), dilatační kardiomyopatie (DCM) (Maron *et al.*, 2006)



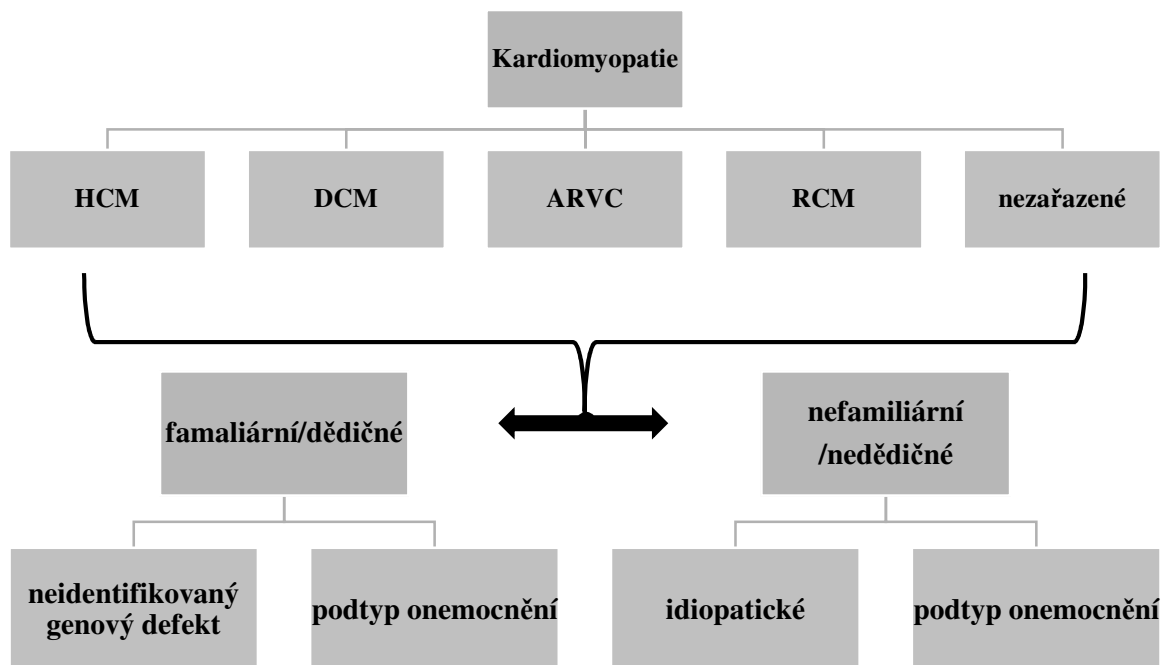
### 3.4.2. Klasifikace Evropské kardiologické společnosti

Evropská kardiologická společnost (European Society of Cardiology – ESC) definuje kardiomyopatii jako myokardiální postižení, při kterém je srdeční sval strukturálně a funkčně poškozen, při současné nepřítomnosti koronární nemoci, hypertenze, chlopenní vady nebo vrozené srdeční vady schopné způsobit toto postižení (Elliot *et al.*, 2008).

Evropská klasifikace rozděluje kardiomyopatii podle morfologických a funkčních kritérií a následně jednotlivé podskupiny člení na familiární a nefamiliární (viz **Obr. 2**). Pro zjednodušení schématu klasifikace a zlepšení povědomí o širokém spektru onemocnění se ESC zřídka rozdělení kardiomyopatií na primární a sekundární (Elliot *et al.*, 2008).

Rozdělení na dědičné a nedědičné kardiomyopatie je u obou klasifikačních systémů podobné, jakožto i vyloučení stavů způsobených ischemickým nebo hemodynamickým inzultem. Hlavní odlišností mezi oběma klasifikacemi je nezařazení poruch iontových kanálů a převodních poruch v evropské klasifikaci.

**Obr. 2: Klasifikace kardiomyopatií podle European Society of Cardiology:** hypertrofická kardiomyopatie (HCM), dilatační kardiomyopatie (DCM), arytmogenní kardiomyopatie (ARVC), restriktivní kardiomyopatie (RCM) (Elliott, 2008)



### 3.5. Genetika familiárních kardiomyopatií

Značná část případů kardiomyopatií je spojena s familiárním výskytem. K tomuto zjištění se dospělo pozorováním výskytu nemoci v rodinách. Ale zejména díky rozvoji molekulárních a genetických laboratorních metod mohly být objeveny a identifikovány lokusy, konkrétní geny a přesné mutace, které jsou odpovědné za vznik tohoto onemocnění (Veselka *et al.*, 2009).

V případě kardiomyopatií se jedná o monogenně dědičné onemocnění. Problematika dědičnosti jednotlivých typů kardiomyopatií se do jisté míry překrývá (viz **Obr. 3**). Pro všechny kardiomyopatie je typická genetická a alelická variabilita. Dosud bylo identifikováno velké množství mutací v několika různých genech asociovaných se vznikem kardiomyopatií. Často jsou různé morfologické formy onemocnění zapříčiněny mutacemi ve stejných genech, někdy jen několik nukleotidů od sebe. Vliv mutace na strukturu a funkci proteinu poté určí klinický obraz onemocnění (Perrot *et al.*, 2007). Takovýto společný genetický základ kardiomyopatií představují například geny pro sarkomerické proteiny, které mohou být postiženy prakticky u jakéhokoliv typu kardiomyopatií (Elliott *et al.*, 2008;

Maron *et al.*, 2006). Vzájemná propojenost jednotlivých typů kardiomyopatií je na genetické úrovni pravděpodobně velmi těsná. Při analýze některých pacientů s jednou fenotypovou formou kardiomyopatií je možné nalézt i mutace asociované s jiným morfologickým typem onemocnění (Haas *et al.*, 2015). Jasně vysvětlení pro tyto nálezy neexistuje. Mohou být způsobeny vlivem dalších genetických variant nebo epigenetických mechanismů, ale zčásti může také jít o zachycení nemoci v takovém stádiu, kdy již připomíná fenotyp jiného onemocnění, například konečné stádium arytmogenní a dilatační kardiomyopatie (Pinamonti *et al.*, 2014). Některé ze vztahů mezi genotypem a průběhem nemoci je schopno objasnit až dlouhodobé klinické sledování detailně geneticky vyšetřených pacientů. Toto úsilí je ztěžováno velkým počtem známých mutací a asociacemi nalezenými na malých kohortách pacientů, jež se nedaří prokázat v následujících studiích, ale právě možnost přesné predikce klinického průběhu onemocnění na základě konkrétní nalezené mutace by měla velký význam pro péči o pacienty (Pankuweit *et al.*, 2015).

Charakter jednotlivých mutací je rovněž vysoce variabilní, byly identifikovány jak mutace měnící smysl (missense), posunové a nesmyslné mutace (nonsense), tak i delece nebo inserce. Navíc jsou mutace lokalizovány po celé délce genu bez převládajícího umístění (Charron *et al.*, 2010).

Následkem genetické variability je taktéž variabilita fenotypová s někdy poměrně rozdílným klinickým obrazem. V některých případech se objevuje zcela odlišný klinický obraz i v rámci jedné rodiny, který je pravděpodobně způsoben modulujícími genetickými faktory a vlivem vnějšího prostředí (Ashrafian *et al.*, 2007).

Obecně je riziko vzniku onemocnění u příbuzných pacienta určeno způsobem genetického přenosu. V případě autosomálně dominantního přenosu je riziko postižení příbuzných 50 %. U autosomálně recesivních znaků je riziko přenosu na potomka dvou heterozygotů 25 %, potomka dvou homozygotů 100 % a potomka heterozygota a homozygota 50 %. V případě gonosomálně recesivních znaků má postižený muž zdravé syny a dcery přenašečky, u ženy přenašečky je riziko postižení synů a přenašečství u dcer 50 %.

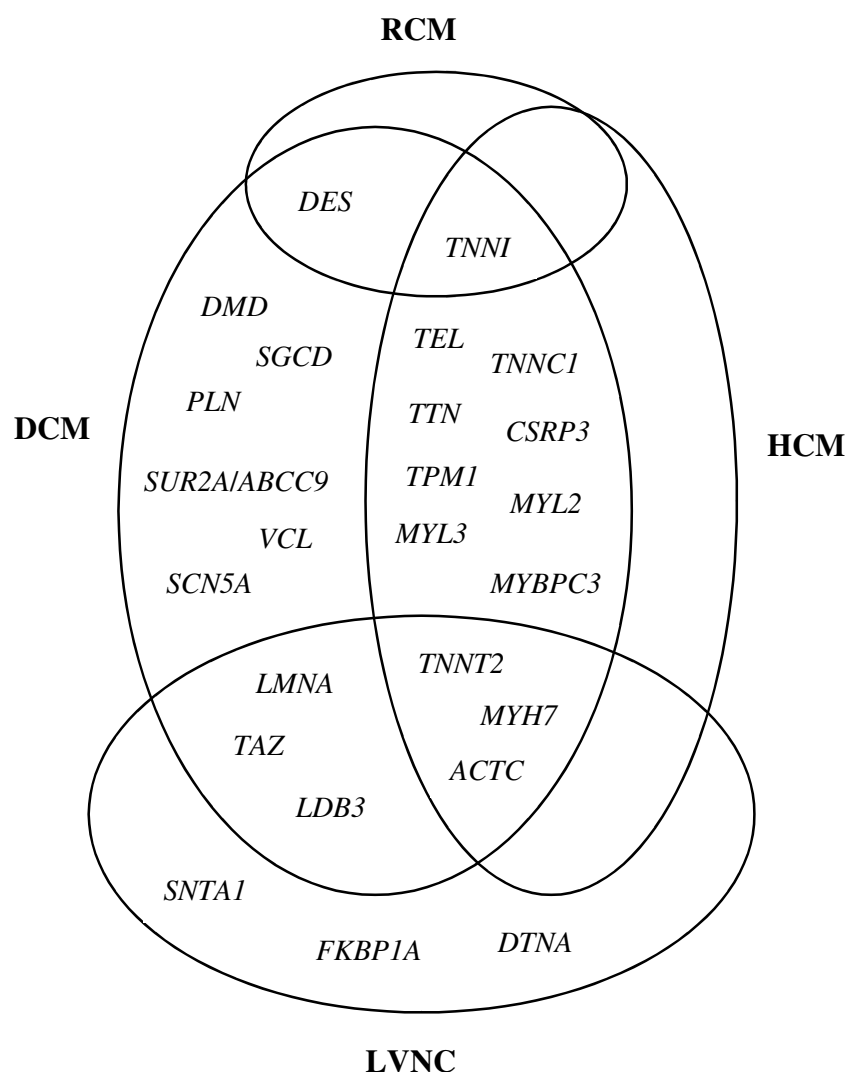
V současné době není genetické vyšetření běžně využíváno ke stanovení diagnózy (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006). Důvodem je jednoduchost morfologického rozdělení kardiomyopatií, ekonomická a časová náročnost genetického vyšetření, jeho omezená výtěžnost a také malé ovlivnění péče o pacienty (Brdička *et al.*, 2015). Významné je genetické vyšetření při identifikaci nositelů mutace u příbuzných pacientů (Charron *et al.*, 2010). V případě identifikace příčinné mutace u probanda je přesná DNA diagnostika jeho příbuzných rychlou a poměrně levnou metodou, která vyřeší problém s neúplnou penetrancí

a dokáže určit nosičství mutace a tedy i riziko vzniku onemocnění u každého jedince. Genetické testování představuje také nástroj pro rozšíření poznatků o genetické povaze nemoci a o patofyziologických mechanismech, jehož cílem je co nejlépe předpovědět klinický vývoj onemocnění (Brdička *et al.*, 2015). Součástí doporučených postupů v péči o rodiny pacientů s dědičnými typy kardiomyopatií je genetické poradenství (Charron, 2010).

V dnešní době je prostřednictvím moderních velkokapacitních metod genetického vyšetření, zejména sekvenováním nové generace, možné provádět rychlou analýzu velkého počtu genů, exomu nebo celého genomu. Tato genetická testování jsou vhodná u pacientů s kardiomyopatiemi, kdy se zvyšuje časová i ekonomická efektivita vyšetření. S rozvojem těchto metod se také zvyšuje množství získaných dat o genetických variantách. Bioinformatické zpracování těchto dat a správná klinická interpretace hraje podstatnou roli v pochopení genetické povahy onemocnění (Coppini *et al.*, 2014; Haas *et al.*, 2015). Nalezené varianty DNA se klasifikují podle úrovně důkazů kauzality k vývoji onemocnění na patogenní, pravděpodobně patogenní, benigní, pravděpodobně benigní a varianty nejasného významu (Gersh *et al.*, 2011; Coppini *et al.*, 2014).



**Obr. 3: Překryv genů obsahujících příčinné mutace různých typů kardiomyopatií:** desmin (*DES*), dystrofin (*DMD*),  $\delta$ -sarkoglykan (*SGCD*), lamin A/C (*LMNA*), ATP-senzitivní draslíkový kanál (*SUR2A/ABCC9*), fosfolamban (*PLN*), metavinkulin (*VCL*), tafazzin (*TAZ*), srdeční sodíkový kanál (*SCN5A*), cypher/ZASP (*LDB3*), srdeční troponin I (*TNNI3*), srdeční troponin C (*TNNC1*), srdeční troponin T (*TNNT2*), teletonin (*TEL*), titin (*TTN*),  $\alpha$ -tropomyozin (*TPM1*), svalový LIM protein (*CSRP3*), myozin-vazebný protein C (*MYBPC3*), těžký řetězec  $\beta$ -myozinu (*MYH7*), srdeční  $\alpha$ -aktin (*ACTC*), regulační podjednotka lehkého řetězce myozinu (*MYL2*), esenciální podjednotka lehkého řetězce myozinu (*MYL3*), FK506 vazebný protein 1A (*FKBP1A*),  $\alpha$ 1-syntrofin (*SNTA1*),  $\alpha$ -dystrobrevin (*DTNA*) (Perrot *et al.*, 2007, upraveno)



### 3.6. Prevalence a penetrance kardiomyopatií

Kardiomyopatie mají rozdílnou prevalenci, například hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je relativně časté onemocnění, zatímco restriktivní kardiomyopatie (RCM) nebo nonkompaktní kardiomyopatie (LVNC) se zařazuje mezi onemocnění vzácná. Absence symptomů u některých pacientů s rozvinutým fenotypem kardiomyopatie, penetrance stoupající s věkem nositelů mutace, ale také obtížné zařazení fenotypu do jednotlivé kategorie onemocnění, výrazně komplikují studium přesného výskytu nemoci (Brdička *et al.*, 2015). V případě vzácnějších typů kardiomyopatií neexistují přesné hodnoty prevalence. S výjimkou endemicky zvýšeného výskytu arytmogenní kardiomyopatie v Itálii nejsou známy podstatné regionální rozdíly v prevalenci jednotlivých typů onemocnění (Vassalini *et al.*, 2015). O prevalenci kardiomyopatií v České republice nemáme k dispozici přesné údaje, ale dá se předpokládat, že se v zásadě nebudou lišit od již zveřejněných hodnot (Brdička *et al.*, 2015).

Penetrance je definována jako míra procentuálního zastoupení nositelů mutace, u kterých se projeví fenotyp onemocnění. Toto pojetí poukazuje na doživotní riziko vzniku onemocnění. Penetrance může být kompletní, tedy 100 %, v případě, že se u všech nositelů mutace onemocnění vyvine, nebo neúplná, kdy se u nositelů mutace nemusí fenotyp nemoci projevit (Charron *et al.*, 2010). Většina autosomálně recesivních kardiomyopatií je spojená s úplnou penetrancí před dosažením dospělosti, zatímco většina autosomálně dominantních typů kardiomyopatií se vyznačuje neúplnou penetrancí nebo penetrancí závislou na věku (Rankin *et al.*, 2008; Dalal *et al.*, 2006; Maron *et al.*, 2001). Všechny typy kardiomyopatií mají s věkem stoupající penetranci a fenotyp onemocnění se může vyvinout až do věku kolem 60 let (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006; Charron *et al.*, 2010). Základní informace o prevalenci, penetranci a způsobu přenosu jsou zaznamenány v **Tab. 1**.

**Tab. 1: Základní údaje o dědičnosti a prevalenci kardiomyopatií:** autosomálně dominantní (AD), autosomálně recesivní (AR) (Charron *et al.*, 2010)

|               | HCM                            | DCM                         | RCM             | ARVC              | LVNC     |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------|----------|
| Dědičná forma | Téměř vždy                     | 20-35 %                     | Možná           | Téměř vždy        | Možná    |
| Typ přenosu   | AD (většinou)                  | AD (většinou)               | AD (většinou)   | AD (většinou)     | AD       |
|               | AR                             | AR                          |                 | AR (syndromická)  | X-vázaný |
|               | X-vázaný mitochondriální       | X-vázaný                    |                 |                   |          |
| Penetrance    | Závislá na věku                | Závislá na věku             | Závislá na věku | Závislá na věku   | Neznámá  |
|               | Téměř kompletní v 50-60 letech | Téměř kompletní v 60 letech |                 | Často nekompletní |          |
| Prevalence    | 1:500                          | 1:2500                      | vzácná          | 1:2000-1:5000     | vzácná   |

### 3.7. Hypertrofická kardiomyopatie (HCM)

Jedná se o klinicky heterogenní onemocnění, které je definováno přítomností zvětšené tloušťky a/nebo masy myokardu levé komory srdeční při absenci arteriální hypertenze nebo vrozených a chlopenních vad schopných zapříčinit danou míru hypertrofie (Elliott *et al.*, 2008). Onemocnění jako takové bylo poprvé popsáno v roce 1958 britským patologem Tearem (Teare, 1958). HCM bylo dlouho považováno za vzácné, ale za pomoci dnešních diagnostických možností, daných zejména rozvojem echokardiografie, bylo prokázáno, že jde o nejčastější monogenně dědičné onemocnění srdce s prevalencí 1:500 v obecné populaci (Maron *et al.*, 1995; Maron *et al.*, 2013). Podle studií ze Spojených Států se jedná o nejčastější příčinu náhlé srdeční smrti u mladých lidí, včetně trénovaných sportovců (Maron *et al.*, 2006).

Klinický průběh HCM je různorodý, u většiny pacientů je prognóza porovnatelná s obecnou populací, avšak rizikové skupiny pacientů jsou ohroženy náhlou srdeční smrtí (Maron *et al.*, 2013). Diagnostika je prováděna pomocí zobrazovacích metod, zejména echokardiografií a magnetickou rezonancí, kdy je sledován fenotyp onemocnění, konkrétně hypertrofie levé komory.

Způsob přenosu HCM je většinou autosomálně dominantní. Příčinou vzniku nemoci jsou především mutace v genech kódujících sarkomerické proteiny (Maron, 1995 *et al.*; Maron *et al.*, 2013). Významné bývá zkrácení těchto proteinů v důsledku zejména mutací měnících smysl, ale také inzercí, delecí a sestřihových variant (Maron *et al.*, 2006).

V současné době je známo více než 1400 mutací v alespoň 20 různých genech způsobujících HCM. Jako první byla identifikována mutace v genu pro těžký řetězec  $\beta$ -myosinu (Maron *et al.*, 2013; Yingchoncharoen *et al.*, 2014).

Velká genetická variabilita zapříčiňuje velkou variabilitu fenotypu, ale také variabilitu klinických projevů nemoci i v rámci jedné rodiny. Fenotypové projevy jsou také ovlivněny modifikačními geny a faktory životního prostředí (Maron *et al.*, 2006). Možné příčiny dědičné i nedědičné hypertrofické kardiomyopatie jsou zaznamenány v **Tab. 2**.

Penetrance fenotypu nemoci je závislá na věku jako i u jiných typů kardiomyopatií. Nejčastěji vzniká v adolescenci, ale až do věku asi 60 let penetrance stoupá až na 95 % (Maron *et al.*, 2006). U mladší populace je HCM často spojována s vrozenými syndromy, dědičnými metabolickými poruchami a neuromuskulárními onemocněními (Elliott *et al.*, 2008).

V současné době neexistuje žádná kauzální léčba, tedy léčba zaměřená přímo na příčinu nemoci. Ke změnám klinického průběhu nedochází ani v případě preventivní farmakoterapie u nositelů genotypu před vývojem fenotypu (Ho *et al.*, 2015; Axelsson *et al.*, 2015). Dostupná léčba slouží k potlačení symptomů srdečního selhání nebo je zaměřena na úlevu od případné nitrokomorové obstrukce a na prevenci náhlé srdeční smrti (Maron *et al.*, 2013).

**Tab. 2: Příčiny hypertrofické kardiomyopatie** (Veselka *et al.*, 2009)

| Dědičné příčiny                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Nedědičné příčiny                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Mutace sarkomerických proteinů <ul style="list-style-type: none"> <li>– těžký řetězec <math>\beta</math>-myosinu</li> <li>– myozinový vazebný protein C</li> <li>– troponin I</li> <li>– troponin T</li> <li>– A tropomyozin</li> <li>– esenciální lehký řetězec myozinu</li> <li>– regulační lehký řetězec myozinu</li> <li>– aktin</li> <li>– titin</li> <li>– troponin C</li> <li>– teletonin</li> <li>– svalový LIM protein</li> <li>– nebulette</li> </ul> Onemocnění s hromaděním glykogenu<br>Lyzosomální střádavá onemocnění<br>Poruchy metabolismu mastných kyselin<br>Deficit karnitinu<br>Deficit kinázy fosforylázy B<br>Mitochondriální cytopatie<br>Vrozené syndromy <ul style="list-style-type: none"> <li>– noonanové</li> <li>– LEOPARD</li> <li>– Friedrichova ataxie</li> <li>– Beckwithův-Wiedemannův</li> <li>– Swyerův</li> </ul> Hereditární amyloidóza | Obezita<br>Děti inzulin-dependentních matek<br>Amyloidóza |

### 3.8. Dilatační kardiomyopatie (DCM)

Toto onemocnění je charakteristické dilatací a systolickou dysfunkcí levé komory srdeční při nepřítomnosti hemodynamické (hypertenze, chlopenní vady) nebo ischemické příčiny dostatečné pro vznik globální poruchy systolické funkce. Může být přítomno také postižení pravé komory, avšak pro stanovení diagnózy není nutné (Elliott *et al.*, 2008). Dříve bylo toto onemocnění považováno za idiopatické a sporadické, avšak na základě poznatků v genetice a dalších oblastech medicíny je dnes DCM pokládána převážně za primárně podmíněné onemocnění (Veselka *et al.*, 2009).

DCM vede k progresivnímu selhání srdce, poklesu kontraktilní funkce levé komory, ventrikulární a supraventrikulární arytmii, abnormalitám převodního systému, tromboembolií a k náhlé srdeční smrti. Jedná se o celkem běžné a převážně nevratné onemocnění srdečního

svalu. Je třetí nejčastější příčinou srdečního selhání a nejčastější příčinou transplantace srdce (Maron *et al.*, 2006; Stehlik *et al.*, 2012).

V běžné klinické praxi se s tímto onemocněním můžeme setkat poměrně často. Například v americké populaci se její incidence odhaduje na 6 případů na 100 000 obyvatel ročně, prevalence na 36 pacientů na 100 000 obyvatel a během sledovaného období měla tendenci mírně vzrůstat (Codd *et al.*, 1989). V obecné dospělé populaci se prevalence odhaduje na 1:2500. DCM se může klinicky projevit v různém věku (Maron *et al.*, 2006). Vyskytuje se již v dětském věku, její incidence poté stoupá a vrcholu dosahuje kolem 50 let (Charron *et al.*, 2010).

Základem diagnostiky je echokardiografie, případně magnetická rezonance, pro zobrazení dilatované levé komory se systolickou dysfunkcí (Maron *et al.*, 2006).

Stav, kdy nedochází u pacientů s DCM k výrazné dilataci levé komory, je označován jako kardiomyopatie s minimální dilatací (MDCM). Familiární typ MDCM je pozorován až u poloviny pacientů. Klinický obraz a prognóza MDCM jsou velmi podobné jako u DCM (Keren *et al.*, 1990).

Zvláštní formou DCM je také peripartální neboli těhotenská kardiomyopatie (PPCM), která se projevuje srdečním selháním v posledním měsíci těhotenství nebo během 5 měsíců po porodu (Elkayam *et al.*, 2005). Mezi možné etiologické faktory patří myokarditida, autoimunitní postižení a hemodynamický stres během těhotenství. PPCM se může objevit v každém věku, ale častější je u žen starších 30 let (Elliott *et al.*, 2008).

Vznik dilatační kardiomyopatie může mít mnoho příčin. Kromě častého familiárního výskytu může být DCM způsobena myokarditidou, virovou perzistencí nebo například nadměrným užíváním alkoholu. Dědičné a nedědičné příčiny vzniku DCM jsou uvedeny v **Tab. 3**.

### **3.8.1. Genetika familiární DCM**

Přibližně 25-40 % případů DCM má familiární výskyt. Familiární DCM je zapříčiněna mutacemi v různých genech pro srdeční proteiny (Charron *et al.*, 2010; Burkett *et al.*, 2005). Byly identifikovány mutace až ve 40 genech kódujících zejména sarkomerické a cytoskeletální proteiny a proteiny jaderného obalu (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006).

Nejčastější způsob přenosu je autosomálně dominantní, ale je možný také přenos autosomálně recesivní a gonozomálně recesivní. Jako první byla identifikována mutace v genu pro dystrofin, který je základní součástí dystroglykanového komplexu propojujícího

extracelulární matrix a cytoskeleton myocytů (i kosterních svalů) (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006; Burkett *et al.* Hershberger, 2005). Tento typ onemocnění je označován jako X-vázaná DCM a je alelickou variantou svalových dystrofií Duchennova a Beckerova typu s akcentovaným srdečním a potlačeným svalovým fenotypem (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006). Způsob přenosu je v tomto případě samozřejmě gonosomální. Mutace zapříčiňující DCM byly nalezeny i u dalších komponent dystroglykanového komplexu, jedná se o  $\delta$ -sarkoglykan, laminin  $\alpha 4$  a integrinovou kinázu (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006; Burkett *et al.* Hershberger, 2005). Desmin je klíčový protein intermediárních filament, udržující správné uspořádání myofibril, jehož některé mutace mohou zapříčinit kardiální poškození s obrazem DCM (Burkett *et al.* Hershberger, 2005). Postižení genů kódujících proteiny jaderného obalu, lamin A/C a emerin, způsobuje autosomálně dominantně vázanou a X-vázanou formu Emeryho-Dreifussovy muskulární dystrofie s různě vyjádřeným srdečním postižením, vyskytující se zpravidla společně s převodními poruchami (Perrot *et al.*, 2007). Mutace v genu pro lamin A/C jsou spojovány s vyšším rizikem náhlé srdeční smrti (van Rijsingen *et al.*, 2013).

Až dosud technická omezení bránila většímu přínosu informací o všech klinicky významných genech asociovaných s DCM ve větších kohortách. Tyto hranice byly překonány využitím sekvenování nové generace a mohly tak být prozkoumány všechny geny spojené s familiární DCM ve velké kohortě. Výsledkem testování dosud největšího počtu pacientů (celkem 639 pacientů) s familiární a sporadickou DCM z několika evropských center bylo, že nejčastěji se nacházely mutace v genech kódujících plakophilin 2, myozin-vazebný protein C a desmoplakin. Kromě těchto mutací byly nalezeny varianty, u kterých se předpokládá spojitost s DCM, také v genu pro ryanodinový receptor 2, desmokolin 2 a desmoglein 2. Bylo také zachyceno velké množství mutací, které jsou asociovány i s jinými typy kardiomyopatií, zejména s arytmogenní a hypertrofickou kardiomyopatií. Zajímavým zjištěním také bylo velké procento pacientů s vícečetnými mutacemi, které činilo více než 38 %. Zastoupení mutací v jednotlivých evropských oblastech bylo zhodnoceno jako relativně rovnoměrné. Výsledky tohoto testování rovněž podtrhují vysokou analytickou kvalitu a proveditelnost sekvenování nové generace v klinické a genetické diagnostice (Haas *et al.*, 2015).

Některé z mutantních genů spojených s autosomálně dominantní DCM kódují stejné kontraktilní sarkomerové proteiny, které jsou zodpovědné za vznik HCM, například srdeční  $\alpha$ -aktin,  $\alpha$ -tropomyosin, srdeční troponin T, I a C a další (Maron *et al.*, 2006).

Problémem v diagnostice a léčbě onemocnění zůstává neúplná exprese fenotypu v postižených rodinách, která má za následek maskování familiárního výskytu (Maron *et al.*, 2006).

Řada nefamiliárních DCM je studována z jiného úhlu pohledu. Podle některých studií se u řady pacientů, s například alkoholem navozenou DCM nebo těhotenskou DCM, předpokládá primárně genetické postižení, které se vlivem jiného spouštěcího faktoru (alkohol, porodní stres) plně klinicky projeví (Veselka *et al.*, 2009). U asymptomatických příbuzných pacientů jsou často pozorovány podobné změny v myokardu jako u DCM (Baig *et al.*, 1998).

**Tab. 3: Příčiny dilatační kardiomyopatie (Veselka *et al.*, 2009)**

| Dědičné příčiny                                                                                                                                                                                 | Nedědičné příčiny                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mutace sarkomerických proteinů <ul style="list-style-type: none"> <li>– infekční</li> <li>– toxická</li> <li>– autoimunitní</li> </ul>                                                          | Myokarditida<br>Kawasakiho nemoc<br>Eosinofilická nemoc (syndrom Churga-Straussově)                            |
| Mutace cytoskeletálních proteinů <ul style="list-style-type: none"> <li>– dystrofin</li> <li>– desmin</li> <li>– metavinkulin</li> <li>– sarkoglykanový komplex</li> <li>– epikardin</li> </ul> | Virová perzistence<br>Léky<br>Těhotenství<br>Endokrinní poruchy<br>Nutriční deficity<br>Alkohol<br>Tachykardie |
| Mutace proteinů jaderného obalu <ul style="list-style-type: none"> <li>– lamin A/C</li> <li>– emerin</li> </ul>                                                                                 |                                                                                                                |
| Kardiomyopatie s minimální dilatací<br>Mutace proteinů interkalačních disků<br>Mitochondriální cytopatie                                                                                        |                                                                                                                |

### 3.9. Restriktivní kardiomyopatie (RCM)

Restriktivní kardiomyopatie je vzácné onemocnění vyznačující se restriktivní poruchou komorového plnění bez současného zvětšení systolických nebo diastolických objemů komor a s normální tloušťkou srdeční stěny. Do tohoto typu kardiomyopatie je také zařazována srdeční amyloidóza, což je stav s jistou mírou hypertrofie srdeční stěny (Elliott *et al.*, 2008).

Přesná prevalence onemocnění není známa, ale jedná se o nejméně rozšířený typ kardiomyopatie (Elliott *et al.*, 2008). Základem diagnostiky je echokardiografie a dopplerovské vyšetření, které dokumentuje diastolickou poruchu komor.



Restriktivní kardiomyopatie může být idiopatická, familiární nebo může být vznik onemocnění zapříčiněn systémovým onemocněním, toxickým postižením nebo patologií endokardu (Elliott *et al.*, 2008). Familiární RCM je často charakterizována autosomálně dominantní dědičností. V asociaci s dědičnou formou RCM byly identifikovány mutace v genech pro sarkomerické proteiny, zejména troponin I, troponin T, esenciální lehký řetězec myozinu, těžký řetězec  $\beta$ -myozinu, myopalladin a titin (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006; Huby *et al.*, 2014). Do spojitosti s tímto onemocněním jsou také dávány protein intermediárních filament desmin a jemu příbuzné proteiny,  $\alpha$ -B-krystalin a pletin (Elliott *et al.*, 2008). Možné příčiny vzniku RCM jsou uvedeny v **Tab. 4**.

**Tab. 4: Příčiny restriktivní kardiomyopatie** (Veselka *et al.*, 2009)

| Dědičné příčiny                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Nedědičné příčiny                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mutace sarkomerických proteinů <ul style="list-style-type: none"> <li>– troponin I</li> <li>– esenciální lehký řetězec myozinu</li> <li>– těžký řetězec <math>\beta</math>-myozinu</li> <li>– myopalladin</li> </ul> Hereditární amyloidóza<br>Desminopatie<br>Pseudoxanthoma elasticum<br>Hemochromatóza<br>Fabryho nemoc<br>Onemocnění s hromaděním glykogenu | Amyloidóza<br>Sklerodermie<br>Endomyokardiální fibróza<br>Srdeční postižení karcinoidem<br>Metastatické postižení<br>Radiace<br>Chemoterapeutika (antracykliny) |

### 3.10. Arytmogenní kardiomyopatie (pravé komory) (ARVC)

U tohoto typu kardiomyopatie dochází k nahrazení myokardu pravé komory tukovou a fibrózní tkání a k následnému poškození funkce a dilataci pravé komory a zároveň ke vzniku elektrokardiografických abnormalit (Elliott *et al.*, 2008). V některých případech rovněž dochází i k postižení levé komory, které může u menší části z nich dokonce dominovat (Sen-Chowdhry *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu je označení arytmogenní kardiomyopatie pravé komory nepřesné a správnější termín pro označení nemoci je tedy spíše arytmogenní kardiomyopatie.

Projevy fenotypu a klinické projevy byly pozorovány nejčastěji již v adolescenci a mladé dospělosti, ale k fenotypovým projevům může docházet pravděpodobně i ve vyšším věku. Podle jedné ze studií byl medián stanovení diagnózy 29 let (Dalal *et al.*, 2005). Diagnostika je nejčastěji založena na magnetické rezonanci a počítačové tomografii, ale opírá

se také o změny na EKG, přítomnost arytmie, rodinnou anamnézu a v některých případech o výsledek myokardiální biopsie (Marcus *et al.*, 2010; Maron *et al.*, 2006).

Prevalence onemocnění je nízká a odhaduje se mezi 1:2000 a 1:5000 (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006). V některých oblastech je však výskyt endemicky vyšší. Například v Itálii je ARVC považována za nejčastější příčinu náhlé srdeční smrti u vrcholových sportovců (Maron *et al.*, 2006).

Familiární typ ARVC většinou vykazuje autosomálně dominantní dědičnost, i když často s neúplnou penetrací (Maron *et al.*, 2006), a je zapříčiněn mutacemi v genech pro desmosomální proteiny, zejména plakophilin 2, ale také desmoglein 2 a desmocollin 2. Jsou známy i varianty s autosomálně recesivním přenosem, jedná se o mutaci v genu pro plakoglobin, způsobující Naxos disease (syndrom charakteristický palmoplantární keratodermou speciálně u ARVC), a mutace v genu pro desmoplakin, která je spojena se vznikem Carvajalova syndromu (Pinamonti *et al.*, 2014). Uvedené mutace způsobují poškození struktury desmosomu, což vede až ke vzniku arytmií a poruchám kinetiky. Se vznikem ARVC jsou však asociovány také další genetické varianty, které byly identifikovány mimo oblast desmosomu. Jedná se o mutace genu kódujícího transformační růstový faktor 3, srdeční ryanodinový receptor a transmembránový protein 43 (Pinamonti *et al.*, 2014). V případě možné mutace v genu pro titin u ARVC se zvyšuje riziko srdečního selhání a náhlé srdeční smrti (Taylor *et al.*, 2011). Příčiny vzniku arytmogenní kardiomyopatie jsou shrnuty v **Tab. 5**.

**Tab. 5: Příčiny arytmogenní kardiomyopatie** (Veselka *et al.*, 2009)

| Dědičné příčiny                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Nedědičné příčiny |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Mutace proteinů interkalačních disků <ul style="list-style-type: none"> <li>– plakoglobin</li> <li>– desmoplakin</li> <li>– plakofilin 2</li> <li>– desmoglein 2</li> <li>– desmokolin 2</li> </ul> Mutace srdečního ryanodinového receptoru<br>Mutace transformačního růstového faktoru $\beta$<br>Mutace titinu | Zánět             |

### 3.11. Nonkompaktní kardiomyopatie (LVNC)

Podle ESC je nonkompaktní kardiomyopatie řazena mezi neklasifikované kardiomyopatie. Jedná se o vzácný stav s výraznou trabekularizací apikální části levé komory srdeční a ztenčenou kompaktní subepikardiální vrstvou myokardu způsobený poruchou

embryogeneze (Elliott *et al.*, 2008; Maron *et al.*, 2006). Obdobně jako ostatní kardiomyopatie může LVNC vést k srdečnímu selhání i náhlé srdeční smrti. LVNC se může nacházet jako izolovaný nález nebo je spojena s dalšími vrozenými srdečními vadami (Maron *et al.*, 2006).

Diagnostika je prováděna pomocí echokardiografie, angiografie a magnetické rezonance, kdy je zobrazována trabekularizovaná část levé komory. Léčba je založena na terapii srdečního selhání a na prevenci tromboembolických příhod a náhlé srdeční smrti (Arbustini *et al.*, 2014).

LVNC má částečně familiární výskyt a nejčastější způsob přenosu je autosomálně dominantní. V současné době jsou identifikovány mutace v genech některých sarkomerických proteinů, v genu pro lamin A/C, cypher/ZASP (strukturální protein Z disků sarkoméry) (Arbustini *et al.*, 2014; Klaassen *et al.*, 2008) nebo protein tafazzin, jehož mutace je vázaná na chromozóm X a u kojenců je příčinou vzniku Barthova syndromu s kombinací fenotypu DCM a LVNC (Jefferies, 2013). Příčiny dědičné nonkompaktní kardiomyopatie jsou zaznamenány v **Tab. 6**.

**Tab. 6: Příčiny nonkompaktní kardiomyopatie (Veselka *et al.*, 2009)**

| Dědičné příčiny                  |
|----------------------------------|
| Mutace sarkomerických proteinů   |
| – těžký řetězec $\beta$ -myozinu |
| – srdeční aktin                  |
| – troponin T                     |
| – cypher/ZASP                    |
| Mutace laminu A/C                |
| Mutace tafazzinu                 |
| Komplexní cyanotické vady srdce  |
| Neuromuskulární poruchy          |

#### 4. SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE

Sekvenování nové generace (Next-generation sequencing = NGS), jinak také masivně paralelní sekvenování (Massively Parallel Sequencing = MPS), je základní sekvenační metoda, která představuje nové možnosti v oblasti biomedicíny. Ještě donedávna byla nejpoužívanější technikou pro sekvenování Sangerova metoda, označovaná také dideoxy nebo enzymatická sekvenace, která byla poprvé popsána v roce 1977 (Sanger *et al.*, 1977). Nevýhodou této metody je její časová náročnost a relativně nízký počet současně analyzovaných vzorků (Ansorge, 2009).

Proto jsou v dnešní době stále více využívány právě technologie sekvenování nové generace, které umožňují rychlejší a levnější sekvenování DNA a RNA a tím i revoluci ve studiu genomiky a molekulární biologie. S použitím těchto nových metod sekvenování byl projekt sekvenování lidského genomu, který probíhal v letech 1990-2003, dokončen v řádu několika týdnů. Další výhodou těchto technik je stanovení sekvenačních dat z jednotlivých amplifikovaných fragmentů DNA bez nutnosti klonování těchto fragmentů. Limitujícím faktorem však zatím zůstává poměrně vysoká pořizovací cena přístroje (Ansorge, 2009), nicméně reálná cena za sekvenaci kompletního genomu se stále výrazně snižuje.

Technologie NGS může být použita pro sekvenování DNA izolované z jakéhokoli organismu. Poskytuje cenné informace představující odpovědi na téměř všechny biologické otázky (Illumina, 2016). Představuje užitečný nástroj pro celou řadu aplikací, např. sekvenování genomu *de novo*, celogenomové nebo cílené resekvenování pro objevování nových mutací a polymorfismů, analýza transkriptomu a DNA metylovaných oblastí nebo také mapování DNA-proteinových interakcí pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP-Seq). NGS umožnilo charakterizovat molekulární podstatu nejrozličnějších onemocnění (Koubková *et al.*, 2014) a nachází tak široké uplatnění v molekulární diagnostice dědičných chorob, infekčních onemocněních, prenatální diagnostice, farmakogenomice, v molekulární diagnostice nádorů i jejich prognóze (Guan *et al.*, 2012).

V současné době dominují sekvenačnímu průmyslu čtyři platformy sekvenátorů nové generace – platforma firmy Illumina, platformy Ion Torrent a SOLID firmy Life Technologies (Thermo Fisher) a platformy jedno-molekulového sekvenování společnosti Pacific Biosciences. Technologie pyrosekvenování 454 firmy Roche 454 je používána ale výběhová technologie (Markets and Markets, 2016). Všechny dostupné sekvenační platformy využívají rozdílnou chemii a odlišné přístupy k sekvenování, ale mají společné schéma postupu sekvenování, které zahrnuje přípravu sekvenační knihovny, sekvenování a detekce nukleotidů

a softwarovou analýzu získaných dat (Koubková *et al.*, 2014). Klonální amplifikace v rámci přípravy sekvenační knihovny může probíhat emulzní PCR nebo můstkovou PCR (bridge-PCR). Samotná sekvenace probíhá třemi nejčastějšími způsoby, sekvenováním syntézou, sekvenováním ligací nebo pyrosekvenováním.

#### 4.1. Platforma společnosti Illumina

Sekvenační technologie společnosti Illumina využívají klonální amplifikaci pomocí bridge-PCR a sekvenování syntézou (SBS), která umožní rychlé a přesné sekvenování. Detekce je umožněna pomocí reverzibilně modifikovaných fluorescenčně značených nukleotidů (Ansorge, 2009).

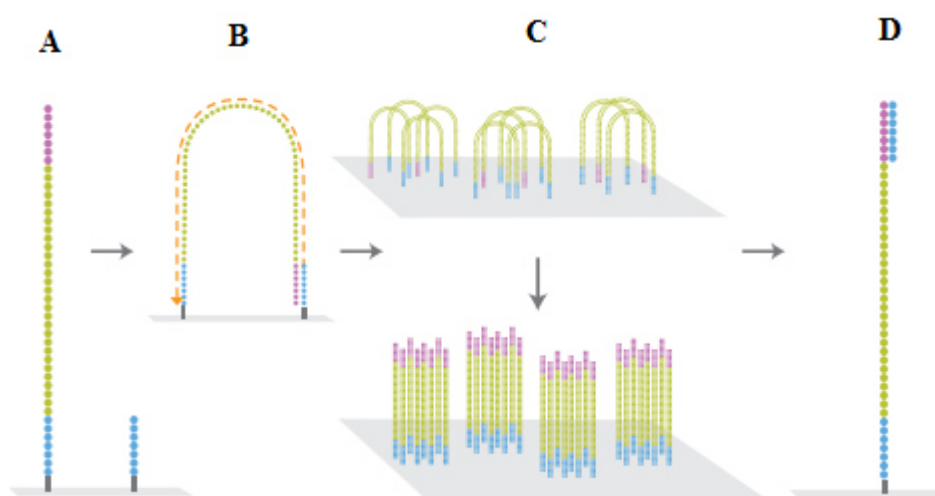
Díky vysoké výkonnosti, kapacitě a cenové hospodárnosti provozu sekvenátory Illumina v současnosti ovládají trh a využívají se k většině celogenomových i resekvenačních aplikací zahrnujících lidský genom i genomy modelových organismů (Shokralla *et al.*, 2012).

Na začátku přípravy DNA knihovny jsou ke koncům fragmentů DNA připojeny speciální adaptéry - oligonukleotidy. Po denuraci dvouvláknové DNA jsou fragmenty pomocí těchto adaptérů hybridizovány ke komplementárním adaptérům na povrchu reakční průtokové komůrky (flow cell) a každý fragment je tak jedním svým koncem připojen k povrchu komůrky. Přidáním PCR reagensů začne probíhat amplifikace fragmentů DNA, kdy adaptéry na povrchu komůrky slouží jako primery pro syntézu dsDNA, která je následně denaturována, a původní templát je odmyt. Nově nasyntetizované vlákno zůstává pevně spojeno s povrchem komůrky. Vlákno DNA se následně ohne a svým volným zakončením hybridizuje ke druhému typu adaptérů na povrchu komůrky, dojde tedy k tzv. přemostění (odtud označení můstková PCR). Pomocí DNA polymerázy je dosyntetizováno komplementární vlákno DNA a vzniká tzv. double-stranded bridge. Tato dvouvláknová DNA je denaturována a každé vlákno je připojeno k povrchu komůrky. Proces přemostění, syntézy komplementárního vlákna a následné denaturace se několikrát opakuje a výsledkem PCR amplifikace jsou náhodné shluky (klastry) vytvořené na povrchu komůrky, které čítají zhruba 1 000 identických kopií DNA fragmentů. Na povrchu komůrky se nacházejí vlákna reverse a forward a v posledním kroku amplifikace jsou reverzní řetězce odmyty. Forward vlákna připojená k povrchu průtokové komůrky jsou připravena k sekvenování (Ansorge, 2009; Koubková *et al.*, 2014; Illumina, 2016). Proces generování klastrů je znázorněn na **Obr. 4**.

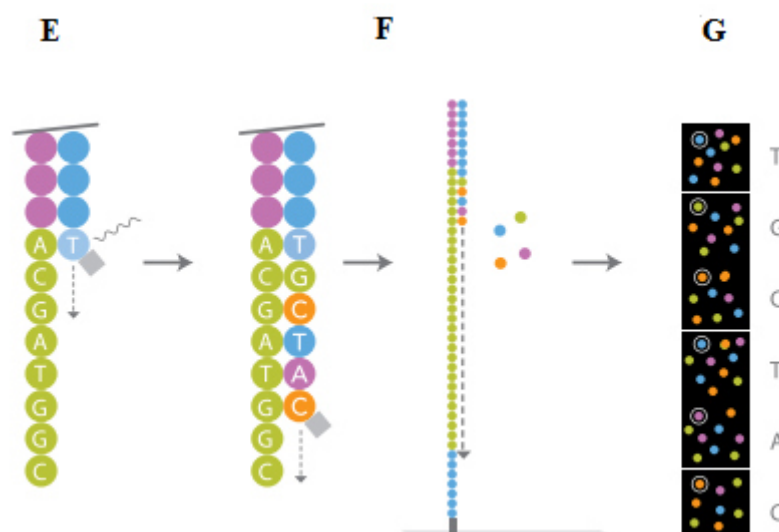
Reakční směs použitá pro sekvenační reakci a syntézu DNA obsahuje sekvenační primery, DNA polymerázu a nukleotidy, značené každý jiným fluorescenčním barvivem. Tyto nukleotidy mají deaktivovanou na 3' konci OH skupinu, a tím je zajištěno, že je v každém

cyklu inkorporován pouze jeden nukleotid. Podle templátu DNA připojeného ke komůrce je syntetizováno nové vlákno použitím těchto fluorescenčně značených nukleotidů. Po začlenění komplementární báze do vlákna DNA je pomocí detekce určitého fluorescenčního barviva identifikován CCD kamerou typ nukleotidu a jeho pozice na povrchu průtokové komůrky. Fluorescenční barvivo a terminační skupina na 3'-OH konci je poté z báze odstraněna a cyklus syntézy se opakuje (Ansorge, 2009; Koubková *et al.*, 2014; Illumina, 2016). Proces sekvenování syntézou je znázorněn na **Obr. 5**.

**Obr. 4: Proces generování klastrů:** Vlákno DNA je připojeno k pevnému povrchu komůrky (A), poté dochází k vytvoření můstků a bridge-PCR (B), tvorbě klastrů (C) a nakonec k navázání sekvenačního primeru (D) (Illumina, 2016; upraveno).



**Obr. 5: Postup čtení nukleotidů při sekvenování syntézou:** Sekvenační primer je prodloužen o jednu bázi, fluorescence je odečtena a přidaná báze odblokována (E). Následuje prodlužování řetězce opakováním předchozího kroku (F) a generování sekvence zpracováním fluorescenčního signálu (G) (Illumina, 2016; upraveno).



V současné době společnost Illumina nabízí 5 typů sekvenátorů podle výkonu a nároků jednotlivých pracovišť. Menším laboratorním provozům jsou poskytovány přístroje řady MiSeq a MiniSeq, které jsou vhodné pro cílené sekvenování jednotlivých genů, panelů více genů, exomové sekvenování, či resekvenování malých genomů. Pro velká vědecká pracoviště, zabývající se mimo jiné také sekvenováním genomů *de novo*, Illumina nabízí přístroje řady HiSeq, HiSeq X a NextSeq (Illumina, 2016).

## **4.2. Přístupy k sekvenování**

Prostřednictvím masivně paralelního sekvenování lze získat sekvence celých genomů v relativně krátké době. Ne vždy je však nutná identifikace celého genomu. S ohledem na to, co je cílem analýzy, jsou voleny různé přístupy k sekvenování. Technologiemi NGS je možné sekvenovat také cílené oblasti DNA, jako například oblasti exomu, transkriptomu nebo specifických genů (Illumina, 2016).

### **4.2.1. Celogenomové sekvenování**

Nejkomplexnější metodou analýzy genomu je celogenomové sekvenování. Hlavní výhodou je získání sekvence celé chromosomální DNA, včetně promotorových a regulačních oblastí, a tím i získání informace o úplném mutačním profilu daného genomu (Koubková *et al.*, 2014). I přesto, že je dnes cena sekvenování celého genomu mnohem nižší, je tento přístup k sekvenování pro svou časovou a finanční náročnost vhodný spíše pro malá výzkumná pracoviště, než k využití v klinické praxi. Získané informace o genomu jsou však důležitým prostředkem pro charakterizaci dědičných onemocnění, identifikaci nových a vzácně se vyskytujících mutací a sledování výskytu nemoci (Guan *et al.*, 2012). Schopnost sekvenátoru produkovat velké množství dat vytváří z celogenomového sekvenování významný nástroj výzkumu genomiky. Často je tento typ metody spojen se sekvenováním lidského genomu, avšak flexibilní charakter technologie NGS umožňuje rovněž praktické využití pro sekvenování všech druhů organismů, například zemědělsky důležitých zvířat, rostlin nebo mikroorganismů souvisejících s onemocněním (Illumina, 2016).

### **4.2.2. Exomové sekvenování**

Nejpoužívanějším způsobem cíleného sekvenování je exomové sekvenování, kdy jsou sekvenovány pouze kódující oblasti, tzv. exomy. Lidský exom představuje asi 1 % velikosti celého lidského genomu. Na druhou stranu však obsahuje až 85 % známých nukleotidových variant zapříčiňujících různá onemocnění. Představuje tak cenově efektivní alternativu

sekvenování celého genomu a nezanedbatelné je také vyšší pokrytí (coverage) sekvenovaných úseků (Koubková *et al.*, 2014; Illumina, 2016).

#### **4.2.3. Transkriptomové sekvenování**

Transkriptomová analýza je jedním z nejdůležitějších přístupů pro komplexní molekulární charakteristiku zejména nádorových onemocnění. Transkriptom je kompletní soubor všech molekul RNA (mRNA, rRNA, tRNA a další nekódující RNA molekuly) v buněčné populaci či konkrétní buňce. Sekvenování transkriptomu (RNA-seq) umožnilo zásadní převrat ve studiu transkriptomu a usnadnilo detekci mezigenových fúzí, somatických mutací a alternativních sestřihových variant. Díky RNA-seq je možné přesně a citlivě měřit genovou expresi bez omezení předchozích znalostí (Koubková *et al.*, 2014; Illumina, 2016).

#### **4.2.4. Cílené sekvenování (targeted sequencing)**

Cílené sekvenování (targeted sequencing) představuje inovativní metodu umožňující sekvenovat určité vybrané geny nebo vymezené oblasti genomu. Takovýto přístup k sekvenování výrazně šetří čas i peníze a vyžaduje méně prostoru pro skladování dat. Jedná se tak o velmi efektivní metodu pro zkoumání pouze zájmových oblastí. Cílené přístupy mohou také poskytovat vyšší úroveň pokrytí (coverage), čímž je umožněna identifikace vzácných variant s nízkou frekvencí v populaci (<5%), jejichž identifikace je příliš drahá při použití alternativních metod. Cílené sekvenování tak poskytuje cenově efektivní výsledky pro studium genů souvisejících s konkrétní chorobou či diagnózou (Koubková *et al.*, 2014; Illumina, 2016).

### **4.3. Formáty sekvenačních dat**

Technologiemi NGS je generováno obrovské množství sekvenačních dat a jejich správné zpracování a vyhodnocení je jednou z nejsložitějších částí postupu sekvenování. Jedním z běžně používaných formátů pro ukládání a sdílení sekvenačních dat je formát FASTQ (Cock *et al.*, 2009). Výsledkem porovnání sekvence v tomto formátu s referenční sekvencí jsou většinou soubory formátu SAM.

#### **4.3.1. Formát FASTQ**

V oblasti sekvenování se soubory formátu FASTQ ukázaly jako formáty pro výměnu dat mezi softwarovými nástroji, zejména pro svoji jednoduchost. Tento formát poskytuje jednoduché rozšíření formátu FASTA. Jedná se o textové soubory, které obsahují údaje o sekvenci a informace o kvalitě přečtení daných bází. Formát FASTQ není standardizován



a proto se můžeme setkat s několika běžně používanými variantami. Vyznačuje se standardní čtyřřádkovou strukturou. První řádek začíná symbolem '@' a obsahuje přesné informace o sekvenci, včetně použitého přístroje a umístění klastru na sekvenační komůrce. Druhý řádek obsahuje samotnou sekvenci ve formátu IUPAC nomenklatury, tedy sled písmen označujících jednotlivé báze. Znak jako jsou tabulátory nebo mezery nejsou v tomto zápisu povoleny. Třetí řádek je označen symbolem '+' a vytváří prostor pro další informace o sekvenci. Poslední řádek obsahuje informaci o kvalitě přečtení dané báze (Cock *et al.*, 2009).

#### **4.3.2. Soubor SAM/BAM**

Soubor formátu SAM (Sequence Alignment/Map format) je textový soubor pro ukládání sekvenčních dat v sérii sloupců oddělených tabulátory. Představuje obecný formát porovnání získané sekvence a sekvence referenční. Formát SAM se skládá z části záhlaví, které je volitelné a začíná symbolem '@', a části zarovnání (alignment). Každý řádek zarovnání má 11 povinných polí a variabilní počet volitelných polí, zahrnující další informace ze sekvenační platformy. V části zarovnání jsou obsaženy informace o tom, kde a jak byla každá sekvence přiřazena k referenčnímu genomu (Center for Statistical Genetics, 2015; Li *et al.*, 2009).

Binárním vyjádřením souboru SAM je soubor označovaný jako Binary Alignment/Map (BAM), který tedy obsahuje stejné informace ale v binárním komprimovaném formátu. Oba soubory zahrnují volitelnou část záhlaví následovanou částí zarovnání (Li *et al.*, 2009).

#### **4.3.3. Formát VCF**

Formát VCF (Variant Call Format) byl vytvořen v rámci projektu 1000 Genomes. Jedná se o textový soubor, který slouží k ukládání dat o polymorfismu DNA doplněných o další informace. Představuje soupis nalezených variant, tedy odchylek od referenční sekvence. Primárně byl tento formát vytvořen pro prezentování nalezených lidských genetických variant, ale jeho použití není omezeno a může být využito v různých souvislostech. Formát VCF je rozdělen do dvou částí. První část představuje hlavičku, která obsahuje informaci o verzi VCF, definované filtry a další technické údaje. V druhé části se nachází samotný výpis nalezených variant s přesnými informacemi o poloze v genomu. Může také obsahovat informace o genotypu vzorků pro každou pozici (Danecek *et al.*, 2011).

## **5. MATERIÁL A METODIKA**

### **5.1. Materiál**

#### **5.1.1. Biologický materiál**

Jako biologický materiál byly použity vzorky periferní krve 11 pacientů s dilatační kardiomyopatií, které byly poskytnuty pro výzkumné účely v rámci spolupráce s I. interní klinikou Fakultní nemocnice Olomouc. V rámci práce byly všechny vzorky anonymizované. Všichni pacienti podepsali písemný souhlas s experimentálním zpracováním vzorků jejich DNA.

#### **5.1.2. Použité kity a chemikálie**

101 MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience)

DNA 1000 Analysis Kit (Agilent Technologies)

High Sensitivity DNA Analysis Kit (Agilent Technologies)

MiSeq Reagent Kit v2 – 300 cyklů (Illumina)

TruSight Rapid Capture Kit – 96 samples (Illumina)

Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

10mM roztok Tris-Cl, pH 8,5

80% etanol

deionizovaná voda

#### **5.1.3. Přístrojové vybavení**

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

C1000 Thermal Cycler (Biorad)

Centrifuge 5430 (Eppendorf)

Centrifuge Z383K (Hermle)

Centrifuge/vortex Combi-Spin (BioSan)

Chip Priming Station (Agilent Technologies)

Ika MS3 S36 Basic Chip Vortex (IKA)

MagCore HF16 (RBC Bioscience)

Minicentrifuge Minispin (Eppendorf)

Mini-Vortex Lab Dancer (IKA)

MiSeq (Illumina)

Plate Shaker-Thermostat PST-100HL (BioSan)

ThermoMixer® C (Eppendorf)

TProfessional Standard PCR Thermocycler (Biometra)

Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)

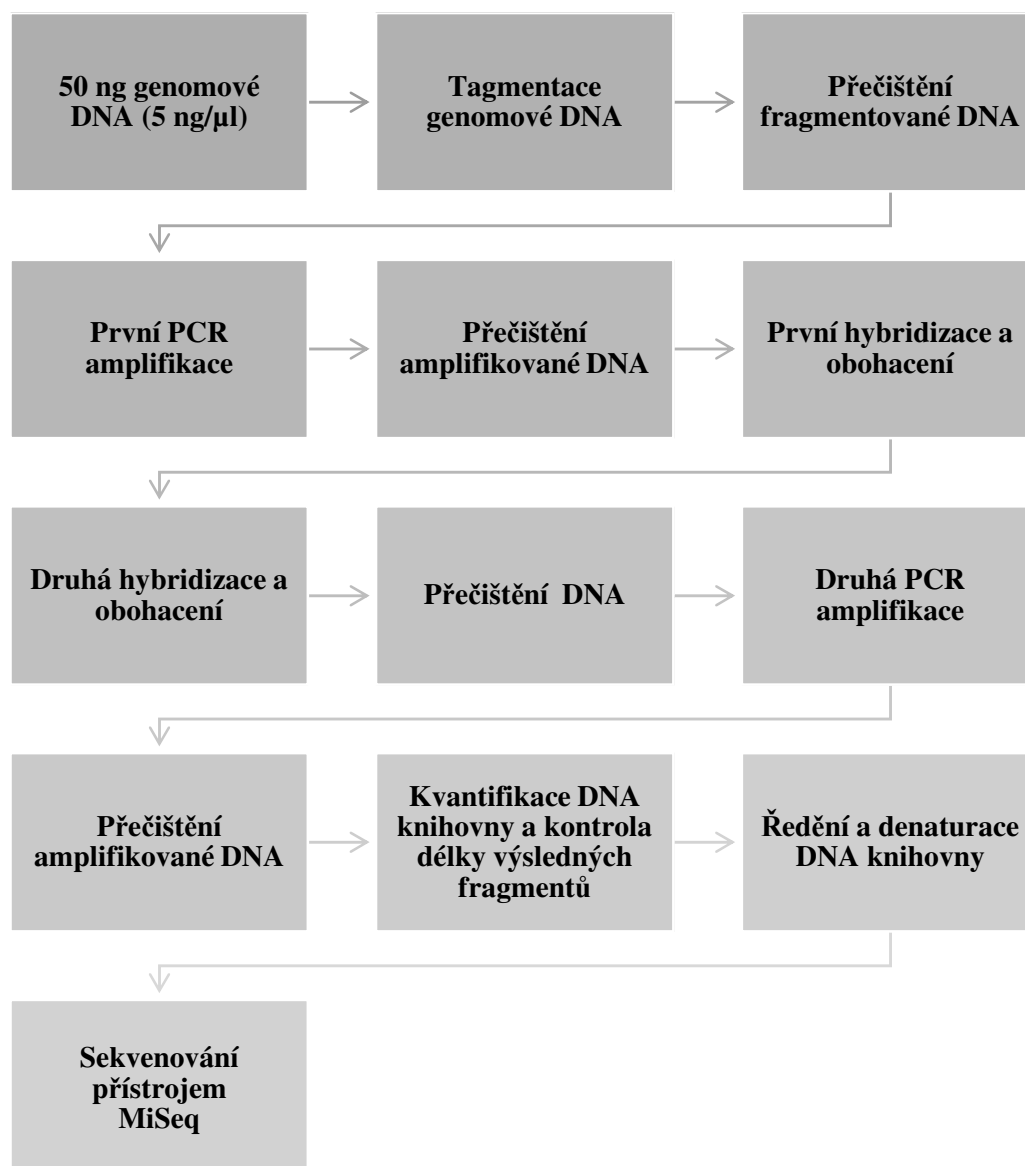
Vacufuge 5301 Vacuum Centrifuge Concentrator (Eppendorf)

Vortex Mixer VX-20 (Labnet)

## 5.2. Metodika

Všechny popsané metody praktické části této práce byly realizovány na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci. Příprava DNA knihovny byla provedena podle protokolu dodávaného s kitem TruSight Rapid Capture (viz **Obr. 6**). Pomocí kitu TruSight Cardiomyopathy bylo u každého vzorku sekvenováno 46 genů (viz **Tab. 7**).

**Obr. 6: Pracovní postup TruSight Rapid Capture**



**Tab. 7: Geny vyšetřované kitem TruSight Cardiomyopathy (Illumina)**

| <b>Zkratka genu</b> | <b>Název kódujícího proteinu (v angličtině)</b>               |
|---------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>ABCC9</i>        | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9       |
| <i>ACTC1</i>        | actin, alpha, cardiac muscle 1                                |
| <i>ACTN2</i>        | actinin, alpha 2                                              |
| <i>ANKRD1</i>       | ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)                      |
| <i>CASQ2</i>        | calsequestrin 2 (cardiac muscle)                              |
| <i>CAV3</i>         | caveolin 3                                                    |
| <i>CRYAB</i>        | crystallin, alpha B                                           |
| <i>CSRP3</i>        | cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)     |
| <i>CTF1</i>         | cardiotrophin 1                                               |
| <i>DES</i>          | desmin                                                        |
| <i>DSC2</i>         | desmocollin 2                                                 |
| <i>DSG2</i>         | desmoglein 2                                                  |
| <i>DSP</i>          | desmoplakin                                                   |
| <i>DTNA</i>         | dystrobrevin, alpha                                           |
| <i>EMD</i>          | emerin                                                        |
| <i>FHL2</i>         | four and a half LIM domains 2                                 |
| <i>GLA</i>          | galactosidase, alpha                                          |
| <i>JUP</i>          | junction plakoglobin                                          |
| <i>LAMA4</i>        | laminin, alpha 4                                              |
| <i>LAMP2</i>        | lysosomal-associated membrane protein 2                       |
| <i>LDB3</i>         | LIM domain binding 3                                          |
| <i>LMNA</i>         | lamin A/C                                                     |
| <i>MYBPC3</i>       | myosin binding protein C, cardiac                             |
| <i>MYH6</i>         | myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha                  |
| <i>MYH7</i>         | myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta                   |
| <i>MYL2</i>         | myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow              |
| <i>MYL3</i>         | myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow    |
| <i>MYLK2</i>        | myosin light chain kinase 2                                   |
| <i>MYOZ2</i>        | myozenin 2                                                    |
| <i>NEXN</i>         | nexilin (F actin binding protein)                             |
| <i>PKP2</i>         | plakophilin 2                                                 |
| <i>PLN</i>          | phospholamban                                                 |
| <i>PRKAG2</i>       | protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit  |
| <i>RBM20</i>        | RNA binding motif protein 20                                  |
| <i>RYR2</i>         | ryanodine receptor 2 (cardiac)                                |
| <i>SGCD</i>         | sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein) |
| <i>TAZ</i>          | tafazzin                                                      |
| <i>TCAP</i>         | titin-cap                                                     |
| <i>TMEM43</i>       | transmembrane protein 43                                      |
| <i>TNNC1</i>        | troponin C type 1 (slow)                                      |
| <i>TNNI3</i>        | troponin I type 3 (cardiac)                                   |
| <i>TNNT2</i>        | troponin T type 2 (cardiac)                                   |
| <i>TPM1</i>         | tropomyosin 1 (alpha)                                         |
| <i>TTN</i>          | titin                                                         |
| <i>TTR</i>          | transthyretin                                                 |
| <i>VCL</i>          | vinculin                                                      |

### **5.2.1. Izolace a příprava DNA**

#### Izolace DNA

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

#### Ředění DNA

Po izolaci byla genomová DNA postupně ředěna na 10 ng/μl a 5 ng/μl. K ředění byl použit 10mM roztok Tris-Cl o pH 8,5. Změření koncentrace 10 ng/μl bylo provedeno fluorometrickým měřením na přístroji Qubit 2.0 (Invitrogen) s použitím Qubit® dsDNA HS Assay kitu. Na základě tohoto měření byla DNA naředěna na finální koncentraci 5 ng/μl potřebná pro tagmentaci DNA.

#### Měření DNA na přístroji Qubit 2.0

Přístroj Qubit 2.0 (Invitrogen) slouží ke kvantifikaci DNA, RNA a proteinů. Jedná se o citlivé měření založené na fluorometrii. Přístroj znemožňuje interferenci s jinými složkami v roztoku, a proto je na rozdíl od jiných kvantifikačních přístrojů velmi specifický. Pro měření DNA přístrojem Qubit lze použít dva různé kity umožňující kvantifikační měření v různých koncentračních rozpětích. Qubit® dsDNA BR Assay Kit umožňuje měření DNA v koncentračním rozmezí 100 pg/μl až 1 000 ng/μl a Qubit® dsDNA HS Assay Kit dovoluje měření v koncentracích 10 pg/μl až 100 ng/μl. Výstupní naměřenou hodnotu lze pomocí přístroje automaticky převést na požadované jednotky.

Před samotným měřením je nutné pro každý vzorek připravit 200 μl pracovního roztoku Qubit Working Solution (QWS), který vzniká smísením 199 μl Qubit Buffer (QB) a 1 μl HS/BR Qubit Reagent (QR). K fluorescenčnímu měření jsou použity speciální jednorázové zkumavky. Do těchto zkumavek je QWS napipetován spolu se vzorkem DNA, tak aby celkové množství směsi tvořilo 200 μl, přičemž objem měřené DNA lze zvolit v rozmezí 1-20 μl. V rámci mé práce byl měřen 1 μl vzorku DNA, který byl smísen se 199 μl QWS.

### 5.2.2. Příprava DNA knihovny

#### Tagmentace genomové DNA

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

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

#### Přečištění tagmentované DNA

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

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

z magnetického stojánu a do každé jamky bylo přidáno 22,5  $\mu$ l elučního roztoku Resuspension Buffer. Deska byla přelepena ochrannou fólií, umístěna 1 minutu na třepače při 1 800 rpm pro důkladné promíchání roztoku a inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Potom byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a na 2 minuty umístěna na magnetický stojánek. Nakonec bylo odebráno z každé jamky 20  $\mu$ l supernatantu a přeneseno do odpovídajících jamek v nové desce. Velikost získaných přečištěných fragmentů DNA byla zkontrolována pomocí čipové elektroforézy v přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) s použitím High Sensitivity DNA čipu.

#### Měření DNA na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer

Přístroj 2100 Bioanalyzer společnosti Agilent Technologies umožňuje provedení elektroforézy na čipu. DNA lze měřit dvěma typy čipů - čip s označením DNA HS (High Sensitivity) pro měření 11 DNA vzorků o koncentraci 5-500 pg/ $\mu$ l a délce 50-7 000 bp nebo čip s označením DNA 1000 pro měření 12 DNA vzorků o koncentraci 0,1-50 ng/ $\mu$ l a délce 25-1 000 bp. Chemikálie používané při měření jsou uchovávány v lednici při teplotě 4-8 °C a 30 minut před použitím byly vyjmuty z lednice a vytemperovány na pokojovou teplotu.

Před analýzou je nutné připravit Gel-Dye Mix, který je složen z gel matrix (gel) a DNA dye concentrate (barva). Obě zkumavky s chemikáliemi byly protřepány na vortexu a krátce centrifugovány. Do zkumavky s gelem bylo napipetováno 25  $\mu$ l barvy. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a přenesen na zkumavku s filtrem (součást kitu). Centrifugací při 2 240 g po dobu 15 minut byl obsah zkumavky přefiltrován a Gel-Dye Mix byl připraven k použití.

V postupu byl použit čip High Sensitivity DNA, který je určen pro měření 11 vzorků DNA. Čip byl vložen do pipetovacího nástavce a píst stříkačky byl nastaven na objem 1 ml. Do jamky označené **G** bylo napipetováno 9  $\mu$ l připravené směsi Gel-Dye Mix. Nástavec byl uzavřen tak, aby stříkačka navazovala na jamku s napipetovaným gelem. Píst stříkačky byl stlačen směrem dolů tak, aby byl secvaknut svorkou. Tento krok slouží k vměštění gelu do kapilár v čipu. Po uplynutí 1 minuty byl píst ze svorky uvolněn. Pro správnou aplikaci bylo nutné, aby se píst samovolně vrátil alespoň do poloviny stupnice injektoru (asi 0,5 ml) a 5 sekund po uvolnění byl píst manuálně vrácen na hodnotu 1 ml, poté byl pipetovací nástavec otevřen. Gel byl napipetován do dalších 3 jamek označených G. Do ostatních prázdných jamek bylo napipetováno 5  $\mu$ l markeru a do jamky se symbolem žebříku 1  $\mu$ l ladderu. Do jamek očíslovaných od 1 do 11 byl napipetován vždy 1  $\mu$ l vzorku DNA. Poté byl

čip vložen do třepačky a vortexován při 2 400 rpm po dobu 1 minuty. Nakonec byl čip vložen do analyzátoru a byla spuštěna analýza.

#### První PCR amplifikace

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

Do každé zkumavky s přečištěnou DNA bylo přidáno 5  $\mu$ l indexu i7 (N701-706) a 5  $\mu$ l indexu i5 (E501-502) (viz **Tab. 8**). Poté bylo do každé zkumavky napipetováno 20  $\mu$ l Nextera Library Amplification Mix. Zkumavky byly uzavřeny, protřepány při 1 200 rpm po dobu 1 minuty a poté byly centrifugovány 1 minutu při 280 g. Následně byly vloženy do připraveného termocykleru a byl spuštěn PCR program, jehož podmínky jsou uvedeny v **Tab. 9**.

**Tab. 8: Indexy i5 a i7 v jednotlivých vzorcích:** vzorek č. 12 představuje technický replikát vzorku č. 9

|          |      | Index i7 |          |          |           |           |           |
|----------|------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
|          |      | N701     | N702     | N703     | N704      | N705      | N706      |
| Index i5 | E501 | Vzorek 1 | Vzorek 2 | Vzorek 3 | Vzorek 4  | Vzorek 5  | Vzorek 6  |
|          | E502 | Vzorek 7 | Vzorek 8 | Vzorek 9 | Vzorek 10 | Vzorek 11 | Vzorek 12 |

**Tab. 9: Podmínky první PCR amplifikace fragmentované DNA**

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

#### První přečištění amplifikované DNA

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



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

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

### První hybridizace

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

Před samotnou hybridizací bylo však nutno vzorky smísit tak, aby bylo k hybridizaci použito stejné množství DNA od každého vzorku – provést tzv. poolování vzorků. Z každého vzorku byl odebrán objem odpovídající 500 ng DNA. Celkový obsah poolu tak byl 6 000 ng DNA. Pro hybridizační reakci bylo potřeba zajistit, aby celkový objem poolu činil 40 µl, a v případě získání většího objemu poolu byl objem snížen pomocí centrifugačního zakoncentrování s použitím přístroje Vacufuge 5301 Vacuum Centrifuge Concentrator (Eppendorf). V případě, že by byl objem poolu menší než 40 µl, byl by objem doplněn na tuto hodnotu pomocí Resuspension Buffer.

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

**Tab. 10: Podmínky první hybridizace**

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

### První obohacení (enrichment)

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

Po vyjmutí z termocykleru byla deska s poolem centrifugována 1 minutu při 280 g. Objem byl přepipetován do nové jamky a k němu bylo přidáno 250 µl dobře rozmíchaných streptavidinových magnetických kuliček (Streptavidin Magnetic Beads). Směs byla protřepána 5 minut při 1 200 rpm a inkubována 25 minut při pokojové teplotě. Poté byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g. Následně byla deska umístěna na magnetický stojánek po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Po usazení vzorku ke stěně byl všechen supernatant opatrně odebrán. Deska byla odebrána z magnetického stojánku a do jamky bylo přidáno 200 µl Enrichment Wash Solution. Směs byla poté protřepána 4 minuty při 1 800 rpm a pipetou jemně a důkladně promíchána. Následně byla deska inkubována 30 minut při 50 °C v inkubátoru. Po inkubaci byla deska ihned umístěna na magnetických stojánek po dobu 2 minut a veškerý supernatant byl odsán. Postup promývání s 200 µl Enrichment Wash Solution byl jednou opakován a po odsátí supernatantu bylo ke směsi přidáno 23 µl eluční směsi, která byla připravena pro jeden vzorek v nadbytku z 28,5 µl Enrichment Elution Buffer 1 a 1,5 µl 2N NaOH. Směs byla protřepána 2 minuty při 1 800 rpm a poté inkubována 2 minuty při pokojové teplotě. Následně byla deska centrifugována 1 minutu při 280 g a umístěna na magnetický stojánek po dobu 2 minut. Potom bylo 21 µl vzorku přeneseno do nové jamky a byly přidány 4 µl Elute Target Buffer 2 pro neutralizaci eluce. Směs byla protřepána 1 minutu při 1 200 rpm a deska centrifugována 1 minutu při 280 g.

### Druhá hybridizace

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

K přečištěnému vzorku bylo přidáno 15 µl Resuspension Buffer, 50 µl Enrichment Hybridization Buffer a 10 µl TruSight Content Set (CSO), směs byla promíchána na třepačce po dobu 1 minuty při 1 200 rpm a deska centrifugována 1 minutu při 280 g. Poté byla deska opět vložena do termocykleru s nastaveným hybridizačním programem (viz **Tab. 11**).

**Tab. 11: Podmínky druhé hybridizace**

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

#### Druhé obohacení (enrichment)

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

#### Přečištění obohacené DNA

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

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

#### Druhá PCR amplifikace

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

Do zkušavky s 25 µl DNA knihovny bylo přidáno 5 µl směsi primerů PCR Primer Cocktail a 20 µl reakční směsi Nextera Enrichment Amplification Mix. Směs byla protřepána 1 minutu při 1 200 rpm a zkušavka byla centrifugována 1 minutu při 280 g. Poté byla zkušavka vložena do termocykleru s nastaveným PCR programem, jehož podmínky jsou uvedeny v **Tab. 12**.

**Tab. 12: Podmínky druhé PCR amplifikace DNA**

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

Druhé přečištění amplifikované DNA

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

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

Kvantifikace, ředění a denaturace finální DNA knihovny

Před samotnou denaturací byla DNA kvantifikována pomocí přístroje 2100 Bioanalyzér (Agilent Technologies) s použitím Agilent High Sensitivity čipu a fluorometru Qubit (Invitrogen). DNA byla poté ředěna na požadovanou koncentraci a k 15 µl zředěné DNA bylo přidáno 15 µl zředěného NaOH, který byl připraven smícháním 10 µl NaOH a 240 µl H<sub>2</sub>O. Ze směsi DNA-NaOH bylo odejmuto 10 µl a smícháno s 990 µl Hyb Buffer (HT1). Z této směsi bylo odebráno 600 µl a napipetováno do sekvenační kazety (cartridge).

### 5.2.3. Sekvenace na přístroji MiSeq

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

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

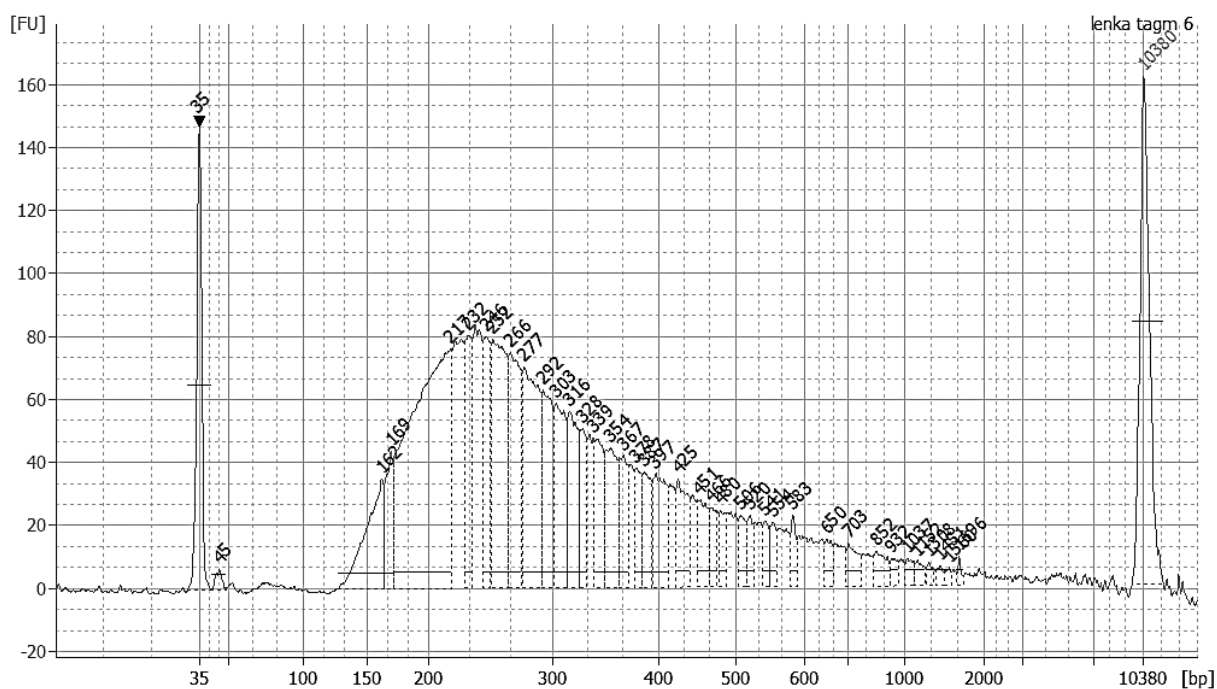
Nedílnou součástí přístroje MiSeq je program MiSeq Reporter, který po skončení analýzy vygeneroval datové soubory FASTQ, BAM a VCF. Datové soubory VCF byly zpracovány v programu Variant Studio verze 2.2.3. a informace o závažnosti jednotlivých nalezených variant byly vyhodnoceny na základě údajů z databáze ClinVar a odborných literárních zdrojů.

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1. Dílčí výsledky přípravy DNA knihovny

Poskytnutá DNA byla izolována a dostatečně fragmentována v procesu tagmentace DNA a délka fragmentů DNA odpovídala předpokládané délce 150 bp-1 kb (viz **Obr. 7**). Poté byla DNA úspěšně amplifikována PCR reakcí. Před následující hybridizací bylo provedeno tzv. poolování vzorků. K hybridizaci bylo nutné použít stejné množství DNA od každého vzorku a vzhledem k tomu, že bylo k experimentu použito 12 vzorků, byl vytvořen pouze jeden pool. Každého vzorku bylo použito takové množství, aby odpovídalo 500 ng DNA (viz **Tab. 13**). Smísením vzorků byl získán objem 90  $\mu$ l, a protože bylo nutné k hybridizaci použít pouze 40  $\mu$ l, byl objem poolu snížen pomocí centrifugačního zakoncentrování přístrojem Vacufuge 5301 Vacuum Centrifuge Concentrator (Eppendorf).

**Obr. 7: Příklad elektroferogramu provedené elektroforézy pro kontrolu fragmentace DNA:** osa x – velikosti fragmentů DNA v bp; osa y – počet daných fragmentů



**Tab. 13: Poolování 12 vzorků před první hybridizací**

| Číslo vzorku | Koncentrace DNA (ng/μl) | Objem vzorku obsahující 500 ng DNA (μl) | Objem poolu (μl) | Objem, který je potřeba odpařit (μl) |
|--------------|-------------------------|-----------------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| 1.           | 82,6                    | 6,05                                    | <b>90,09</b>     | <b>50,09</b>                         |
| 2.           | 72,8                    | 6,87                                    |                  |                                      |
| 3.           | 85,6                    | 5,84                                    |                  |                                      |
| 4.           | 69,8                    | 7,16                                    |                  |                                      |
| 5.           | 74,6                    | 6,70                                    |                  |                                      |
| 6.           | 59,8                    | 8,36                                    |                  |                                      |
| 7.           | 68,0                    | 7,35                                    |                  |                                      |
| 8.           | 43,6                    | 11,47                                   |                  |                                      |
| 9.           | 59,0                    | 8,47                                    |                  |                                      |
| 10.          | 66,2                    | 7,55                                    |                  |                                      |
| 11.          | 68,2                    | 7,33                                    |                  |                                      |
| 12.          | 72,0                    | 6,94                                    |                  |                                      |

Po úspěšně provedeném obohacení (enrichment), další hybridizaci a následné PCR amplifikaci byla připravená DNA knihovna kvantifikována a dále ředěna a denaturována. S použitím následujícího vzorce byla získána koncentrace DNA v nmol/μl.

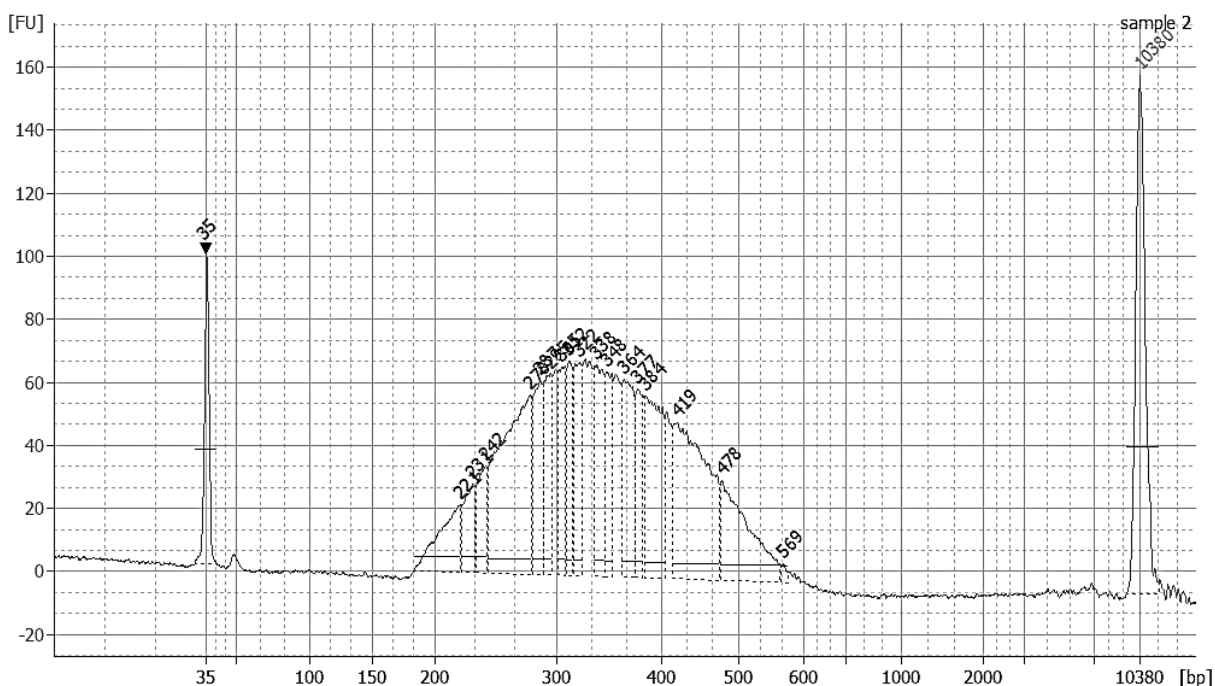
$$\frac{(\text{koncentrace DNA v ng/}\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \cdot \text{průměrná délka DNA})} \cdot 10^6 = \text{kocentrace v nmol/}\mu\text{l}$$

Koncentrace připravené DNA knihovny byla 1,3 ng/μl a průměrná délka fragmentů činila cca 350 bp (viz **Obr. 8**). Tedy:

$$\frac{1,3 \text{ ng/}\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} \cdot 350)} \cdot 10^6 = 5,628 \text{ nmol/}\mu\text{l}$$

Požadovaná koncentrace pro postup sekvenování byla 1,7 nmol/μl. DNA tedy byla ředěna 3,3x, smísením 10 μl DNA a 23 μl H<sub>2</sub>O. Takto ředěná DNA knihovna byla následně denaturována pomocí NaOH a připravena k samotnému postupu sekvenování na platformě Illumina.

**Obr. 8: Elektroforetogram provedené elektroforézy pro kvantifikaci DNA:**  
osa x – velikosti fragmentů DNA v bp; osa y – počet daných fragmentů



## 6.2. Výsledky analýzy DNA

Kitem TruSight Cardiomyopathy bylo u každého vzorku vyšetřeno 46 genů v odpovídající délce 245 kb. Výstupem ze sekvenátoru, se kterým bylo dále pracováno, byly sekvence zapsané ve formátu VCF. Tyto VCF datové soubory byly vloženy do programu Variant Studio verze 2.2.3 a dále analyzovány a filtrovány. Sekvenovaná data byla filtrována podle kvality a byly odfiltrovány alely, jejichž zastoupení v populaci je  $>5\%$  a také konkrétně v evropské populaci  $>5\%$ . Dále byly odfiltrovány varianty s detekovanou frekvencí varianty  $<20\%$ . S užitím dalšího filtru, zaměřeného na případnou patogenitu mutace, byly zobrazeny pouze sestřihové varianty, mutace nesmyslné, posunové mutace (frameshift), ztráty terminačních kodonů, mutace mající smysl (missense), změny iniciačních kodonů a inserce a delece.

Celkem bylo nalezeno 1 286 jednonukleotidových variant a 50 indel variant. Průměrně bylo u každého pacienta zjištěno 117 jednonukleotidových variant a 8 indel variant. Počet nalezených jednonukleotidových záměn a indel variant u jednotlivých pacientů je zaznamenán v **Tab. 14**.

Pomocí filtrování bylo vytipováno 28 mutací v 9 genech: *DSC2*, *DSP*, *JUP*, *LAMA4*, *MYBPC3*, *MYLK2*, *PKP2*, *TMEM43* a *TTN*. Nejčastěji se nacházely mutace v genu *TTN*. Četnost mutací v jednotlivých genech je zaznamenána v **Tab. 15**. V naprosté většině případů



se jednalo o missense varianty, kterých bylo nalezeno 25. Dále byla detekována 1 frameshift varianta, 1 varianta sestřihová a 1 varianta nesmyslná. Z celkového počtu nalezených jednonukleotidových variant byly 4 varianty označeny jako potenciálně škodlivé, 10 variant bylo pravděpodobně benigních a u 14 variant byla jejich závažnost neznámá (viz **Tab. 16**).

**Tab. 14: Počet nalezených jednonukleotidových a indel variant ve vzorcích:** jednotlivé nukleotidové varianty - single nucleotide variant (SNV), databáze jednonukleotidového polymorfismu - single nucleotide polymorphism database (dbSNP)

| Vzorek | Počet SNV | Procentuální zastoupení SNV nalezených v dbSNP | Počet indel variant |
|--------|-----------|------------------------------------------------|---------------------|
| 1      | 99        | 92.9 %                                         | 4                   |
| 2      | 134       | 99.3 %                                         | 5                   |
| 3      | 151       | 98.7 %                                         | 5                   |
| 4      | 94        | 100.0 %                                        | 6                   |
| 5      | 106       | 98.1 %                                         | 6                   |
| 6      | 110       | 95.5 %                                         | 3                   |
| 7      | 126       | 98.4 %                                         | 5                   |
| 8      | 127       | 98.4 %                                         | 5                   |
| 9      | 100       | 96.0 %                                         | 3                   |
| 10     | 132       | 94.7 %                                         | 5                   |
| 11     | 107       | 98.1 %                                         | 3                   |

**Tab. 15: Četnost nalezených mutací v jednotlivých genech**

| Gen           | Počet mutací | Procentuální zastoupení mutací v genu z celkového počtu mutací |
|---------------|--------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>DSC2</i>   | 1            | 3,6 %                                                          |
| <i>DSP</i>    | 5            | 17,9 %                                                         |
| <i>JUP</i>    | 1            | 3,6 %                                                          |
| <i>LAMA4</i>  | 2            | 7,1 %                                                          |
| <i>MYBPC3</i> | 1            | 3,6 %                                                          |
| <i>MYLK2</i>  | 2            | 7,1 %                                                          |
| <i>PKP2</i>   | 2            | 7,1 %                                                          |
| <i>TMEM43</i> | 1            | 3,6 %                                                          |
| <i>TTN</i>    | 13           | 46, 4 %                                                        |

**Tab. 16: Nalezené varianty u jednotlivých pacientů a jejich závažnost:** mutace mající smysl (missense), posunové mutace (frameshift), nesmyslná mutace (stop-gained)

| Pacient | Mutovaný gen                      | Nalezená mutace               | Typ varianty  | Závažnost                                  |
|---------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------------------|
| 1       | TMEM43                            | NP_077310.1:p.Arg312Trp       | missense      | Předpokládáně patogenní                    |
| 2       | PKP2                              | NP_004563.2:p.Ser70Ile        | missense      | Neznámá                                    |
|         | DSC2                              | NP_077740.1:p.Ala897LysfsTer4 | frameshift    | Předpokládáně benigní                      |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Arg3120Gln   | missense      | Neznámá                                    |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.His10092Tyr  | missense      | Neznámá                                    |
|         | MYBPC3                            | NP_000247.2:p.Val189Ile       | missense      | Předpokládáně benigní                      |
| 3       | TTN                               | NP_001254479.1:p.Arg3367Gln   | missense      | Neznámá                                    |
|         | DSP                               | NP_004406.2:p.Glu1833Val      | missense      | Předpokládáně benigní                      |
| 4       | Nalezeny pouze intronové varianty |                               |               |                                            |
| 5       | DSP                               | NP_004406.2:p.Glu1833Val      | missense      | Předpokládáně benigní                      |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Arg14567Thr  | missense      | Neznámá                                    |
| 6       | JUP                               | NP_002221.1:p.Asn425Asp       | missense      | Předpokládáně patogenní, nejasného významu |
|         | PKP2                              | NP_004563.2:p.Ala372Pro       | missense      | Předpokládáně benigní, nejasného významu   |
| 7       | Nalezeny pouze intronové varianty |                               |               |                                            |
| 8       | DSP                               | NP_004406.2:p.Ile305Phe       | missense      | Předpokládáně benigní                      |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Arg3193Ter   | stop-gained   | Předpokládáně patogenní                    |
| 9       | MYLK2                             | NP_149109.1:p.Pro144Ala       | missense      | Nejasného významu, možná patogenita        |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Thr4957Ser   | missense      | Nejasného významu                          |
|         | TTN                               | NM_001267550.1:c.18870A>G     | splice region | Předpokládáně patogenní                    |
| 10      | LAMA4                             | NP_001098676.2:p.Arg545Cys    | missense      | Neznámá                                    |
|         | DSP                               | NP_004406.2:p.Ile305Phe       | missense      | Benigní                                    |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Glu2774Asp   | missense      | Neznámá                                    |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Ala6954Val   | missense      | Benigní                                    |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Arg10130His  | missense      | Neznámá                                    |
| 11      | MYLK2                             | NP_149109.1:p.Asn278Lys       | missense      | Neznámá                                    |
|         | LAMA4                             | NP_001098676.2:p.Arg545Cys    | missense      | Neznámá                                    |
|         | DSP                               | NP_004406.2:p.Ile305Phe       | missense      | Předpokládáně benigní                      |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Asp7596His   | missense      | Předpokládáně benigní                      |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Ser7726Leu   | missense      | Neznámá                                    |
|         | TTN                               | NP_001254479.1:p.Asp15110Asn  | missense      | Neznámá                                    |

### 6.3. Kvalita sekvenačních dat

Celková délka sekvence cílové oblasti byla 244 995 bp. Výtěžek sekvenačního běhu činil 4,01 Gbp. Celkem proběhlo během sekvenování 13 442 908 čtení, z nichž 12 756 467 prošlo vnitřním filtrem kvality sekvenování. Hustota činila  $694 \pm 48$  tisíc klastrů/mm<sup>2</sup>, z nichž  $94,86 \pm 0,64$  % prošlo vnitřním filtrem kvality. Průměrná délka sekvenovaných fragmentů

byla 200 bp. Průměrná délka sekvenovaných fragmentů jednotlivých vzorků je zaznamenána v **Tab. 17**. Pokrytí sekvenování odpovídá celkovým sekvenačním výstupním datům vydělených velikostí DNA, která je sekvenována. Počet nukleotidů ze čtení, které byly mapovány do dané pozice, je uveden v **Tab. 18**. Další vlastnost sekvenování, rozdělení jednotlivých čtení mezi vzorky, je zaznamenána v **Tab. 19**. Z uvedených hodnot vyplývá, že vzorek č. 8 vykazoval nižší objem sekvenování, počet čtení a pokrytí sekvenování tohoto vzorku je však dostačující. Optimalizací by bylo zvýšení koncentrace sekvenované DNA.

**Tab. 17: Přehled délek fragmentů sekvenované DNA**

| Vzorek | Průměrná délka sekvenovaných fragmentů | Minimální délka sekvenovaných fragmentů | Maximální délka sekvenovaných fragmentů |
|--------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1      | 208 bp                                 | 87 bp                                   | 456 bp                                  |
| 2      | 198 bp                                 | 73 bp                                   | 429 bp                                  |
| 3      | 201 bp                                 | 79 bp                                   | 428 bp                                  |
| 4      | 199 bp                                 | 86 bp                                   | 418 bp                                  |
| 5      | 203 bp                                 | 81 bp                                   | 434 bp                                  |
| 6      | 199 bp                                 | 79 bp                                   | 422 bp                                  |
| 7      | 188 bp                                 | 51 bp                                   | 400 bp                                  |
| 8      | 183 bp                                 | 44 bp                                   | 378 bp                                  |
| 9      | 208 bp                                 | 72 bp                                   | 454 bp                                  |
| 10     | 218 bp                                 | 79 bp                                   | 481 bp                                  |
| 11     | 195 bp                                 | 62 bp                                   | 421 bp                                  |

**Tab. 18: Přehled pokrytí sekvenování jednotlivých vzorků**

| Vzorek | Počet nukleotidů přiřazených k dané oblasti (průměrný počet případů, kdy je konkrétní báze sekvenována nezávislými čteními) – pokrytí sekvenování | Procentuální zastoupení oblastí pokrytých 20x | Procentuální zastoupení oblastí pokrytých 50x |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1      | 385,6x                                                                                                                                            | 99,8 %                                        | 98,9 %                                        |
| 2      | 312,3x                                                                                                                                            | 99,7 %                                        | 98,2 %                                        |
| 3      | 550,8x                                                                                                                                            | 99,9 %                                        | 99,4 %                                        |
| 4      | 326,7x                                                                                                                                            | 99,5 %                                        | 97,9 %                                        |
| 5      | 550,1x                                                                                                                                            | 99,8 %                                        | 99,5 %                                        |
| 6      | 442,9x                                                                                                                                            | 99,7 %                                        | 98,8 %                                        |
| 7      | 489,2x                                                                                                                                            | 99,5 %                                        | 98,2 %                                        |
| 8      | 237,9x                                                                                                                                            | 97,3 %                                        | 91,6 %                                        |
| 9      | 640,8x                                                                                                                                            | 99,9 %                                        | 99,6 %                                        |
| 10     | 627,1x                                                                                                                                            | 99,9 %                                        | 99,7 %                                        |
| 11     | 528,1x                                                                                                                                            | 99,8 %                                        | 99,1 %                                        |

**Tab. 19: Přehled některých charakteristik sekvenování – rozdělení jednotlivých čtení mezi vzorky na základě indexu (demultiplexace)**

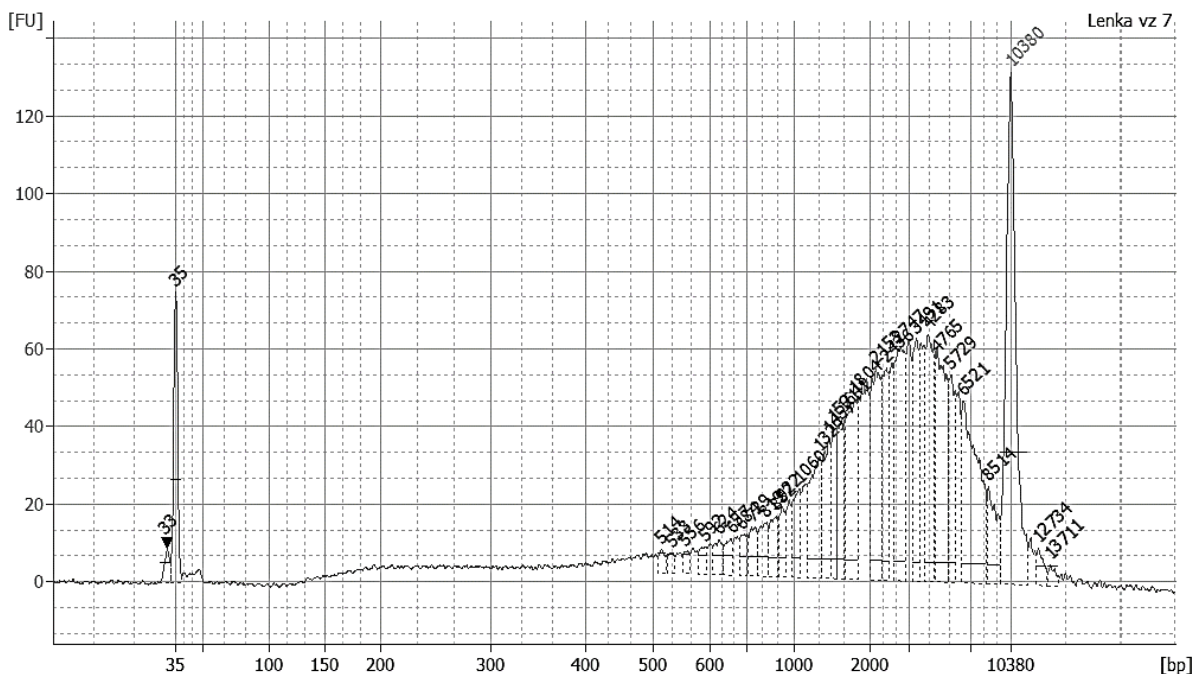
| <b>Vzorek</b> | <b>Počet klastrů</b> | <b>Počet čtení</b> | <b>Počet čtení přiřazených k referenční sekvenci</b> |
|---------------|----------------------|--------------------|------------------------------------------------------|
| <b>1</b>      | 847 824              | 1 695 648          | 1 646 902                                            |
| <b>2</b>      | 700 310              | 1 400 620          | 1 361 269                                            |
| <b>3</b>      | 1 174 533            | 2 349 066          | 2 294 696                                            |
| <b>4</b>      | 730 015              | 1 460 030          | 1 419 340                                            |
| <b>5</b>      | 1 179 445            | 2 358 890          | 2 301 229                                            |
| <b>6</b>      | 937 039              | 1 874 078          | 1 832 287                                            |
| <b>7</b>      | 1 062 463            | 2 124 926          | 2 076 935                                            |
| <b>8</b>      | 539 380              | 1 078 760          | 1 049 718                                            |
| <b>9</b>      | 1 262 473            | 2 524 946          | 2 469 346                                            |
| <b>10</b>     | 1 351 977            | 2 703 954          | 2 627 423                                            |
| <b>11</b>     | 1 077 385            | 2 154 770          | 2 108 899                                            |

## 7. DISKUZE

Pro správný průběh sekvenování je důležitá správná a přesná příprava DNA knihovny. V našem případě se však krok fragmentace vzorků DNA jevil jako problematický. V optimálním případě měly mít největší zastoupení fragmenty o velikosti kolem 250 bp. Některé vzorky byly ovšem málo fragmentované a obsahovaly větší počet fragmentů o velikosti větší než 250 bp (**Obr. 9**). Optimalizací kroku bylo zvýšení počtu otáček třepačky. Výrazný posun však nebyl pozorován. V průběhu dalšího postupu přípravy knihovny se ale ukázalo, že i tak byla fragmentace dostatečná a nerušila žádné následující reakce. Důkazem toho je, že vzorek č. 9 a jeho technický replikát, který byl označen jako vzorek č. 12 a zároveň nebyl dostatečně fragmentován, dávali stejné výsledky nalezených variant.

Klastrování v rámci sekvenování bylo relativně nízké a činilo  $694 \pm 48$  tisíc klastrů/mm<sup>2</sup>. Podle specifikací použitého kitu daných výrobcem by se měla hustota klastrů pohybovat v rozmezí 865-965 tisíc klastrů/mm<sup>2</sup>. Klastrování by tedy bylo vhodné navýšit použitím koncentrace DNA před denaturací vyšší než byla zvolená koncentrace 1,7 nM, například 2,2 nM.

**Obr. 9: Příklad elektroforetogramu provedené elektroforézy DNA vzorku s nízkou fragmentací:** osa x – velikosti fragmentů DNA v bp; osa y – počet daných fragmentů



Jednotlivé vzorky pacientů byly samozřejmě analyzovány z toho pohledu, jaký dopad by mohly mít nalezené varianty na vznikající aminokyselinu nebo samotný protein. Z toho důvodu byly filtrem vybrány mutace měnící smysl, tedy bodové substituční mutace měnící

konkrétní kodon a vedoucí k záměně aminokyseliny vznikajícího proteinu. Zájmové byly také varianty sestřihové, kdy mutací v místě sestřihu dochází k odlišnému alternativnímu sestřihu a tím ke tvorbě odlišného proteinu, a také mutace frameshift, které insercí nebo delecí báze mění čtecí rámec, a stop-gain a stop-lost, které mohou mít velký vliv na funkci proteinu. V rámci programu Variant Studio byla predikce patogenicity nalezených variant testována programem SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) a PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Jedná se o nástroje, které předpovídají, zda substituce určité aminokyseliny může ovlivňovat funkci proteinu. Pro výsledné hodnocení závažnosti nalezené varianty byla také prohledávána databáze ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), která představuje veřejný archiv obsahující informace o dosud zjištěných vztazích mezi nalezenými variantami a lidským fenotypem, a další literární zdroje.

U pacienta 1 byla nalezena pouze jedna mutace, a to v genu pro transmembránový protein 43. Jednalo se o proteinovou záměnu p.Arg312Trp. Tato varianta byla pomocí SIFT a PolyPhen-2 zhodnocena jako pravděpodobně poškozující funkci proteinu a jako škodlivá. Studie z roku 2013 (Haywood *et al.*), která testovala celkem 198 rodin s diagnostikovanou arytmogenní kardiomyopatií, prezentuje tuto variantu jako opakující se a velmi pravděpodobně patogenní v souvislosti se vznikem arytmogenní kardiomyopatie. Vzhledem k tomu, že existují studie (Haas *et al.*, 2015), které potvrzují nález velkého množství mutací u pacientů s DCM asociovaných i s ARVC, lze předpokládat patogenní závažnost i ve spojitosti s DCM.

U pacienta 5 byla detekována proteinová záměna p.Glu1833Val v genu kódujícím desmoplakin. Programy SIFT a PolyPhen-2 zhodnotily tuto variantu jako pravděpodobně škodlivou a mající vliv na funkci proteinu. Z testování z roku 2010 (Barahona-Dussault *et al.*) však vychází, že nalezená varianta je v populaci relativně běžná (1,5 %) a podle studie Gehmlich *et al.* (2011) se jedná o variantu pravděpodobně benigní. Druhou nalezenou variantou byla proteinová záměna p.Arg14567Thr v genu pro titin, která není dosud popsána v žádné literatuře.

Celkem bylo nalezeno 28 mutací v genech: *DSC2*, *DSP*, *JUP*, *LAMA4*, *MYBPC3*, *MYLK2*, *PKP2*, *TMEM43* a *TTN*. Nejvíce mutací, konkrétně 13, se nacházelo v genu kódujícím titin (*TTN*). Titin, nebo také konektin, je obrovský svalový protein exprimovaný v srdeční i kosterní svalovině, který se rozkládá od Z-disku až k myosinové oblasti uprostřed sarkomery a hraje klíčovou roli v sestavě svalů, přenosu síly na Z-discích a v údržbě klidového napětí v I-pruhu sarkomery (Itoh-Satoh *et al.*, 2002). Z důvodu velké délky proteinu nelze v programech SIFT a PolyPhen-2 simulovat strukturu proteinu a zjišťovat

možný vliv záměny aminokyseliny. Mutace v tomto genu, zejména ty, které mají za následek zkrácení vznikajícího proteinu, byly asociovány se vznikem dilatační kardiomyopatie (Herman *et al.*, 2012; Itoh-Satoh *et al.*, 2002). Z nalezených 13 mutací byly 2 vyhodnoceny jako pravděpodobně patogenní, a to právě z toho důvodu, že se jednalo o variantu stop-gained a mutaci v místě sestřihu. Tyto mutace mají pravděpodobně za následek zkrácení vznikajícího proteinu a tím i vliv na jeho funkci.

V roce 2015 bylo provedeno testování dosud největšího počtu pacientů s familiární a sporadickou DCM (Haas *et al.*). Bylo testováno celkem 639 pacientů se sporadickou nebo prokázanou familiární DCM z osmi evropských center. Jejich cílem bylo zkoumání klinicky významných genů DCM, ale také genů zapříčiňujících jiné typy dědičných kardiomyopatií. Cílovými oblastmi sekvenování byly všechny známé kódující exony vybraných 84 genů. Autoři dosáhli pokrytí alespoň 50x v 99,1 % cílené oblasti. Tyto výsledky sekvenování jsou porovnatelné s našimi, kde byl tento parametr dosažen pro 98,9 % (medián) námi cílené oblasti. Detekovali celkem 359 669 variant, z nichž 8 269 bylo unikátních. Známé mutace byly nalezeny u 305 pacientů. Celkem identifikovaly 117 dříve neanotovaných variant ve 26 genech u 147 pacientů jako varianty pravděpodobně patogenního charakteru. Konkrétně 141 jedinečných varianty u 221 pacientů bylo zhodnoceno jako mající vliv na funkci proteinu a jejich frekvence byla posouzena jako vzácná. Většina nalezených variant (13 %) se nacházela v genu pro titin, což není tak překvapující vzhledem k tomu, že titin je největší lidský gen a představuje 20 % z celkové cílové oblasti. Zastoupení mutací v rámci jednotlivých evropských zemí bylo relativně homogenní. Bylo také nalezeno vysoké procento mutací dříve popsanych u HCM a ARVC, což potvrzuje genetický základ kardiomyopatií. Nejvíce zasaženým genem v rámci patogenních mutací byl plakophilin 2, jehož mutace představují častou příčinu ARVC. Podobný nález také poskytl Pugh *et al.* (2014). Velké množství patogenních mutací se také nacházelo v genu pro myozin-vazebný protein C a desmoplakin.

Pro redukci počtu pravděpodobných a potenciálně patogenních variant je nutné v rámci bioinformatické analýzy využít filtr, například pro vyloučení běžných variant vyskytujících se v databázi jako je dbSNP. Je však známo že tato databáze je tzv. kontaminována malým, ale přesto značným počtem patogenních variant (Bamshad *et al.*, 2011). Z těchto důvodů je příhodné zahrnovat do testování také kontrolní kohorty z různých populací. Bioinformatické strategie by měly tedy růst společně s obrovským množstvím dat z dostatečně velkých a kvalitních studií NGS (Haas *et al.*, 2015).

V našem případě počet 11 vzorků DNA není možné statisticky hodnotit, a nelze tedy získat komplexnější informace. Cílem je tedy rozšířit skupinu analyzovaných vzorků pacientů na množství >50, případně také zařadit do analýzy skupinu kontrolních vzorků.

Je sice známo velké množství genů, jejichž mutace zapříčiňují dilatační kardiomyopatii, ale až dosud technická omezení bránila objasnění přínosu všech klinicky významných genů v predikci fenotypu onemocnění. Výsledky testování Haase *et al.* (2015) zdůrazňují vysokou analytickou kvalitu a proveditelnost metody sekvenování nové generace v klinické genetické diagnostice a poskytují spolehlivou databázi genetických příčin DCM. U technologie NGS lze ale nalézt také určité nedostatky, jako je například neúplné zastoupení a pokrytí exonů a selhání detekce klinicky relevantních mutací. I přesto toto testování bylo schopno ukázat vysokou analytickou spolehlivost a konzistenci ve velkém souboru pacientů, což dokazuje, že cílené NGS je vhodné použít v klinické rutinní diagnostice.

Lze tedy předpokládat, že se identifikace různých mutací stane běžně dostupnou a mohla by tak vést k diferencovanému přístupu k léčbě kardiomyopatií právě na základě určitého genotypu (Špinarová *et* Poloczková, 2007). Velmi důležitá je zejména identifikace takových mutací, které mohou mít zásadní vliv na rozvoj komplikací v průběhu nemoci. Například mutace v genech pro desmosomální proteiny se velmi často objevují u pacientů s pokročilou DCM podstupujících transplantaci srdce (Garcia-Pavia *et al.*, 2011). Podobně také mutace v genu pro lamin A/C jsou spojeny s vyšším rizikem náhlé srdeční smrti (van Rijsingen *et al.*, 2013). Tato zjištění tedy zdůrazňují důležitost genetického poradenství a genetického testování.

Pro predikci klinických projevů geneticky diagnostikovaných pacientů bude také stále důležitější korelace fenotypu s genotypem (Haas *et al.*, 2015). Kromě samotných genotypů by měly být brány v úvahu také epigenetické modifikace, jako je například metylace DNA (Frese *et al.*, 2013), která podle nedávných studií hraje roli v srdečním selhání a DCM (Haas *et al.*, 2013; Movassagh *et al.*, 2011).



## 8. ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce se zabývala využitím sekvenování nové generace v identifikaci kardiomyopatií. V teoretické části byla zpracována rešerše zaměřená na problematiku kardiomyopatie, na její klasifikaci a zejména na dědičnou formu dilatační kardiomyopatie. Byla zde také popsána technologie sekvenování nové generace se zaměřením na běžně dostupnou platformu společnosti Illumina.

V rámci experimentální části práce byla provedena příprava DNA knihovny 11 vzorků pacientů s diagnostikovanou dilatační kardiomyopatií a následná analýza sekvenování nové generace pomocí platformy Illumina na sekvenátoru MiSeq. Nalezené varianty byly filtrovány v programu Variant Studio. Celkem bylo vytipováno 28 mutací v 9 genech: *DSC2*, *DSP*, *JUP*, *LAMA4*, *MYBPC3*, *MYLK2*, *PKP2*, *TMEM43* a *TTN*. Nejvíce mutací se nacházelo v genu kódujícím titin. Z těchto 28 mutací byly 4 varianty u 4 pacientů zhodnoceny jako potenciálně patogenní. Jednalo se o mutaci v genu *TMEM43* a *JUP* a 2 mutace v genu *TTN*. U pacientů s těmito patogenními variantami lze předpokládat, že jejich onemocnění je podmíněno geneticky a že k rozvoji onemocnění může dojít i u některých z příbuzných. Pro komplexnější a statistické zhodnocení je však nutné analyzovat větší množství vzorků DNA pacientů.

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

- Abelmann, W. H. (1984): Classification and natural history of primary myocardial disease. *Prog Cardiovasc Dis*, 27(2): 73-94.
- Ansorge, W. J. (2009): Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25(4): 195-203.
- Arbustini, E., Weidemann, F., Hall, J. L. (2014): Left Ventricular Noncompaction: A Distinct Cardiomyopathy or a Trait Shared by Different Cardiac Diseases? *J Am Coll Cardiol*, 64(17): 1840-1850.
- Ashrafian, H., Watkins, H. (2007): Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. *J Am Coll Cardiol*, 49(12): 1251-1264.
- Axelsson, A., Iversen, K., Vejlstrup, N., Ho, C., Norsk, J., Langhoff, L., Ahtarovski, K., Corell, P., Havndrup, O., Jensen, M., Bundgaard, H. (2015): Efficacy and safety of the angiotensin II receptor blocker losartan for Hypertrophic cardiomyopathy: the INHERIT randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(2): 123-131.
- Baig, M. K., Goldman, J. H., Caforio, A. L., Coonar, A. S., Keeling, P. J., McKenna, W. J. (1998): Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol*, 31(1): 195-201.
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., Shendure, J. (2011): Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, 12(11): 745–755.
- Barahona-Dussault, C., Benito, B., Campuzano, O., Iglesias, A., Leung, T. L., Robb, L., Talajic, M., Brugada, R. (2010): Role of genetic testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Clin Genet*, 77(1): 37–48.
- Brdička, R., Didden, W., Alda, M., Dostál, J., Kleibl, Z., Kousal, B., Lišková, P., Maixnerová, D., Mitlöhner, M., Omelka, R., Pilka, R., Procházka, M., Reiterová, J., Sovová, O., Tomašov, P. Genetika v klinické praxi III. Praha: Galén, 2015, s. 109-131. Kapitola 6, Genetika kardiomyopatií. ISBN 9788074922268.

Burkett, E. L., Hershberger, R. E. (2005): Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 45(7): 969-981.

Cardiomyopathy UK [online] [cit. 5. 3. 2016]: Cardiomyopathy information. Dostupné z: <http://www.cardiomyopathy.org/cardiomyopathy-information/cardiomyopathy-information>

Center for Statistical Genetics (2015) [online] [cit. 17. 4. 2016]: SAM. Dostupné z: <http://genome.sph.umich.edu/wiki/SAM>

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(22): 2715-2726.

Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2009): The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*, 38(6): 1767-1771.

Codd, M. B., Sugrue, D. D., Gersh, B. J., Melton, L. J. (1989): Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: a population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*, 80(3): 564-572.

Coppini, R., Ho, C. Y., Ashley, E., Day, S., Ferrantini, C., Girolami, F., Tomberli, B., Bardi, S., Torricelli, F., Cecchi, F., Mugelli, A., Poggesi, C., Tardiff, J., Olivotto, I. (2014): Clinical phenotype and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with thin-filament gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 64(24): 2589-2600.

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): 1416–1424.

Dalal, D., Nasir, K., Bomma, C., Prakasa, K., Tandri, H., Piccini, J., Roguin, A., Tichnell, C., James, C., Russell, SD., Judge, DP., Abraham, T., Spevak, P. J., Bluemke, D. A., Calkins, H. (2005): Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a United States experience. *Circulation*, 112(25): 3823-3832.

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011): The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15): 2156-2158.

Durbin, R. (2009): The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16): 2078-2079.

Elkayam, U., Akhter, M. W., Singh, H., Khan, S., Bitar, F., Hameed, A., Shotan, A. (2005): Pregnancy-associated cardiomyopathy. Clinical characteristics and a comparison between early and late presentations. *Circulation*, 111(16): 2050–2055.

Elliott, P. (2008): The 2006 American Heart Association Classification of cardiomyopathies is not the gold standard. *Circ Heart Fail*, 1(1): 77-79.

Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kühl, 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(2): 270–276.

Frese, K. S., Katus, H. A., Meder, B. (2013): Next-generation sequencing: from understanding biology to personalized medicine. *Biology (Basel)*, 2(1): 378–398.

Garcia-Pavia, P., Syrris, P., Salas, C., Evans, A., Mirelis, J. G., Cobo-Marcos, M., Vilches, C., Bornstein, B., Segovia, J., Alonso-Pulpon, L., Elliott, P. M. (2011): Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: a clinicopathological study. *Heart*, 97(21): 1744-1752.

Gehrmlich, K., Syrris, P., Peskett, E., Evans, A., Ehler, E., Asimaki, A., Anastasakis, A., Tsatsopoulou, A., Vouliotis, A-I., Stefanadis, C., Saffitz, J. E., Protonotarios, N., McKenna, W. J. (2011): Mechanistic insights into arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by desmocollin-2 mutations. *Cardiovasc Res*, 90(1): 77–87.

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., American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American Association for Thoracic Surgery; American Society of Echocardiography; American Society of Nuclear Cardiology; Heart

Failure Society of America; Heart Rhythm Society; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Thoracic Surgeons. (2011): 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, 124(24): 783-831.

Guan, Y. F., Li, G. R., Wang, R. J., Yi, Y. T., Yang, L., Jiang, D., Zhang, X. P., Peng, Y. (2012): Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*, 31(10): 463–470.

Haas, J., Frese, K. S., Park, Y. J., Keller, A., Vogel, B., Lindroth, A. M., Weichenhan, D., Franke, J., Fischer, S., Bauer, A., Marquart, S., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Kohler, D., Wolf, N. M., Hassel, S., Nietsch, R., Wieland, T., Ehlermann, P., Schultz, J. H., Dosch, A., Mereles, D., Hardt, S., Backs, J., Hoheisel, J. D., Plass, C., Katus, H. A., Meder, B. (2013): Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med*, 5(3): 413–429.

Haas, J., Frese, K. S., Peil, B., Kloos, W., Keller, A., Nietsch, R., Feng, Z., Müller, S., Kayvanpour, E., Vogel, B., Sedaghat-Hamedani, F., Lim, W. K., Zhao, X., Fradkin, D., Köhler, D., Fischer, S., Franke, J., Marguart, S., Barb, I., Li, D. T., Amr, A., Ehlermann, P., Mereles, D., Weis, T., Hassel, S., Kremer, A., King, V., Wirsz, E., Isnard, R., Komajda, M., Serio, A., Grasso, M., Syrris, P., Wicks, E., Plagnol, V., Lopes, L., Gadgaard, T., Eiskjær, H., Jørgensen, M., Garcia-Giustiniani, D., Ortiz-Genga, M., Crespo-Leiro, M. G., Deprez, R. H., Christiaans, I., van Rijsingen, I. A., Wilde, A. A., Waldenstrom, A., Bolognesi, M., Bellazzi, R., Mörner, S., Bermejo, J. L., Monserrat, L., Villard, E., Mogensen, J., Pinto, Y. M., Charron, P., Elliott, P., Arbustini, E., Katus, H. A., Meder, B. (2015): Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 36(18): 1123-1135.

Haywood, A. F., Merner, N. D., Hodgkinson, K. A., Houston, J., Syrris, P., Booth, V., Connors, S., Pantazis, A., Quarta, G., Elliott, P., McKenna, W., Young, T. L. (2013): Recurrent missense mutations in TMEM43 (ARVD5) due to founder effects cause arrhythmogenic cardiomyopathies in the UK and Canada. *Eur Heart J*, 34(13): 1002–1011.

Herman, D. S., Lam, L., Taylor, M. R., Wang, L., Teekakirikul, P., Christodoulou, D., Conner, L., DePalma, S. R., McDonough, B., Sparks, E., Teodorescu, D. L., Cirino, A. L., Banner, N. R., Pennell, D. J., Graw, S., Merlo, M., Di Lenarda, A., Sinagra, G., Bos, J. M., Ackerman, M. J., Mitchell, R. N., Murry, C. E., Lakdawala, N. K., Ho, C. Y., Barton, P.

- J., Cook, S. A., Mestroni, L., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (2012): Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 366(7): 619-628.
- Ho, C. Y., Lakdawala, N. K., Cirino, A. L., Lipshultz, S. E., Sparks, E., Abbasi, S. A., Kwong, R. Y., Antman, E. M., Semsarian, C., González, A., López, B., Diez, J., Orav, E. J., Colan, S. D., Seidman, C. E. (2015): Diltiazem treatment for pre-clinical Hypertrophic cardiomyopathy sarcomere mutation carriers: a pilot randomized trial to modify disease expression. *JACC Heart Fail*, 3(2): 180-188.
- Huby, A. C., Mendsaikhon, U., Takagi, K., Martherus, R., Wansapura, J., Gong, N., Osinska, H., James, J. F., Kramer, K., Saito, K., Robbins, J., Khuchua, Z., Towbin, J. A., Purevjav, E. (2014): Disturbance in z-disk mechanosensitive proteins induced by a persistent mutant myopalladin causes familial restrictive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 64(25): 2765-2776.
- Illumina (2016) [online] [cit. 17. 4. 2016]. Dostupné z: <http://www.illumina.com/>
- Itoh-Satoh, M., Hayashi, T., Nishi, H., Koga, Y., Arimura, T., Koyanagi, T., Takahashi, M., Hohda, S., Ueda, K., Nouchi, T., Hiroe, M., Marumo, F., Imaizumi, T., Yasunami, M., Kimura, A. (2002): Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 291(2): 385-393.
- Jefferies, J. L. (2013): Barth syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 163C(3): 198-205.
- Keren, A., Gottlieb, S., Tzivoni, D., Stern, S., Yarom, R., Billingham, M. E., Popp, R. L. (1990): Mildly dilated congestive cardiomyopathy. Use of prospective diagnostic criteria and description of the clinical course without heart transplantation. *Circulation*, 81(2): 506-517.
- Klaassen, S., Probst, S., Oechslin, E., Gerull, B., Krings, G., Schuler, P., Greutmann, M., Hürlimann, D., Yegitbasi, M., Pons, L., Gramlich, M., Drenckhahn, J. D., Heuser, A., Berger, F., Jenni, R., Thierfelder, L. (2008): Mutations in sarcomere protein genes in left ventricular noncompaction. *Circulation*, 117(22): 2893-2901.
- Koubková, L., Vojtěšek, B., Vyzula, R. (2014): Next Generation Sequencing – Application in Clinical Practice. *Klinická onkologie*, 27(1): 81-85.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G.,

Marcus, F. I., McKenna, W. J., Sherrill, D., Basso, C., Baucé, 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: proposed modification of the task force criteria. *Circulation*, 121(13): 1533-1541.

Markets and Markets (2016) [online] [cit. 5. 3. 2016]: Next-Generation Sequencing (NGS) Market by Platforms (HiSeq, MiSeq, HiSeq X Ten/X Five, Nextseq500, Ion Proton, PGM, IonS5, PacBio & Sequel), Services (Targeted Sequencing, De novo), & Application (Diagnostic, Drug Discovery) - Global Forecasts to 2021. Dostupné z: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/next-generation-sequencing-ngs-technologies-market-546.html>

Maron, B. J. (2008): The 2006 American Heart Association Classification of cardiomyopathies is the gold standard. *Circ Heart Fail*, 1(1): 72-76.

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. Echocardiographic Analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*, 92(4): 785-789.

Maron, B. J., Maron, M. S. (2013): Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*, 381(9862): 242-255.

Maron, B. J., Niimura, H., Casey, S. A., Soper, M. K., Wright, G. B., Seidman, J. G., Seidman, C. E. (2001): Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J Am Coll Cardiol*, 38(2): 315–321.

Maron, B. J., Towbin, J. A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A. J., Seidman, C. E., Young, J. B.; American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention. (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*, 113(14): 1807-1816.

Movassagh, M., Vujic, A., Foo, R. (2011): Genome-wide DNA methylation in human heart failure. *Epigenomics*, 3(1): 103–109.

National Heart, Lung, and Blood Institute (2015) [online] [cit. 5. 3. 2016]: Cardiomyopathy. Dostupné z: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cm>

Pankuweit, S., Richter, A. (2015): Clinical genetics of dilated cardiomyopathy: on the way to personalized medicine? *Eur Heart J*, 36(18): 1074-1077.

Perrot, A., Dietz, R., Osterziel, K. J. (2007): Is there a common genetic basis for all familial cardiomyopathies? *Eur J Heart Fail*, 9(1): 4-6.

Pinamonti, B., Brun, F., Mestroni, L., Sinagra, G. (2014): Arrhythmogenic right ventricular Cardiomyopathy: From genetics to diagnostic and therapeutic challenges. *World J Cardiol*, 6(12): 1234-1244.

Pugh, T. J., Kelly, M. A., Gowrisankar, S., Hynes, E., Seidman, M. A., Baxter, S. M., Bowser, M., Harrison, B., Aaron, D., Mahanta, L. M., Lakdawala, N. K., McDermott, G., White, E. T., Rehm, H. L., Lebo, M., Funke, B. H. (2014): The landscape of genetic variation in dilated Cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genet Med*, 16(8): 601–608.

Rankin, J., Auer-Grumbach, M., Bagg, W., Colclough, K., Nguyen, T. D., Fenton-May, J., Hattersley, A., Hudson, J., Jardine, P., Josifova, D., Longman, C., McWilliam, R., Owen, K., Walker, M., Wehnert, M., Ellard, S. (2008): Extreme phenotypic diversity and nonpenetrance in families with the LMNA gene mutation R644C. *Am J Med Genet A*, 146A(12): 1530–1542.

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(5): 841-842.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 74(12): 5463–5467.



- Sen-Chowdhry, S., Syrris, P., Prasad, S. K., Hughes, S. E., Merrifield, R., Ward, D., Pennell, D. J., McKenna, W. J. (2008): Left-dominant arrhythmogenic Cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity. *J Am Coll Cardiol*, 52(25): 2175-2187.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibabaei, M. (2012): Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol*, 21(8): 1794–1805.
- Stehlik, J., Edwards, L. B., Kucheryavaya, A. Y., Benden, C., Christie, J. D., Dipchand, A. I., Dobbels, F., Kirk, R., Rahmel, A. O., Hertz, M. I., International Society of Heart and Lung Transplantation. (2012): The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report 2012. *J Heart Lung Transplant*, 31(10): 1052-1064.
- Špinarová, L., Poloczková, H. (2007): Je kardiomyopatie geneticky podmíněné onemocnění. *Kardiolog Rev*, 9(4): 218-221.
- Taylor, M., Graw, S., Sinagra, G., Barnes, C., Slavov, D., Brun, F., Pinamonti, B., Salcedo, E. E., Sauer, W., Pyxaras, S., Anderson, B., Simon, B., Bogomolovas, J., Labeit, S., Granzier, H., Mestroni, L. (2011): Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation*, 124(8): 876-885.
- Teare, D. (1958): Asymmetrical hypertrophy of the Heart in young adults. *Br Heart J*, 20(1): 1-8.
- Thiene, G., Corrado, D., Basso, C. (2004): Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification? *Eur Heart J*, 25(20): 1772–1775.
- van Rijsingen, I. A., Nannenberg, E. A., Arbustini, E., Elliott, P. M., Mogensen, J., Hermans-van Ast, J. F., van der Kooi, A. J., van Tintelen, J. P., van den Berg, M. P., Grasso, M., Serio, A., Jenkins, S., Rowland, C., Richard, P., Wilde, A. A., Perrot, A., Pankuweit, S., Zwinderman, A. H., Charron, P., Christiaans, I., Pinto, Y. M. (2013): Gender-specific differences in major cardiac events and mortality in lamin A/C mutation carriers. *Eur J Heart Fail*, 15(4): 376-384.
- Vassalini, M., Verzeletti, A., Restori, M., De Ferrari, F. (2015) [cit. 2. 4. 2016] : An autopsy study of sudden cardiac death in person aged 1-40 years in Brescia (Italy). *J Cardiovasc Med* (Hagerstown). 2015 Jan 7. [Epub ahead of print]

Veselka, J., Linhartová, K., Zemánek, D., Aschermann, O., Fiedler, J., Krejčí, J., Riedlbauchová, L., Tomašov, P. Kardiomyopatie. 1. vydání. Praha: Galén, 2009, s. 15-23. Kapitola 1, Klasifikace a genetika kardiomyopatií. ISBN 9788072626403.

Yingchoncharoen, T., Tang, W. W. (2014): Recent advances in Hypertrophic cardiomyopathy. *Journal List F1000Prime Rep*, 6: 12.

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|       |                                                                                                |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AHA   | American Heart Association, Americká kardiologická asociace                                    |
| ARVD  | Arrhythmogenic Right Ventricle Cardiomyopathy, arytmogenní kardiomyopatie pravé komory         |
| BAM   | Binary Alignment/Map                                                                           |
| bp    | Base pair, pár bází                                                                            |
| CCD   | Charge-Coupled Device, zařízení s vázanými náboji                                              |
| DCM   | Dilated Cardiomyopathy, dilatační kardiomyopatie                                               |
| DNA   | Deoxyribonucleic Acid, deoxyribonukleová kyselina                                              |
| dsDNA | Double-strand DNA, dvouvláknová DNA                                                            |
| EKG   | Elektrokardiografie                                                                            |
| ESC   | European Society of Cardiology, Evropská kardiologická společnost                              |
| Gbp   | Gigabase pair, miliarda párů bází                                                              |
| HCM   | Hypertrophic Cardiomyopathy, hypertrofická kardiomyopatie                                      |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry, Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii |
| kb    | Kilobase, tisíc bází                                                                           |
| LVNC  | Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy, nonkompaktní kardiomyopatie                     |
| MDCM  | Mildly Dilated Congestive Cardiomyopathy, kardiomyopatie s minimální dilatací                  |
| MPS   | Massively Parallel Sequencing, masivně paralelní sekvenování                                   |
| NGS   | Next-Generation Sequencing, sekvenování nové generace                                          |
| PCR   | Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce                                        |
| PPCM  | Peripartum Cardiomyopathy, peripartální/těhotenská kardiomyopatie                              |
| pH    | potential of hydrogen, vodíkový potenciál                                                      |
| RCM   | Restrictive Cardiomyopathy, restriktivní kardiomyopatie                                        |
| RNA   | Ribonucleic Acid, ribonukleová kyselina                                                        |

|         |                                                                 |
|---------|-----------------------------------------------------------------|
| RNA-seq | RNA sequencing, sekvenování transkriptomu                       |
| rpm     | Revolutions per minute, otáček za minutu                        |
| SAM     | Sequence Alignment/Map                                          |
| SBS     | Sequencing by Synthesis, sekvenování syntézou                   |
| SNP     | Single Nucleotide Polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus |
| SNV     | Single Nucleotide Variant, jednonukleotidová varianta           |
| VCF     | Variant Call Format                                             |