

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program:

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Pavel Votýpka

**Molekulárně genetická diagnostika dědičných
kardiovaskulárních onemocnění**

Molecular diagnostics of hereditary cardiovascular disorders

Disertační práce

Školitel: MUDr. Alice Krebsová, Ph.D.

Konzultant: Prof. MUDr. Milan Macek Jr., DrSc., MHA

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 18. 06. 2024

Pavel Votýpka

.....

Podpis autora

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval svým školitelům MUDr. Alici Krebsové, Ph.D. a Prof. MUDr. Milanu Mackovi Jr., DrSc., MHA za příležitost pracovat na velmi zajímavých projektech a za pomoci nejmodernějších technologií se při nich podílet na zlepšení péče o kardiologicky nemocné pacienty. Také bych chtěl poděkovat za jejich ochotu a odborné vedení v průběhu celého mého postgraduálního studia.

Za cenné rady a přínosné diskuze při řešení složitých genetických nálezů děkuji kolegyni RNDr. Petře Peldové, Ph.D. a celému týmu Oddělení lékařské genetiky, ÚBLG 2.LF UK a FN Motol.

Děkuji také své manželce a dětem za jejich trpělivost při studiu a sepisování této disertační práce.

Abstrakt

Kardiogenetika je dynamicky se rozvíjející obor genetiky, který umožňuje okamžitou implementaci laboratorních výsledků do praxe. To vede ke zlepšení individualizované péče nejen o samotné pacienty, ale i jejich příbuzné. Mezi dědičná kardiovaskulární onemocnění patří dědičné onemocnění srdečního svalu, dědičné elektrické abnormality a dědičné onemocnění velkých cév a chlopní. Jejich společným jmenovatelem je riziko náhlé, předčasné srdeční smrti (SCD) a tedy i správně nastavený systém kardiogenetické péče je základním mechanismem k její prevenci.

K lepšímu poznání genetických příčin SCD přispěla naše pilotní studie, ve které jsme pomocí tzv. molekulární pitvy vyšetřili celkem 100 nepříbuzných obětí SCD a detekovali jasnou genetickou příčinu u 22 % z nich. Zásadním výsledkem studie je také záchyt 87 příbuzných v riziku náhlé smrti, kteří byli převzati ke klinickému sledování. V neposlední řadě vedly získané poznatky k vytvoření souboru doporučení pro správný postup genetického testování v případě dědičných kardiologických onemocnění a náhlé srdeční smrti. V paralelně vyšetřované kohortě 100 jedinců, kteří přežili srdeční zástavu (SCA) se nám podařilo určit příčinou variantu ve 20 % případů, přičemž u 10 z nich tento výsledek umožnil stanovení diagnózy arytmogenní kardiomyopatie, jejíž morfologické projevy byly pod rozlišovací schopnost zobrazovacích metod. Výsledky byly zveřejněny na kongresu European Heart Rhythm Association (EHRA) a jsou slibným podkladem dalších připravovaných publikací.

Vyšetření kohorty pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (HCM) umožnilo provedení 2 studií, které jasně prokázaly, že u pacientů s nálezem příčinné varianty v genu pro sarkomerické proteiny nedochází k rozdílnému průběhu onemocnění, odpovědi na léčbu alkoholovou septální ablací, ani zvýšenému výskytu závažných komplikací včetně náhlé srdeční smrti, ve srovnání s geneticky negativními pacienty. Samotný nález patogenní varianty u pacientů s HCM tak není důvodem pro změnu způsobu terapie ani celkové péče o pacienta. Zkušenosti z genetického testování také vedly k vytvoření doporučení v rámci komplexního přístupu k pacientům s HCM.

Vyšetřením naší kohorty pacientů s aortálními syndromy a systémovým onemocněním pojiva se nám podařilo identifikovat vzácné varianty, které byly použity do publikací rozšiřující současné znalosti o příčinách a projevech hereditárního aneurysmatu a disekce thorakální aorty (TAAD). V těch byla zkoumána rozmanitost fenotypových

projevů asociovaných s různým typem patogenních variant v genu *LOX* a také souvislost patogenních variant v genu *JAG1* s rozvojem izolovaného aneurysmatu aorty.

Klíčová slova: kardiogenetika, náhlá srdeční smrt, SCD, kardiomyopatie, arytmie, aneurysma, aortopatie

Abstract

Cardiogenetics is a dynamically developing field of genetics that allows immediate implementation of laboratory results into practice, leading to improved prevention and treatment for patients and their relatives. A properly set up cardiogenetic care system is an essential mechanism to prevent sudden cardiac death (SCD). Our pilot study contributed to a better understanding of the genetic causes of SCD, in which we examined a total of 100 unrelated SCD victims using molecular autopsy and detected a clear genetic cause in 22 % of them. A major outcome of the study was also the identify of 87 relatives at risk of sudden death who were taken up for clinical follow-up. Finally, the findings led to the development of a set of recommendations for the correct procedure of genetic testing in cases of inherited cardiac disease and sudden cardiac death. In a parallel cohort of 100 cardiac arrest survivors (SCA), we identified the causative variant in 20 % of cases. In 10 of them, this result allowed the diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy, whose morphological manifestations were below the resolution of imaging methods. The results were published on European Heart Rhythm Association (EHRA) congress and are a promising basis for further forthcoming publications.

Examination of another large cohort of patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM) allowed 2 studies to be conducted that demonstrated that patients found to have a causative variant in the sarcomeric protein gene did not have a different disease course, response to treatment with alcohol septal ablation, or increased incidence of major complications, including sudden cardiac death, compared with genetically negative patients. Thus, finding a pathogenic variant in HCM patients alone does not warrant a change in therapy or overall patient care. The experience of genetic testing has also led to the development of recommendations for the overall management of HCM patients.

In our cohort of patients with aortic syndromes and systemic connective tissue disease, we identified rare variants that have been used in publications expanding the current knowledge of the causes and manifestations of hereditary aortic dissection (TAAD). In these, the diversity of phenotypic manifestations associated with different types of pathogenic variants in the *LOX* gene and the association of pathogenic variants in the *JAG1* gene with the development of isolated aortic aneurysms were examined.

Key words: cardiogenetics, sudden cardiac death, SCD, cardiomyopathy, arrhythmia, aneurysm, aortopathy

Seznam použitých zkratek

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD	Autosomal dominant, autozomálně dominantní
ADPKD	Autosomal dominant polycystic kidney disease, autozomálně dominantní polycystóza ledvin
BAM	Binary Alignment Map
CES	Clinical Exome Sequencing, sekvenování klinického exomu
CNV	Copy number variation, variabilita počtu kopií
CPVT	Katecholaminergní polymorfní komorová tachykardie
DCM	Dilatační kardiomyopatie
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EDS	Ehlers-Danlosův syndrom
FFPE	Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, Fixace tkáně formalínem a parafínem
HCM	Hypertrofická kardiomyopatie
HPO	Human Phenotype Ontology
LDS	Loeys Dietzův Syndrom
LQT	Long QT syndrome, syndrom dlouhého QT intervalu
MFS	Marfanův syndrom
MPS	Masivní paralelní sekvenování
SCA	Sudden cardiac arrest, náhlá srdeční zástava
SCD	Sudden cardiac death, náhlá srdeční smrt
SIDS	Sudden infant death syndrome, syndrom náhlého úmrtí kojenců
SNP	single-nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus
SQT	Short QT syndrom, syndrom krátkého QT intervalu
STR	Short tandem repeat, krátká repetitivní sekvence
TAAD	Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection, aneurysma a disekce hrudní aorty
VCC	vitium cordis congenitum, vrozená srdeční vada
VCF	Variant Call Format
WES	Whole Exome Sequencing, celoexomové sekvenování
WGS	Whole Genome Sequencing, celogenomové sekvenování

Obsah

1. ÚVOD	11
1.1 KARDIOMYOPATIE.....	12
1.1.1 Hypertrofická kardiomyopatie (HCM, ORPHA:217569)	12
1.1.2 Dilatační kardiomyopatie (DCM, ORPHA:217604).....	13
1.1.3 Arytmogenní kardiomyopatie (ACM, ORPHA:247)	13
1.1.4 Restriktivní kardiomyopatie (RCM, ORPHA:217632).....	13
1.1.5 Nekompaktní kardiomyopatie levé komory (LVNC, ORPHA:54260).....	14
1.2 ARYTMOGENNÍ SYNDROMY	15
1.2.1 Syndrom dlouhého QT intervalu (LQT, ORPHA:768).....	15
1.2.2 Syndrom Brugadových (BrS, ORPHA:130)	16
1.2.3 Katecholaminergní polymorfni komorová tachykardie (CPVT, ORPHA:3286). 16	
1.3 AORTÁLNÍ ANEURYSMA A DISEKCE	18
1.3.1 Marfanův syndrom (MFS, ORPHA:558)	18
1.3.2 Loeys-Dietz syndrom (LDS, ORPHA:60030).....	20
1.3.3 Ehlers-Danlosův syndrom (EDS, ORPHA:98249).....	21
1.3.4 Nedyndromické hereditární aneurysma aorty (TAAD, ORPHA:91387).....	21
1.3.5 Disekce aorty při extrakardiálním onemocnění.....	22
1.4 VROZENÉ SRDEČNÍ VADY (VCC).....	23
1.5 NÁHLÁ SRDEČNÍ SMRT (SCD)	24
1.6 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA DĚDIČNÝCH KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ	26
1.6.1 Masivní paralelní sekvenování (MPS)	26
1.6.2 Sangerovo sekvenování DNA	35
1.6.3 Metoda MLPA	35
1.6.4 Metoda QFPCR.....	36
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	37
3. METODIKA	38
4. VÝSLEDKY, DISKUZE A ODKAZY NA PŘÍLOŽENÉ PUBLIKACE	44
4.1 VOTÝPKA ET AL. (2023) POST-MORTEM GENETIC TESTING IN SUDDEN CARDIAC DEATH AND GENETIC SCREENING OF RELATIVES AT RISK: LESSONS LEARNED FROM A CZECH PILOT MULTIDISCIPLINARY STUDY – PŘÍLOHA 1.....	44
4.2 BONAVENTURA ET AL. (2020) PATIENTS WITH HYPERTROPHIC OBSTRUCTIVE CARDIOMYOPATHY AFTER ALCOHOL SEPTAL ABLATION HAVE FAVORABLE LONG-TERM OUTCOME IRRESPECTIVE OF THEIR GENETIC BACKGROUND – PŘÍLOHA 2	48

4.3 BONAVENTURA ET AL. (2024) RELATIONSHIP BETWEEN GENOTYPE STATUS AND CLINICAL OUTCOME IN HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY – PŘÍLOHA 3.....	49
4.4 BONVENTURA ET AL. (2020) KOMPLEXNÍ PŘÍSTUP K PACIENTŮM S HYPERTROFICKOU KARDIOMYOPATÍÍ A INDIKACE KE GENETICKÉMU VYŠETŘENÍ – PŘÍLOHA 4.....	50
4.5 HROMANÍKOVÁ ET AL. (2022) ZÁCHYT LAMINOPATIE S PŘEVAŽUJÍCÍM POSTIŽENÍM SRDCE V RÁMCI PŘEDTRANSPLANTAČNÍ DIAGNOSTIKY - KAZUISTIKA, ROZBOR RIZIKOVÉ STRATIFIKACE A KARDIOLOGICKÉHO MANAGEMENTU PACIENTŮ S LAMINOPATÍÍ – PŘÍLOHA 5	51
4.6 ISLE VAN GUCHT ET AL. (2021) NOVEL <i>LOX</i> VARIANTS IN FIVE FAMILIES WITH AORTIC/ARTERIAL ANEURYSM AND DISSECTION WITH VARIABLE CONNECTIVE TISSUE FINDINGS – PŘÍLOHA 6.....	52
4.7 JOTTE RODRIGUES BENTO ET AL. (2022) ISOLATED ANEURYSMAL DISEASE AS AN UNDERESTIMATED FINDING IN INDIVIDUALS WITH <i>JAG1</i> PATHOGENIC VARIANTS – PŘÍLOHA 7	54
4.8 ČOPÍKOVÁ ET AL. (2020) EXPANDING THE PHENOTYPE SPECTRUM ASSOCIATED WITH PATHOGENIC VARIANTS IN THE <i>COL2A1</i> AND <i>COL11A1</i> GENES – PŘÍLOHA 8	55
4.9 BRUNEROVÁ ET AL. (2023) CASE REPORT: TWO HETEROZYGOUS PATHOGENIC VARIANTS OF <i>CYP24A1</i> : A NOVEL CAUSE OF HYPERCALCEMIA AND NEPHROCALCINOSIS IN ADULTHOOD – PŘÍLOHA 9	56
4.10 KREBISOVÁ ET AL. (2023) GENETICKÉ VYŠETŘENÍ V KARDIOLOGII: SOUHRNNÉ VYJÁDŘENÍ A DOPORUČENÍ ODBORNÍKŮ PRACOVNÍ SKUPINY KARDIOGENETIKY PŘI ČAPK/ČKS, SLG A ČSSL A ST PŘI ČLS JEP – PŘÍLOHA 10	57
5. ZÁVĚR	58
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	62

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění jsou spolu s onkologickými chorobami hlavní příčinou úmrtí nejen v České republice, ale v celém vyspělém světě. Na celkové úmrtnosti v ČR se podílejí přibližně ze 40 %, přičemž hlavní část těchto onemocnění je multifaktoriální, zahrnující vysoký krevní tlak, ischemické srdeční změny, aterosklerózu a jiné. Existuje však celá řada dědičných monogenních kardiovaskulárních onemocnění, které lze dnes s využitím moderních laboratorních metod poměrně snadno detekovat na molekulární úrovni. Přispívá k tomu skutečnost, že převážná většina těchto onemocnění je děděna autozomálně dominantně (AD) a detekce jediné příčinné varianty může vést k určení molekulární podstaty onemocnění. Tento typ dědičnosti je také příčinou opakovaného výskytu těchto kardiologických onemocnění v rodinách, přičemž riziko onemocnění je u prvostupňových příbuzných 50 %. Je tak nutné vždy provádět důkladnou segreganční analýzu u relevantních příbuzných (Zeppenfeld et al. 2022, Arbelo et al. 2023).

Takovými onemocněními jsou především dědičná onemocnění srdečního svalu – kardiomyopatie, dále arytmogenní syndromy a aortopatie. Dosud byly identifikovány stovky kauzálních i kandidátních genů, jejichž varianty jsou více či méně jasně prokázanou příčinou těchto hereditárních onemocnění. Většinou se jedná o bodové varianty typu missense, kdy záměna jedné aminokyseliny v polypeptidovém řetězci vede k narušení funkce daného proteinu. Případně o krátké trunkující (tj. „protein zkracující“) varianty, které vedou ke ztrátě funkce genu (loss-of-function). Poměrně často se setkáváme také s kauzálními variantami, které narušují oblasti sestřihu exonů/intronů. Naopak, pouze v malém procentu případů detekujeme rozsáhlejší delece či duplikace, které zasahují více, než jeden exon v daném genu. Velké množství známých „kardiogenů“ je důvodem, proč je diagnostickou metodou první volby masivní paralelní sekvenování s využitím širokého panelu vyšetřovaných genů, případně stále více používané exomové či celogenomové sekvenování. Výrazný rozvoj v rozkrývání genetického pozadí těchto onemocnění však také klade velké nároky na laboratorní pracovníky. Je vyžadována nejen znalost molekulární podstaty jednotlivých onemocnění, ale molekulární genetik se stává do jisté míry i bioinformatikem a právě znalost a správné využití bioinformatických nástrojů pro filtraci, anotaci a prioritizaci zachycených variant často rozhoduje o vydání správné genetické diagnózy.

1.1 Kardiomyopatie

Srdeční sval je tvořen buňkami cylindrického tvaru – kardiomyocyty, které jsou vzájemně propojeny tzv. interkalárními disky. Interkalární disky jsou typem mezibuněčného spojení, které obsahuje pevné spojení – desmozomy a dále tzv. gap junctions, které umožňují výměnu iontů mezi jednotlivými kardiomyocyty a umožňují tak rychlé vedení vzruchu celým svalem. Kardiomyocyty obsahují 1-2 buněčná jádra, velké množství mitochondrií a jsou vyplněny myofibrilami, které se skládají ze sarkomer a jsou zodpovědné za kontraktilní schopnost srdeční svaloviny. Právě varianty některého z genů pro sarkomerické či desmozomální proteiny jsou nejčastější příčinou kardiomyopatie. Vlivem vadného proteinu je porušena správná kontraktilní schopnost kardiomyocytu a srdce je tak nedostatečně plněno krví či je naopak krev nedostatečně vypuzována, což ve finálním stádiu vede až k srdečnímu selhání či tvorbě maligní arytmie. Léčba kardiomyopatií je symptomatická a často se zaměřuje na prevenci život ohrožujících arytmii. Zahrnuje katetrizační ablaci, kardioverter-defibrilátor (ICD) a v nejzávažším případě i transplantaci srdce. Podle genetické etiologie a následného klinického projevu rozlišujeme několik forem kardiomyopatie (Ripa et al. 2023, Priori et al. 2015, Charron et al. 2010).

1.1.1 Hypertrofická kardiomyopatie (HCM, ORPHA:217569)

Nejčastější typ kardiomyopatie, která se v obecné populaci vyskytuje ve frekvenci přibližně 1: 500. Projevuje se zbytněním svaloviny srdečních komor, což vede k problémům s plněním srdce krví. Vzniká tlak, který z obou komor následně přechází i do plicního oběhu, kde vede k výrazným klinickým projevům. Primární HCM je nutné odlišit od sekundární choroby vyvolané například plicní hypertenzní nemocí či zbytněním srdce, které vzniká jako následek stádavého onemocnění (např. při Fabryho chorobě) (Macron et al. 2002). Při hypertrofii srdeční se zaměřujeme především na geny kódující složky sarkomery – např. gen pro těžký řetězec meromyosinu (*MYH7*; MIM:160760). Pro gen *MYH7* jsou typické patogenní varianty typu missense, zatímco loss-of-function varianty typu nonsense či frameshift jsou prokázanou příčinou HCM jen zřídka. Dalším genem důležitým pro molekulární diagnostiku HCM je myosin-vázající protein C (*MYBPC3*; MIM:600958), pro nějž jsou naopak typické patogenní varianty typu nonsense a frameshift. Zajímavostí u tohoto genu je poměrně velké množství patogenních

intronových variant, z nichž jedna byla detekována i v rámci naší pilotní studie jako příčina náhlé srdeční smrti v ČR.

1.1.2 Dilatační kardiomyopatie (DCM, ORPHA:217604)

Patří rovněž mezi velmi časté typy kardiomyopatie a vyskytuje se mnohem častěji u mužů než u žen. Při této kardiomyopatii dochází k roztažení (dilataci) srdečních oddílů, především pak levé komory. Následkem toho je nedostatečná funkce srdce coby pumpy a vznik dušnosti, otoků dolních končetin, únavy až srdečního selhání (Schultheiss et al. 2019). Při podezření na dilatační kardiomyopatii se zaměřujeme především na gen pro titin (*TTN*, MIM:188840) či gen pro filamin C (*FLNC*, MIM:102565). Patogenní varianty v genu *TTN* jsou příčinou nejen autozomálně dominantních kardiomyopatií, ale také autozomálně recesivní muskulární dystrofie. Při molekulární diagnostice DCM je tak nutné u detekované varianty posuzovat nejen typ varianty, ale také její umístění v rámci tohoto obrovského genu. V detekci variant se zaměřujeme na varianty typu nonsense, frameshift a sestřihové varianty, naopak varianty typu missense nemají v detekci DCM zásadní vliv a vzhledem k rozsahu genu je nacházíme u velké části populace.

1.1.3 Arytmogenní kardiomyopatie (ACM, ORPHA:247)

Při této formě kardiomyopatie je postupně srdeční svalovina nahrazována tukovou a vazivovou tkání. Nejčastěji bývá touto změnou postižena pravá srdeční komora. Právě arytmogenní kardiomyopatie je velice zrádné onemocnění, které nemusí svého nositele nijak fyzicky omezovat a jeho prvním projevem může být náhlá srdeční smrt například při sportu (van der Voorn et al. 2020). Mezi nejčastěji postižené geny patří gen *FLNC* (MIM:102565), *DSC2* (MIM:125645), *TMEM43* (MIM:612048) či *TGFB3* (MIM:190230).

1.1.4 Restriktivní kardiomyopatie (RCM, ORPHA:217632)

Zvláštní typ kardiomyopatie, která kombinuje obě mechanické poruchy srdce – poruchu plnění i poruchu vyprazdňování. Tento závažný stav je nejčastěji způsoben ukládáním abnormální bílkoviny (amyloidu) do srdeční stěny. Mezi asociované geny patří *TNNI3* (MIM:191044), *MYPN* (MIM:608517) či *FLNC* (MIM:102565).

1.1.5 Nekompaktní kardiomyopatie levé komory (LVNC, ORPHA:54260)

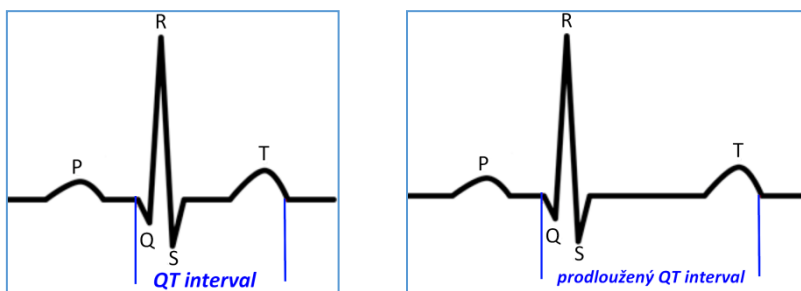
Poměrně vzácný typ kardiomyopatie, který se projevuje srdečním selháváním a komorovými arytmiemi. Morfologicky se projevuje tzv. trabekulizací svaloviny komory s hlubokými recesy, komunikujícími se srdeční dutinou a je rovněž často spojena s různými dalšími vrozenými srdečními vadami. Mezi geny asociované s LVNC patří například *DTNA* (MIM:601239), *LDB3* (MIM:605906), *TPMI* (MIM:191010) či *ACTN2* (MIM:102573). Dosud neexistují obecně uznávaná diagnostická kritéria pro LVNC. Některé skupiny odborníků ji dokonce odmítají uznat jako samostatný typ kardiomyopatie. Argumentují tím, že se spíše jedná o variantu dilatační kardiomyopatie nebo o soubor morfologických projevů způsobených jiným onemocněním (Gerecke et al. 2021, Arbelo et al. 2023).

1.2 Arytmogenní syndromy

Arytmogenní syndromy jsou velmi zrádné, jelikož se nejčastěji neprojevují žádnou morfológickou abnormalitou srdce a nemusí být v některých případech ani detekovatelné na klasickém EKG. Mezi nejčastější patří syndrom tzv. dlouhého QT intervalu – Long QT syndrom, kde varianty v genech pro draslíkové nebo sodíkové kanály v myokardu způsobují prodloužení repolarizace s rizikem vzniku časných depolarizací, které mohou zdegenerovat do komorové fibrilace. Dalším onemocněním je katecholaminergní polymorfni komorová tachykardie (CPVT), kde dysfunkce kalciových kanálů v sarkoplasmatickém retikulu vede ke zvýšení intracelulárního kalcia a vzniku polymorfni komorové tachykardie. Nemoc se může projevovat bušením srdce, závratí či náhlými krátkými ztrátami vědomí (synkopami). Její projevy však nemusí být výrazné a často je tak příčinou náhlé srdeční smrti, přičemž skutečnou příčinu úmrtí nedokáže odhalit ani následná pitva. Ke stanovení správné diagnózy může přispět i informace, za jakých okolností dochází k výrazným projevům, případně při kterých došlo k srdeční zástavě. Bylo totiž zjištěno, že manifestace některých arytmogenních onemocnění je spojena nejen se specifickou fyzickou aktivitou (např. riziko srdeční zástavy při plavání u některých typů LQT) či stresem (tachykardie při CPVT), ale dokonce s denní dobou (srdeční zástavy ve spánku při BrS) (Delisle et al. 2021).

1.2.1 Syndrom dlouhého QT intervalu (LQT, ORPHA:768)

Geneticky heterogenní skupina arytmogenních onemocnění, jejichž klinická diagnostika spočívá v abnormálním nálezu na EKG, na kterém nacházíme prodloužení tzv. QT intervalu, případně abnormality v T vlně, která reprezentuje repolarizaci komorového myokardu (Obr.1). Syndrom LQT může být dědičný i získaný. Mezi dědičné patří zejména typy LQT 1-5, které vznikají na základě patogenní varianty v genu pro některou z podjednotek iontových kanálů srdečního svalu - *KCNQ1* (MIM:607542), *KCNH2* (MIM:152427), *SCN5A* (MIM:600163), *ANK2* (MIM:106410) a *KCNE1* (MIM:176261). Může být však také součástí Timothyho syndromu (ORPHA:65283), který mimo srdce postihuje i další orgány, a který je způsoben patogenními variantami v genu *CACNA1C* (MIM:114205) (Groffen et al. 2003, Fujii et al. 2017)



Obr.1 Schematické znázornění normálního a prodlouženého QT intervalu na křivce EKG

1.2.2 Syndrom Brugadaových (BrS, ORPHA:130)

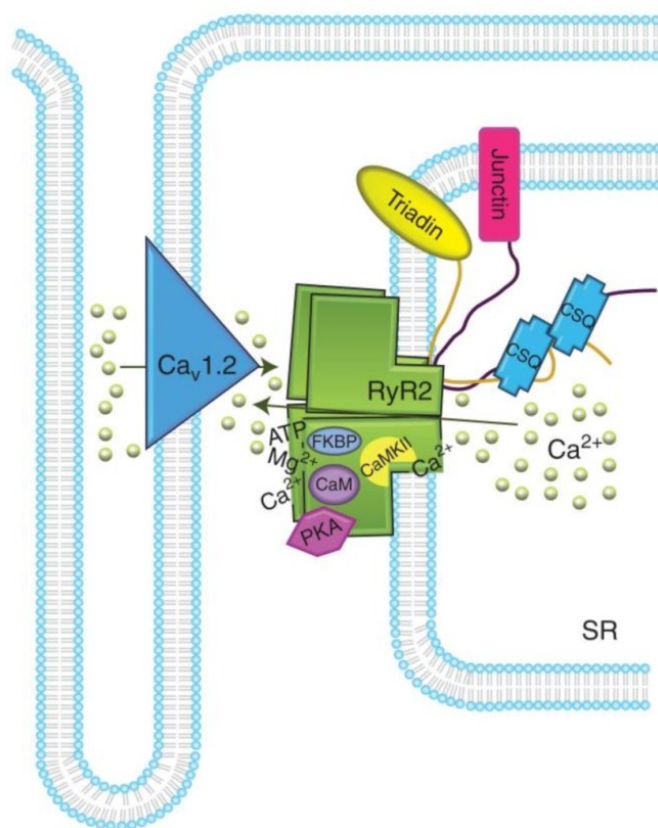
Tento poměrně vzácný syndrom, který vede ke vzniku život ohrožujících komorových arytmií, často nelze na klidovém EKG spolehlivě zachytit. Proto se při podezření na BrS používá tzv. provokační ajmalinový test s cílem vyvolat pomocí léčiva odpověď organismu v podobě pro onemocnění typické elektrokardiografické křivky. Projevuje se převážně v dospělém věku, průměrná doba náhlé srdeční smrti pacientů s neléčeným syndromem je přibližně 40 let. Manifestace v dětství však není výjimkou, přičemž jsou popsány i případy, kde tento syndrom byl příčinou náhlého úmrtí v kojeneckém věku (SIDS - Sudden infant death syndrome). Onemocnění postihuje častěji muže, což může být způsobeno rozdílnou hladinou pohlavních hormonů, tato teorie však nebyla dosud potvrzena. Dodnes bylo s onemocněním asociováno až 43 genů. Zásadní je však testování genu pro sodíkový kanál *SCN5A* (MIM:600163), jehož patogenní varianty jsou příčinou naprosté většiny dosud identifikovaných případů BrS (Brugada et al. 2005, Wilde et al. 2022).

1.2.3 Katecholaminergní polymorfní komorová tachykardie (CPVT, ORPHA:3286)

Arytmogenní onemocnění, pro něž jsou typické četné synkopy v průběhu cvičení či emočního rozrušení, je způsobeno nástupem rychlé ventrikulární tachykardie. Ta může sama vymizet, nebo může vést k rozvoji ventrikulární fibrilace, která je příčinou srdeční zástavy a náhlé srdeční smrti. Průměrně se první příznaky objeví v dětském věku (mezi 7. až 12. rokem života). Příčinou jsou nefunkční vápníkové kanály, které zprostředkovávají uvolňování vápenatých iontů ze sarkoplazmatického retikula do cytosolu, a tím hrají klíčovou roli při kontrakci srdečního svalu. Toto uvolňování je zprostředkováno iontovými kanály typu RyR (ryanodinové receptory). U savců rozlišujeme 3 typy (RyR 1-3), přičemž pro diagnostiku CPVT má význam detekce patogenních variant v genu *RYR2*

(MIM:180902), který kóduje protein druhého ryanodinového receptoru (Lanner et al. 2010, Obr. 2).

V genu *RYR2* bylo dosud popsáno přes 300 patogenních a pravděpodobně patogenních variant typu missense. Tento typ varianty je tak nejčastějším mechanismem v rozvoji CPVT, přičemž patogenní variantu nacházíme přibližně u 65 % případů. Je pozoruhodné, že delece v genu *RYR2*, který je tradičně spojován pouze s CPVT, jsou detekovány u pacientů, u nichž se postupem času rozvine i jiné srdeční onemocnění – LVNC. Zdá se tak, že delece v tomto genu vedou k závažnější formě, která se může ve fenotypu projevit kombinací obou typů onemocnění (Campbell et al. 2015)



Obr. 2 Znárodnění vápníkového kanálu RyR2 v myokardu

Převzato z Lanner et al. 2010

1.3 Aortální aneurysma a disekce

Disekce aorty, která vzniká na základě aneurysmatu, je náhlá cévní příhoda, která má dramatický průběh a pokud není ihned intenzivně řešena, velmi často končí smrtí nemocného. I přes neustálé zlepšování diagnostiky a léčby se aortální disekce podílejí na celkové úmrtnosti obyvatel přibližně z 1-2 %. Pokud z příčin vyloučíme kombinaci aterosklerózy a hypertenze, může se disekce aorty objevit jako významná komplikace některého systémového onemocnění pojiva - Marfanova syndromu, Loeys-Dietzova syndromu či Ehlers-Danlosova syndromu. Může se však projevit jako samostatná klinická jednotka bez jiných systémových projevů (nesyndromická hereditární TAAD - thoracic aortic aneurysms and aortic dissections). V neposlední řadě se může dilatace/disekce aorty projevit u pacienta jako vedlejší projev jiného systémového onemocnění (Alportův syndrom, polycystóza ledvin, Alagillův syndrom apod.). Z genetického hlediska nás tak nejvíce zajímají geny pro pojivové tkáně jako je fibrilin 1 a fibrilin 2, různé formy kolagenu a receptory pro transformující růstové faktory. (Ostberg et al. 2020, Verhagen et al. 2018). Už z výčtu možných příčin aortální disekce vyplývá, že samotná filtrace variant v rámci masivního paralelního sekvenování je výrazně náročnější, než je tomu u kardiomyopatií či arytmogenních syndromů. Je to dáno především překryvem klinických projevů u jednotlivých onemocnění, ale také rozdílnou penetrancí a expresivitou klinických projevů onemocnění. Dosud bylo s rozvojem aortální disekce asociováno více než 30 genů, přesto je celková výtěžnost genetického vyšetření často pod hodnotou 20 %, u některých skupin onemocnění dokonce kolem 10 % (Gentilini et al. 2019, Milewicz et al. 2021).

1.3.1 Marfanův syndrom (MFS, ORPHA:558)

Marfanův syndrom je nejznámější a nejprozkoumanější zástupce systémových onemocnění pojivové tkáně, které postihuje přibližně 1 z 5000 osob v obecné populaci. Fenotypové projevy tohoto onemocnění mohou být velmi variabilní od tzv. marfanoidních rysů až po závažná a rychle progradující multiorgánová postižení, která se projeví již v neonatálním období. Mezi nejvíce postižené systémy těla patří oči, kostra a kardiovaskulární systém. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění, za které je zodpovědný nefunkční gen *FBNI* (MIM:134797) lokalizovaný na chromozomu 15. Dosud bylo do databáze ClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) nahlášeno více než 3 tisíce patogenních a pravděpodobně patogenních variant v genu *FBNI*. Přibližně v 75 % případů

zdědí postižený defektní alelu od jednoho svého rodiče a u 25 % případů patogenní varianta vznikne *de novo* (Dietz et al. 2001, Loeys et al. 2010).

Gen *FBNI* kóduje velký glykoprotein fibrilin-1, který je významnou součástí extracelulární matrix. V ní tvoří mikrofibrily o průměru 10-14 nm, které plní řadu funkcí včetně opory pro ukládání tropoelastinu za vzniku elastických vláken. Fibrilinové mikrofibrily jsou klíčové především pro strukturální integritu stěny aorty a závěsného aparátu čočky. Proto jsou dilatace aorty a vychýlení čočky (tzv.ectopia lentis) v rámci klinické diagnostiky syndromu zásadní. Pro diagnostiku Marfanova syndromu byla zavedena tzv. Ghentská kritéria (revidovaná v roce 2010, Tabulka 1), která zahrnují soubor hlavních a vedlejších projevů onemocnění v různých tělesných systémech (Dietz et al. 1995, Loeys et al. 2010, Sakai et al. 2016).

Tab. 1 Hodnocení klinických projevů MFS podle Ghentských kritérií (Převzato a upraveno z webu Marfanek.cz)

Hlavní znaky	
Dilatace aorty – rozšíření, zvětšení, roztažení kořene aorty / disekce aorty – náhlá cévní příhoda postihující stěnu aorty, při níž dojde k odtržení vnitřní části stěny od zbytku	
Ectopia lentis – dislokace oční čočky díky vadnému fixačnímu aparátu čočky. Porucha, při níž se oční čočka nachází v nesprávném místě. Řeší se chirurgicky navrácením čočky do její správné polohy	
Vedlejší znaky	Počet bodů
Příznak palce a zápěstí: palec přesahující ulnární okraj ruky při prstech sevřených v pěst, při obejmutí zápěstí palec přesahuje ukazovák	3
Hrudník – ptačí vypouklý hrudník, hrudní kost vysunuta dopředu nebo nálevkovitý vpáčený hrudník, prohloubení hrudníku do tvaru misky	2
Deformity chodidla, např. ploché nohy	2
Pneumotorax - nahromadění vzduchu v pleurální dutině. Pleurální dutina je uzavřený prostor obklopující plíce, je ohraničený nástěnnou a plicní pleurou a je v něm podtlak.	2
Durální ektázie - rozšíření duralového vaku kolem míchy	2
Protruze acetabula	2
Poměr rozpětí rukou / výška (nad 1.05) a US/LS (pod 0.85)	1
Snížená extenze v lokti	1
3 z 5 znaků na lebce	1
Kožní strie	1
Krátkozrakost (myopie) - více než 3 dioptrie	1
Prolaps mitrální chlopně	1

Při vyhodnocení Ghentských kritérií pro diagnózu Marfanova syndromu záleží na tom, zda byl Marfanův syndrom již dříve diagnostikován v rodině vyšetřovaného a dle toho posuzujeme dále (převzato a upraveno z webu Marfanek.cz):

1) Marfanův syndrom **není přítomen v rodinné anamnéze:**

- Dilatace aorty + ektopie oční čočky = Marfanův syndrom
- Dilatace aorty + skóre nad 7 = Marfanův syndrom
- Dilatace aorty + patogenní varianta ve *FNBI* = Marfanův syndrom

2) Marfanův syndrom **je přítomen v rodinné anamnéze:**

- Ektopie oční čočky = Marfanův syndrom
- Skóre nad 7 = Marfanův syndrom
- Dilatace aorty = Marfanův syndrom

1.3.2 Loeys-Dietz syndrom (LDS, ORPHA:60030)

Syndrom, který byl objeven a charakterizován Bartem Loeysem and Harry Dietzem v roce 2005, dnes tvoří, spolu s Marfanovým a Ehlers-Danlovým syndromem, základní skupinu onemocnění, na které cílíme při molekulárně genetickém vyšetření příčin aortální disekce s projevy systémových poruch pojivové tkáně. Velká část příznaků je u pacientů s LDS shodná s Marfanovým syndromem, což může ztížit diagnostiku onemocnění a při genetickém testování je nutné zaměřit se na geny asociované s oběma syndromy. Mezi shodné symptomy patří např. dilatace a aneurysma ascendentní aorty, bikuspidální aortální chlopeč, prolaps mitrální chlopně, kloubní hypermobilita, abnormálně dlouhé končetiny a prsty, deformity chodidel či hrudníku. Naopak některé méně časté symptomy přítomné pouze u LDS, jako např. hypertelorismus, rozštěp patra, kraniosynostóza či některé poruchy nervového systému mohou pomoci v diferenciální diagnostice onemocnění. Pro syndrom je typický agresivnější průběh postižení aorty, než je tomu u MFS, který neléčený vede velmi brzy k úmrtí. Průměrný věk dožití je tak přibližně 26 let (Loeys et al. 2006).

Rozlišujeme 5 typů syndromu (LDS I-V), z nichž každý je způsoben patogenní (převážně missense či trunkující) variantou v jednom ze skupiny genů kódující transformující růstové faktory, které hrají zásadní roli v buněčné signalizaci podporující růst a vývoj tělesných tkání. Jedná se o geny *TGFBR1* (MIM:190181), *TGFBR2* (MIM:190182), *SMAD3* (MIM:603109), *TGFB2* (MIM:190220) a *TGFB3* (MIM:190230).

Syndrom se dědí autozomálně dominantně. Zajímavostí je, že na rozdíl od MFS není asi v 75 % detekovaných případů varianta zděděna od žádného z rodičů a vzniká tzv. *de novo*. (Loeys et al. 2008).

1.3.3 Ehlers-Danlosův syndrom (EDS, ORPHA:98249)

Ehlers-Danlosův syndrom je heterogenní skupina onemocnění, které postihuje pojivovou tkáň celého těla. U tzv. klasické formy EDS jsou převládajícími příznaky hyperelastická kůže, kloubní hypermobilita a různé skeletální deformity. Kardiologické symptomy zahrnují dilataci kořene aorty či prolaps mitrální chlopně. S rupturou aorty se však u klasické formy EDS setkáváme pouze zřídka. Genetickou příčinou onemocnění jsou převážně patogenní varianty v genech *COL1A1* (MIM:120150), *COL5A1* (MIM:120215) či *COL5A2* (MIM:120190). I zde hrají zásadní roli bodové varianty. Rozsáhlé delece či duplikace jsou prokázanou příčinou onemocnění přibližně jen u 1 % případů. I když se setkáváme především s AD formou dědičnosti, syndrom může být způsoben i kombinací 2 variant v genech s autozomálně recesivním typem dědičnosti. Především se jedná o geny *TNXB* (MIM:600985) a *FKBP14* (MIM:614505). Naopak vaskulární forma EDS je častou příčinou nejen ruptury aorty, ale dokonce ruptury celých orgánů, především střev či dělohy v průběhu těhotenství. Kvůli často mírným celkovým příznakům, které mohou zahrnovat kloubní hypermobilitu, tenkou kůži či snadnou tvorbu modřin, je většina pacientů zachycena pouze díky familiárnímu screeningu v postižených rodinách, kde byla již dříve detekována patogenní varianta v genu *COL3A1* (MIM:120180). Varianty v tomto genu tak mohou být příčinou neočekávané aortální ruptury vedoucí ke smrti postiženého a diagnóza vaskulárního typu EDS tak často může být stanovena až *post mortem* na základě tzv. molekulární pitvy (Byers et al. 1999, Malfait et al. 2007).

1.3.4 Nedyndromické hereditární aneurysma aorty (TAAD, ORPHA:91387)

V případě rodiny s opakovaným výskytem aortálních disekcí bez dalších významných symptomů, je třeba pomýšlet nad vyšetřením genů pro nesyndromickou formu hereditární TAAD. Mezi geny, které bychom měli vyšetřit, patří především *ACTA2* (MIM:102620), *MYH11* (MIM:160745), *MYLK* (MIM:600922), *PRKG1* (MIM:176894), *LOX* (MIM:153455), *FOXE3* (MIM:601094) a *MAT2A* (MIM: 601468). Bylo však zjištěno, že patogenní varianty ve výše popsaných genech pro Marfanův či Loeys-Dietzův syndrom se mohou v některých případech projevit izolovanou formou aortálního

aneurysmatu (Milewicz et al. 2021, Ostberg et al. 2020). Nové studie naznačují také výskyt izolované formy aneurysmatu aorty, která je způsobena patogenní variantou v některém z genů, který byl dosud spojen s jiným extrakardiálním onemocněním. Např. varianty v genu *JAG1* (MIM:601920), který je tradičně asociován s rozvojem Alagillova syndromu (ORPHA:52), byly nedávno identifikovány jako příčina izolovaného aneurysmatu aorty (Bento et al. 2022).

1.3.5 Disekce aorty při extrakardiálním onemocnění

S postižením aorty se setkáváme i u řady onemocnění, které primárně postihují jiné orgány, především ledviny. Srdeční či cévní komplikace jsou až v 50 % příčinou úmrtí u pacientů s autozomálně dominantní polycystózou ledvin (ADPKD, ORPHA:730). Mezi symptomy nejvíce pozorované u těchto pacientů patří prolaps mitrální chlopně (až u 26 % případů) a intrakraniální aneurysma (přibližně u 10 % případů). Často se také setkáváme s arteriální hypertenzí či ischemickou chorobou srdeční. Samotná výše rizika pro vznik aneurysmatu a disekce aorty u ADPKD však zůstává poměrně nejasná. U provedených studií se toto riziko výrazně liší a je uváděno mezi 1 % - 10 % (Inaba et al. 2021). I přes nedostatek studií k jasnému pochopení spojitosti mezi ADPKD a aortální disekcí, je toto onemocnění jednoznačně rizikovým faktorem a při stanovení klinické či genetické diagnózy by pacient s ADPKD měl být klinicky sledován kvůli riziku disekce (Hassane et al. 2007, Rahman et al. 2009, Silverio et al. 2015).

Také u některých forem Alportova syndromu (ORPHA:63) je pozorován zvýšený výskyt disekcí aorty. Jedná se především o muže, kteří jsou nositeli X-vázané formy onemocnění způsobené patogenní variantou v genu *COL4A5* (MIM:303630). Kolagen typu IV je důležitou součástí bazálních membrán a geny pro kolagen typu IV zahrnují šest odlišných lokusů, které kódují řetězce kolagenu $\alpha 1(\text{IV})$ – $\alpha 6(\text{IV})$. Tyto řetězce se sdružují za vzniku trimerních molekul, které se organizují do sítí bazálních membrán. Tyto kolageny v bazálních membránách endotelu a hladkého svalstva intimy a medie hrají zásadní roli v integritě cévní stěny. Předpokládá se, že porucha struktury kolagenů typu IV v aortální stěně je mechanismem, který u pacientů s Alportovým syndromem způsobuje zvýšený výskyt aneurysmat (Kamiar et al. 2023, Kashtan et al. 2010).

1.4 Vrozené srdeční vady (VCC)

Toto poměrně časté vrozené onemocnění postihuje přibližně 1 % všech živě narozených dětí. Velké množství vrozených vad srdce je odhaleno již v porodnici či ve velmi nízkém věku dítěte vzhledem k výrazné cyanóze způsobené nedostatečným prokrvením tkání, a také specifickým projevům v rámci srdečního poslechu pediatrem. Kvalitní prenatální ultrazvuková diagnostika navíc umožňuje až polovinu vrozených srdečních vad diagnostikovat již prenatálně (Tomek et al. 2018, Sun et al. 2021). Mezi nejčastější srdeční vady patří defekty komor a síní, dále se jedná o chlopenní vady či stenózy a jiné vady aorty. Samostatné postavení mezi VCC má tzv. Fallotova tetralogie (ORPHA:3303). Jedná se o komplexní vadu, která postihuje přibližně 3 z 10,000 narozených dětí a která vyžaduje rychlé kardiochirurgické řešení. Kombinuje čtyři abnormality srdce a cév - defekt komorového septa, dextropozici aorty, stenózu plicnice a hypertrofii pravé srdeční komory (Althali et al. 2022).

Příčiny vrozených srdečních vad lze rozdělit na genetické a negenetické. Geneticky podmíněné srdeční vady mohou být součástí komplexních syndromů postihujících mimo srdce i další tělesné orgány - např. Downův syndrom (ORPHA:870) způsobený trizomií chromozomu 21, DiGeorgův syndrom (ORPHA:567) způsobený delecí oblasti 22q11.2 či CHARGE syndrom (ORPHA:138) způsobený převážně bodovými variantami v genu *CHD7* (MIM:608892). Vrozené srdeční vady se však mohou projevit i izolovaně. Tabulka 2 ukazuje přehled základních genů, na které bychom se při vyšetření izolovaných srdečních vad měli zaměřit.

Tab. 2 Geny nejčastěji asociované s nesyndromickou VCC

Gen	OMIM	Typ srdeční vady
<i>NKX2-5</i>	600584	Defekt síňového či komorového septa, Fallotova tetralogie, syndrom hypoplastického levého srdce
<i>GATA4</i>	600576	Defekt síňového či komorového septa, Fallotova tetralogie
<i>GATA5</i>	611496	Defekt síňového či komorového septa, Fallotova tetralogie, BAV, Dvouvývodová pravá komora
<i>GATA6</i>	601656	Defekt atrioventrikulárního septa, přetrvávající truncus arteriosus, Fallotova tetralogie
<i>MYH6</i>	160710	Defekt síňového septa
<i>CRELD1</i>	607170	Defekt atrioventrikulárního septa, heterotaxe
<i>NOTCH1</i>	190198	Bikuspidální aortální chlopeč, kalcifikace chlopní

1.5 Náhlá srdeční smrt (SCD)

Všechny výše popsané diagnózy mohou při absenci včasné diagnostiky a léčby vést k náhlé srdeční smrti. Náhlou srdeční smrt (SCD - z anglického Sudden Cardiac Death) můžeme definovat jako smrt vlivem srdeční zástavy, která nastává do jedné hodiny od vypuknutí prvních symptomů, přičemž zemřelý byl předchozích 24 hodin viděn živ a zdrav. Příčin, které k SCD vedou, je známo velké množství. Přibližně v polovině případů se předpokládá vliv dědičného onemocnění srdce a cév. Celosvětově je incidence SCD každý rok uváděna mezi 1-3 osobami na 100,000 jedinců ve věku od 1 do 40 let. Do těchto statistik je však započítáváno také velké množství úmrtí na onemocnění koronárních cév i úmrtí způsobená zánětem srdečního svalu – myokarditidou (Goldstein et al. 1982, Stiles et al. 2021, Basso et al. 2017).

Příčiny SCD, které nás zajímají z genetického hlediska, dnes můžeme rozlišit do dvou velkých skupin. První skupina zahrnuje případy, kdy se při pitvě prokáže strukturní abnormalita srdce nebo cév a do této skupiny patří velká skupina kardiomyopatií, různé vrozené vývojové vady srdce a dilatace aorty vedoucí k disekci a následně ke smrti pacienta. Druhou velkou skupinou jsou tzv. pitevně-negativní případy, kdy v průběhu pitvy není identifikována příčina smrti a současně je vyloučena příčina extrakardiální. Zahrnuje řadu poruch elektrické vodivosti, které vedou ke vzniku maligní arytmie. Mezi ty nejčastější patří syndrom dlouhého/krátkého QT intervalu (LQT/SQT), Brugada syndrom (BrS) či katecholaminergní polymorfní komorová tachykardie (CPVT). Podle výsledné pitevní diagnózy rozdělujeme případy SCD do 7 skupin, které jsou uvedeny v tabulce 3.

Náhlá srdeční smrt může být často prvním symptomem, kterým se onemocnění projeví, a vzhledem k tomu, že SCD může postihnout právě osoby v produktivním věku, klade extrémní psychosociální nároky na rodinu a okolí oběti. Z toho důvodu by multidisciplinární tým pro vyšetřování SCD měl zahrnovat nejen klinické kardiology, soudní lékaře, specializované molekulární genetiky, ale v ideálním případě také psychology a sociální pracovníky. Z genetického hlediska je velice důležité, že většina onemocnění vedoucích k SCD je autozomálně dominantně dědičná. Proto je zde velké nebezpečí opakování úmrtí v rámci jedné rodiny a šance na zdědění patogenní alely je u prvostupňových příbuzných 50 % a to bez ohledu na pohlaví. Pouze malé množství dědičných onemocnění srdce vedoucích k SCD u osob starších 1 roku, je dědičná autozomálně recesivně či gonozomálně.

Tab. 3 Rozdělení případů SCD podle pitevní diagnózy

Pitevní diagnóza:	Definice:
SADS - sudden arrhythmic death syndrome	Nevyjasněné úmrtí osoby ve věku 1-50 let, kdy patologické ani toxikologické vyšetření nedokázalo určit přesnou příčinu smrti = pitevně negativní nevyjasněné úmrtí; diagnóza může být stanovena na základě genetického vyšetření
SUD(S) - sudden unexplained death (syndrome)	Nevyjasněné úmrtí osoby ve věku 1-50, kdy při pitvě byly zjištěny nespecifické strukturální změny srdce, které však neumožňují stanovit diagnózu kardiomyopatie. Genetické vyšetření zde slouží pro potvrzení či upřesnění nespecifického nálezu.
SUDI - sudden unexplained death in infancy	Nevyjasněné úmrtí osoby mladší 1 roku, kdy při pitvě byly zjištěny nespecifické strukturální změny srdce, které však neumožňují stanovit diagnózu kardiomyopatie. Genetické vyšetření zde slouží pro potvrzení či upřesnění nespecifického nálezu.
SUDEP - sudden unexpected death in epilepsy	Náhlé úmrtí osoby se známou diagnózou epilepsie, kdy byly <i>post mortem</i> vyloučeny známky traumatu a patologické ani toxikologické vyšetření nedokázalo určit přesnou příčinu smrti. Genetické vyšetření zde slouží pro potvrzení patogenní varianty v genech asociovaných s epilepsií či případnému určení jiné genetické diagnózy.
SIDS - sudden infant death syndrome	Nevyjasněné úmrtí osoby mladší 1 roku, kdy patologické ani toxikologické vyšetření nedokázalo určit přesnou příčinu smrti = pitevně negativní nevyjasněné úmrtí; diagnóza může být stanovena na základě genetického vyšetření
Kardiomyopatie (HCM, DCM, ACM, LVNC)	Při pitvě byly zjištěny strukturální změny srdce, které splňují kritéria pro stanovení diagnózy kardiomyopatie. Tento nález může být potvrzen či upřesněn pomocí genetického vyšetření. Věk pro genetické testování není v tomto případě omezen.
Akutní disekce aorty / spontánní disekce koronární cévy	Při pitvě byla zjištěna cévní ruptura, která byla přímou příčinou úmrtí. Tento nález může být potvrzen či upřesněn pomocí genetického vyšetření. Věk pro genetické testování není v tomto případě omezen.

Převzato a upraveno z Basso et al. 2017 a Wilde et al. 2022

1.6 Molekulárně genetická diagnostika dědičných kardiovaskulárních onemocnění

Laboratorní diagnostika dědičných kardiovaskulárních onemocnění se dnes především opírá o přímou detekci patogenních germinálních variant metodou masivního paralelního sekvenování (MPS). Metoda je ve většině případů dostačující vzhledem k přítomnosti malých nukleotidových záměn (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) či delecí/inzercí malého rozsahu. Zásadní roli zde sehrává celoexomové sekvenování, které umožňuje vyšetření kódujících oblastí všech známých genů. K cílenému ověření nálezů kandidátních variant u probandů a jejich příbuzných je vhodné využít Sangerova sekvenování a metodu MLPA. K ověření *de novo* původu nálezů je navíc důležitým nástrojem i metoda QFPCR.

1.6.1 Masivní paralelní sekvenování (MPS)

Tento typ sekvenování (dříve označované jako sekvenování nové generace) má dnes již nezastupitelnou úlohu nejen na pracovištích molekulární genetiky, ale také na oddělení hematonekologie, patologie či mikrobiologie. Jeho podstatou je fragmentace genové DNA, ať už enzymaticky či fyzikálně, na přibližně stejně velké fragmenty, jejich následná amplifikace a mnohonásobné čtení těchto fragmentů. V současné době má v Evropě nejzásadnější vliv společnost Illumina (USA, www.illumina.com), což je způsobeno především nízkou cenou, kdy je dnes možné provádět celoexomové sekvenování za cenu méně než 9 tisíc Kč/ vzorek. Metoda sekvenování v přístrojích společnosti Illumina je založena na tzv. můstkové amplifikaci (Obr. 3), ke které v průběhu sekvenování dochází na skleněné destičce (flowcell). K denaturovaným vláknům jsou v sekvenátoru přiváděny fluorescenčně značené nukleotidy, které jsou postupně amplifikací začleňovány do řetězce, který roste do výšky od plochy destičky. V určitém místě dochází k ohybu, vzniká můstek (bridge), vlákna se rozdělí a je umožněno sekvenační čtení z druhé strany řetězce – tzv. pair end čtení. Amplifikací jednoho DNA fragmentu vznikají na destičce tisíce kopií, které vytváří tzv. shluky – clusterly. Následné mnohonásobné čtení těchto clusterů vysoce citlivým laserem vede ke snížení možné chybovosti při čtení. Nevýhodou tohoto typu sekvenování je poměrně vysoká chybovost především v repetitivních oblastech (Slatko et al. 2018).

1.6.1.1 Sekvenační přístupy

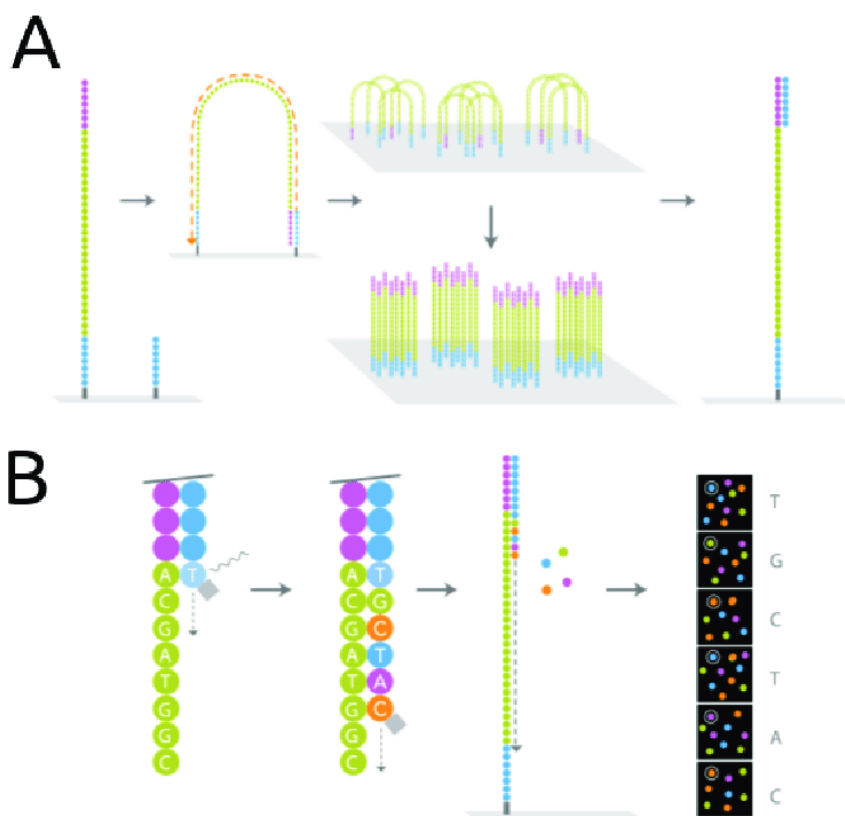
Podle očekávaného datového výstupu lze zvolit typ experimentu, který bude nejlépe vyhovovat našim potřebám. Pro sekvenování malého počtu genů asociovaných s jednou či několika málo diagnózami, lze zvolit sekvenování pomocí tzv. genových panelů, přičemž většinou se jedná o desítky až stovky genů. Tento přístup nám umožňuje získat vysoce kvalitní data, jelikož čtecí kapacita sekvenátorů je využita pro mnohonásobné čtení pouze malé části genetické informace. Další výhodou je možné zpracování velkého množství vzorků v jednom experimentu. To sebou nese nejen benefit finanční nenáročnosti vyšetření z hlediska sekvenační chemie, ale nevyžaduje ani nákladné přístroje a laboratoř si vystačí s malými sekvenátory typu MiniSeq či MiSeq. V neposlední řadě je výhodou takového přístupu také nenáročnost na zpracování a uchování sekvenačních dat.

Druhým stupněm je sekvenování tzv. klinického exomu (CES, Clinical Exome Sequencing). Tento přístup v sobě spojuje výhody sekvenování velkého množství genů u relativně velkého množství pacientů v jednom experimentu, než by tomu bylo u klasického celoexomového sekvenování. Klinický exom umožňuje vyšetřit řádově tisíce genů (obvykle 5-6 tisíc), u nichž existuje dokumentovaná asociace s dědičnými (převážně monogenními; odtud synonymum Mendeliom) onemocněními. Vhodným sekvenátorem pro analýzu klinického exomu je platforma NextSeq 550, která umožňuje osekvenovat např. 48 klinických exomů v jednom experiment při zachování optimálního pokrytí většiny oblastí a provedení kvalitní CNV analýzy. Nevýhodou tohoto přístupu je samozřejmě menší množství genů ve srovnání s celoexomovým sekvenováním a větší náročnost na analýzu a uchování dat ve srovnání s panelovým sekvenováním.

Celoexomové sekvenování (WES, Whole Exome Sequencing) se v dnešní době jeví jako nejlepší řešení pro rutinní genetické testování. Umožňuje vyšetření všech ~20 tisíc genů v jednom experimentu. Pro detekci autozomálně recesivních onemocnění či *de novo* variant je vhodné zvolit tzv. TRIO analýzu, kdy jsou spolu s probandem sekvenováni oba zdraví rodiče a detekované varianty u probanda jsou porovnávány s variantami detekovanými u rodičů. V případě opakovaného výskytu onemocnění v rodině je s výhodou provedení tzv. DUO analýzy, kdy v sekvenačních datech hledáme shodnou variantu u obou postižených, nebo je vylučujeme u zdravých sourozenců.

Celogenomové sekvenování (WGS, Whole Genome Sequencing) je nejvyšším stupně MPS, jehož výhodou je čtení celého genomu včetně nekódujících a regulačních

oblastí. Právě vyšetření těchto oblastí je možným klíčem k vyřešení dědičných onemocnění, jejichž molekulární příčina nebyla dosud detekována. Vysoká cena i náročnost na bioinformatické zpracování a ukládání sekvenačních dat je příčinou, proč je u nás celogenomové vyšetření v roce 2024 stále především výzkumnou metodou. Je však zřejmě jen otázkou času, než nahradí celoexomové sekvenování v rutinní diagnostice.



Obr. 3 Znáznornění můstkové amplifikace v sekvenátorech Illumina

- A) Molekula knihovny se hybridizuje k průtokové komůrce a z jediné molekuly se můstkovou amplifikací vytvoří klonální shluk.
- B) Během každého cyklu je do molekuly začleněn fluorescenčně označený nukleotid, který uvolňuje emisi specifickou pro danou bázi, která je registrována kamerami s vysokou citlivostí. 3' blokátor (zobrazený šedě) je poté odstraněn před tím, než může začít další cyklus.

Převzato a upraveno z illumina.com

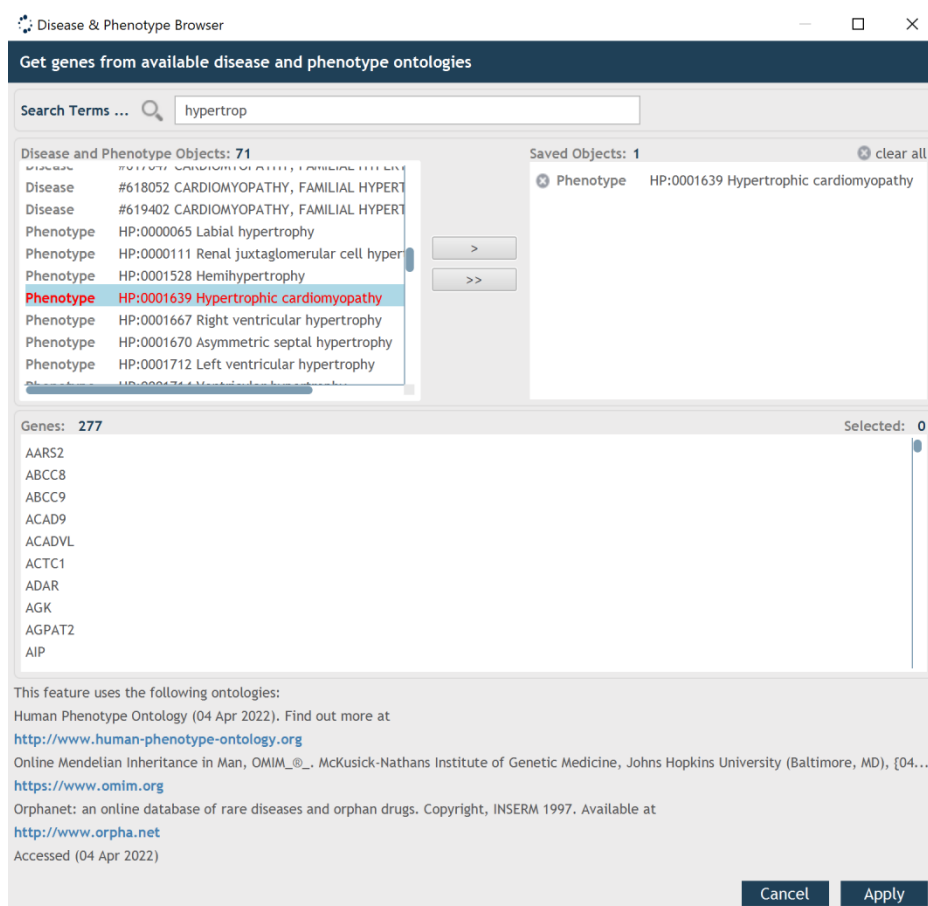
1.6.1.2 Analýza sekvenčních dat

Primárním datovým výstupem MPS jsou soubory ve formátu BCL, které obsahují fotografie jednotlivých vrstev se zařazenými nukleotidy. Ty jsou převedeny na soubory FASTQ, které obsahují nejen informaci o nukleotidové sekvenci, ale rovněž informaci o skóre kvality jednotlivých bazí, která ve výsledku umožní odfiltrovat málo kvalitní informace. Následuje mapování jednotlivých čtení (tzv. readů) na referenční sekvenci genomu, čímž vzniká tzv. BAM (Binary Alignment Map) soubor. Výstupem bioinformatické analýzy je soubor VCF (Variant Calling Format), který již obsahuje pouze oblasti, které se u vyšetřovaného vzorku liší oproti referenční sekvenci genomu.

V další části analýzy již dochází k prolínání genotypu s fenotypem. Pokud volíme přístup, kdy sekvenujeme geny pro více diagnóz (široké genové panely, CES, WES, WGS), pak z vyšetřených genů vybereme pouze ty, které jsou asociovány s diagnózou. K tomuto účelu slouží ve většině analytických programů vytvoření tzv. virtuálního panelu genů, který nám umožňuje sledovat cíleně varianty pouze v některých vyšetřovaných genech (Obr. 4). Pro vytvoření virtuálního panelu lze použít dostupné publikace, online databáze (např. OMIM - omim.org nebo OrphaNet - orpha.net) či databázi HPO termínů, která sdružuje geny asociované s daným fenotypem (Human Phenotype Ontology – hpo.jax.org). Případně lze použít i aplikaci PanelApp (panelapp.genomicsengland.co.uk), což je veřejně dostupná databáze, která umožňuje vytváření, ukládání a stahování hotových virtuálních genových panelů asociovaných s dědičným onemocněním.

Dále detekované varianty filtrujeme na základě frekvence v populaci, k čemuž lze použít databáze zdravých kontrol (především gnomAD - gnomad.broadinstitute.org). Jelikož hledáme převážně varianty způsobující AD onemocnění, zaměřujeme se na vzácné varianty s velmi nízkým zastoupením mutovaných alel v obecné (zdravé) populaci (< 0.1 %). Pro detekci rizikových faktorů s vyšším zastoupením v populaci (např. některé rizikové faktory v genech *KCNE1* či *KCNH2*), filtr nastavíme pro detekci variant s vyšší frekvencí (např. 0,1-1 %). Obecně lze říci, že čím vzácnější variantu nalezneme, tím je větší pravděpodobnost, že je tato varianta příčinou onemocnění. Některé analytické programy umožňují zobrazit frekvenci výskytu nejen u našich pacientů, ale i u všech uživatelů daného programu, což výrazně usnadňuje eliminovat některé časté varianty či varianty vzniklé chybou analýzy. Dalšími kritérii pro upřesnění možné kauzality varianty je její přítomnost/absence v klinických databázích či provedených funkčních studiích. Mezi takové databáze patří především ClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar), ClinGen

(clinicalgenome.org) či HGMD (hgmd.cf.ac.uk). Zajímavou roli při hodnocení variant má dnes, v době zlepšování možností umělé inteligence, tzv. *in-silico* predikce. Tato predikce umožňuje na základě počítačového modelu určit, zda záměna aminokyseliny vede k narušení struktury/funkce proteinu. Převážná většina z nich je tak určena ke klasifikaci missense variant. Analytici mají dnes k dispozici desítky takových predikcí, které jsou sdružovány v komplexních nástrojích, např. Varsome Premium (varsome.com, Obr.5), Franklin by Genoox (franklin.genoox.com) aj. Tyto predikce jsou však velmi často protichůdné a nezdívka se setkáváme s jasně patogenní variantou, která je hodnocena velkým množstvím prediktorů jako benigní. Výsledek *in-silico* predikce by tak dnes měl být hodnocen s velkou opatrností a neměl by v rámci výsledné klasifikace varianty hrát zásadní, ale pouze pomocnou roli.



Obr. 4 Výběr genů pro filtraci variant u pacienta s hypertrofickou kardiomyopatií na základě HPO termínu (SOPHiA DDM, sophiagenetics.com)

1.6.1.3 Klasifikace variant, reklasifikace a reanalýza dat

Souhrn všech informací, které získáme o detekované variantě je základem pro její hodnocení dle mezinárodní klasifikace ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics; Richards et al. 2015) do jedné z 5 tříd:



- třída 1 – varianta benigní
- třída 2 – varianta pravděpodobně benigní
- třída 3 – varianta nejasného významu
- **třída 4 – varianta pravděpodobně patogenní**
- **třída 5 – varianta patogenní**

Kompletní seznam kritérií pro ACMG klasifikaci variant je dostupný online (ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4544753). Obecně lze shrnout pravidla, která zvyšují pravděpodobnost, že varianta bude příčinou onemocnění takto:

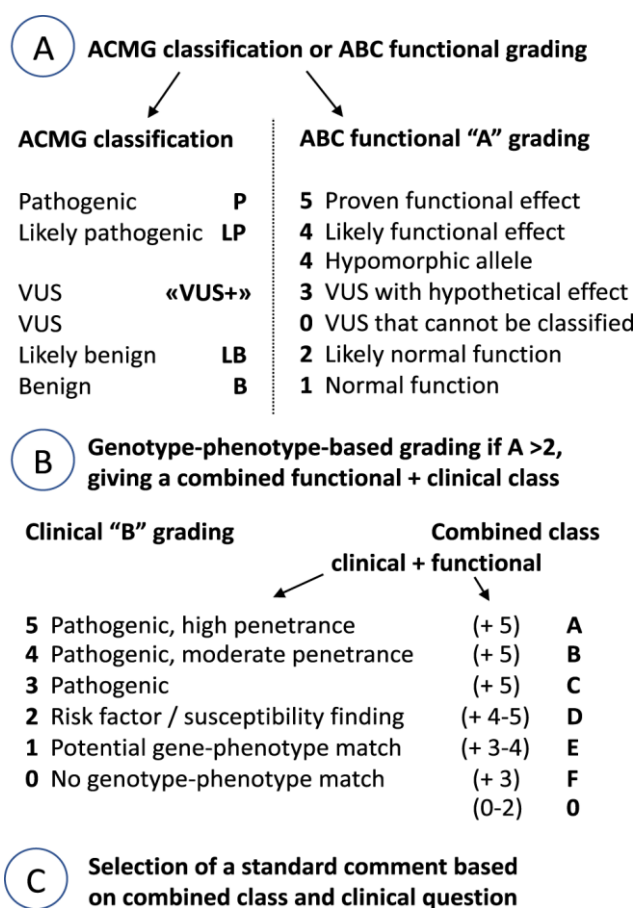
- detekovaná varianta se nachází v genu, který je asociován s daným onemocněním
- detekovaná varianta je typu, který je pro tento gen známým mechanismem pro rozvoj onemocnění (nonsense, frameshift, splicing variant)
- detekovaná varianta se nevyskytuje v databázi zdravých kontrol (gnomAD), případně se v ní vyskytuje v minimální frekvenci
- detekovaná varianta již byla hlášena v databázi ClinVar či v rámci funkční studie jako patogenní, případně nebyla relevantním zdrojem hlášena jako benigní
- predikční *in-silico* programy hodnotí v převážné většině variantu jako mající vliv na strukturu/funkci proteinu
- detekovaná varianta se nachází v místě hotspotu, tedy části genu známé zvýšeným výskytem kauzálních variant
- detekovaná varianta vznikla *de novo* či segregací analýza u příbuzných odpovídá výskytu kardiologického onemocnění v rodině

The screenshot displays the Varsome Premium interface for variant analysis. At the top, the variant is identified as NM_001276345.2:c.283G>A p.Val95Met. The main classification is 'Pathogenic' with 10 points. The 'Automated criteria' section shows several criteria (PS4, PM3, PP4, PP5, PM1, PM5, PM2, PP3, PV51, PS1, PS2, PS3, PM4, PM6, PP1, PP2, BP2, BP5, BA1, BS1, BS2, BS3, BS4, BP1, BP3, BP4, BP6, BP7) set to 'Strong' or 'Supporting'. The 'Rule' section provides detailed explanations for the classification, such as 'Combined evidence strength is Strong (score = 4)' and 'Hot-spot of length 17 amino-acids has 28 missense/In-frame variants (13 pathogenic variants, 15 uncertain variants and no benign)'. The interface also includes a 'Submit to ClinVar' button and various utility links like 'Link publication', 'Classify', 'Share', and 'API Link'.

Obr. 5 Klasifikace vybrané varianty na základě ACMG kritérií v programu Varsome premium (varsome.com)

Varianty benigní a pravděpodobně benigní (ACMG třídy 1-2) vyřazujeme z dalšího zkoumání, naopak varianty patogenní a pravděpodobně patogenní (ACMG třída 4-5) řadíme mezi možné příčiny onemocnění. Převážná většina variant, které jsou v laboratoři detekovány, je však nakonec vyhodnocena jako varianty nejasného významu (VUS - Variant of Uncertain Significance, ACMG třída 3), což je dáno nedostatkem informací v klinických databázích a absencí funkčních studií, které by dokazovaly vliv varianty na výsledný protein. V takovém případě je nejvhodnějším nástrojem segregace analýza u relevantních příbuzných, jejíž výsledek umožňuje překlasifikovat variantu na pravděpodobně benigní (ACMG třída 2) či naopak na pravděpodobně patogenní (ACMG třída 4). U variant, kde není možné provést dostatečnou segregace analýzu v rodině probanda, nebo je výsledek segregace nejasný, je doporučeno provádět po určité době reklasifikaci varianty nejasného významu na základě aktuálních poznatků. Stejně tak u sekvenčně negativních pacientů se po uplynutí určité doby (1-3 roky) doporučuje provádět reanalýzu sekvenčních dat, případně provést sekvenaci dosud nevyšetřených oblastí genomu změnou v sekvenčním přístupu (např. WES, WGS).

Zásadním nedostatkem ACMG klasifikace je skutečnost, že určuje pouze funkční vliv varianty bez jejího klinického hodnocení. Především míra penetrance není vůbec součástí tohoto hodnocení a např. hypomorfní alely nelze tímto postupem správně klasifikovat. Systém je tak vhodným nástrojem především pro dominantně dědičná monogenní onemocnění s vysokou mírou penetrance. Proto byl v roce 2021 vypracován a o rok později publikován návrh na novou ABC klasifikaci (Obr. 6), která by kombinovala funkční i klinický význam variant. Toto hodnocení spočívá v třístupňovém postupu: A-hodnocení funkčního významu varianty, B-hodnocení klinického významu varianty, C-kombinace výsledků získaných v krocích A+B, kdy jsou varianty rozděleny do 8 tříd podle jejich celkové klinické relevance/klinického dopadu (Obr. 7) (Houge et al. 2022).



Obr. 6: Navržený postup pro klasifikaci variant systémem ABC

Převzato z Houge et al. 2022

A+B třídy	Kombinované hodnocení (funkční + klinické)	Výsledná známka	Doporučení pro reportování nálezů
0	funkční hodnocení 0-2	0-2	Varianta není reportována
F	funkční 3 + klinické 0	3	Varianta není reportována, pokud je nepravděpodobné, že daný gen souvisí s fenotypem.
E	3+1 / 3+2 / 4+0 / 4+1 / 5+0	4-5	Varianta v genu, který by mohl souviset s fenotypem (skupina Variant-of-interest ,VOI), reportování varianty je volitelné
D	3+3 / 4+2 / 4+3 / 5+1 / 5+2	6-7	Nízká penetrace a vhodný gen: Doporučuje se reportování
C	4+4 / 5+3	8	Patogenní varianta spojená s onemocněním, reportuje se
B	4+5 / 5+4	9	Patogenní varianta střední penetrace spojená s onemocněním, reportuje se
A	5+5	10	Patogenní varianta vysoké penetrace spojená s onemocněním, reportuje se
X	funkční 3-5 + klinické 2-5		Sekundární/náhodný/nevyžádaný nález

Obr.7: Doporučení pro výsledné hodnocení a reportování variant v systému ABC

Převzato a upraveno z Houge et al. 2022.

1.6.1.4 Detekce a reportování vedlejších nálezů

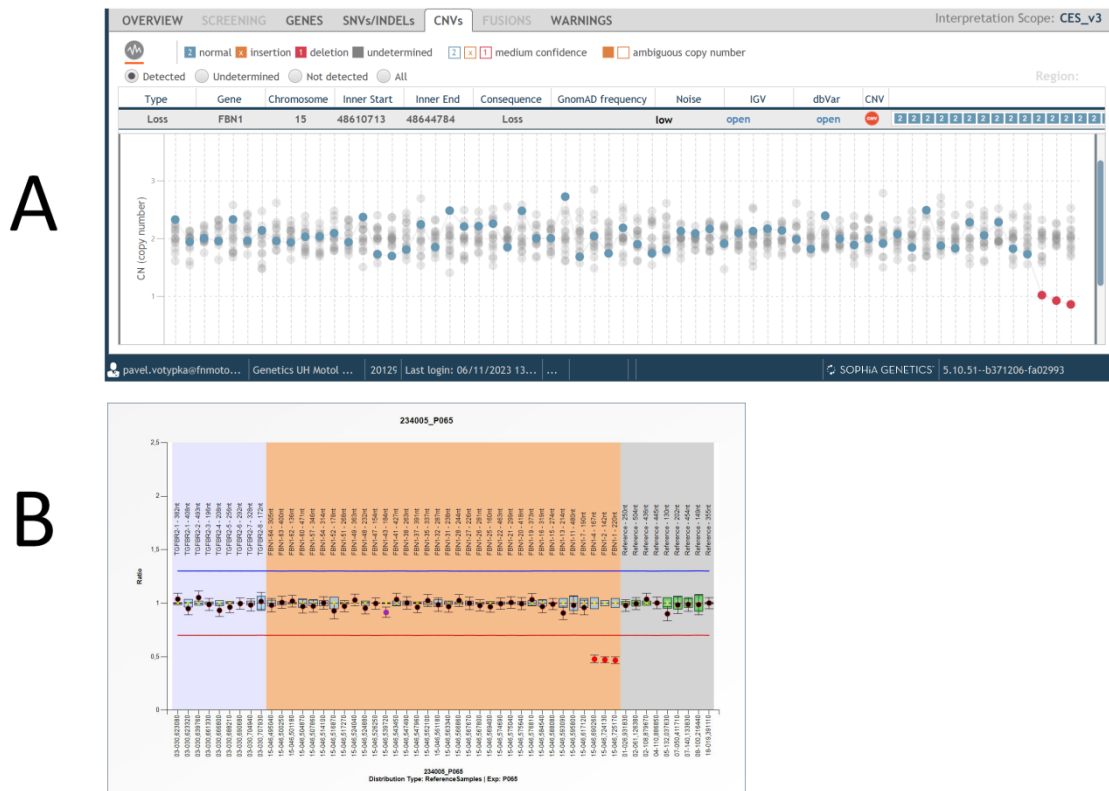
Genomové a exomové sekvenování s sebou přináší nejen vyšší procento záchytu kauzálních variant pro primární onemocnění, ale také celou řadu vedlejších nálezů. Tedy variant v genech pro jiná, např. onkologická onemocnění. Jejich reportování může být značně problematické, a to především u nezletilých osob. Proto by se postup při reportování vedlejších nálezů měl vždy opírat o stanovisko odborných společností a měl by být podložen také informovaným souhlasem, ve kterém pacient výslovně uvede, že si přeje být informován v případě vedlejšího/sekundárního nálezu. V současné době existuje pozitivní seznam genů doporučených pro reportování patogenních variant v „sekundárních genech“ vytvořený ACMG a dostupný online (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/acmg).

1.6.2 Sangerovo sekvenování DNA

Masivní paralelní sekvenování dosud stále nevytlačilo z genetických laboratoří metodu tzv. syntetického sekvenování, kterou objevil roku 1977 Frederick Sanger. Metoda enzymatického sekvenování je založena na schopnosti DNA polymerázy, která umí vytvářet komplementární vlákna k vláknům templátovým a umožňuje zakončení tvorby těchto vláken v místě výskytu určité báze. K tomu se používá směs tzv. 2', 3'-dideoxyribonukleotidtrifosfátů (ddNTP), které na rozdíl od „přirozených“ deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP) nemají 3'OH skupinu. Právě absence této OH skupiny je příčinou, proč při zařazení určitého nukleotidu (např. ddATP) je přerušena syntéza v místě komplementární báze – v tomto případě adeninu. U všech ostatních vláken probíhá syntéza dál opět do výskytu komplementární báze. Výsledkem je tak směs různě dlouhých vláken, jejichž délka je závislá na výskytu určité báze. Sangerovo sekvenování se stále uplatňuje především při cíleném ověřování nálezů detekovaných v rámci MPS a také pro cílenou segregační analýzu u příbuzných. Sangerovo sekvenování se stále uplatňuje především při cíleném ověřování nálezů detekovaných v rámci MPS a také pro cílenou segregační analýzu u příbuzných (Baudhuin et al. 2015).

1.6.3 Metoda MLPA

Metoda MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, mrcholland.com) má široké využití u multiplexní detekce delecí a duplikací. Lze použít v rámci jednoho genu, kde dokáže zachytit například delecí 1 z 60 exonů či ji lze naopak využít k rychlému screeningu delecí/duplikací na různých chromozomech, a vyloučit tak například nejčastější mikroleční syndromy. Je založena na denuraci dvouvláknové DNA, hybridizaci specifických sond, jejich následném spojení ligázou a amplifikaci. Vizualizace různě dlouhých fragmentů je potom prováděna pomocí kapilární elektroforézy. Výsledky vyšetřované DNA jsou porovnávány oproti kontrolním vzorkům a delece či duplikace je zachycena na základě poklesu/nárůstu fluorescence u píků reprezentujících danou oblast chromozomu. V diagnostice srdečních onemocnění a náhlé srdeční smrti se uplatňuje především k ověření CNV nálezů v rámci MPS diagnostiky (Obr. 8), vyloučení možné falešné pozitivita a segregační analýze u příbuzných k potvrzení či vyloučení rizika SCD.



Obr. 8 Nález patogenní delecce exonů 1-4 genu *FBN1* u pacienta s Marfanovým syndromem metodou CES (A) a ověření nálezu metodou MLPA P065 (B)

1.6.4 Metoda QFPCR

Metoda kvantitativní fluorescenční PCR je rutinně používána především k prenatální diagnostice početních odchylek chromozomů pomocí vysoce polymorfních STR markerů specifických pro každý chromozom. Vzorek DNA je amplifikován pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery, takže produkty lze separovat a kvantifikovat na automatickém genetickém analyzátoru (Mann et al. 2012). Uplatnění v oblasti molekulární diagnostiky kardiovaskulárních onemocnění nachází tato metoda v potvrzení *de novo* nálezů, tedy variant které nebyly zděděny od žádného z rodičů a vznikly nově. Na základě komplementarity STR markerů probanda a obou rodičů je vyloučena non-paternita i možnost záměny vzorku na všech úrovních zpracování biologického materiálu. Vyloučení non-paternity je jedním z kritérií ACMG, které umožňují překlasifikovat pravděpodobně patogenní varianty (ACMG třída 4) na jasně patogenní (ACMG třída 5).

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Molekulárně genetická diagnostika dědičných kardiovaskulárních onemocnění v ČR prochází v současné době zásadním vývojem. Vznikají multidisciplinární týmy a jsou poprvé definována společná doporučení a kritéria pro molekulární testování dědičných onemocnění srdce a cév, a také SCD. Studium SCD je věnována velká pozornost nejen v kardiologické komunitě, ale také v rámci této disertační práce. Hlavním cílem této práce je přinést nové poznatky o náhlé srdeční smrti a dědičných onemocněních, které jsou její bezprostřední příčinou.

Cíle disertační práce zahrnují:

- 1/ Vytvoření přehledu současných znalostí o geneticky podmíněných kardiovaskulárních onemocněních a aktuálních možnostech jejich laboratorní diagnostiky v ČR.
- 2/ Provedení pilotní studie SCD v ČR s cílem zjištění možností provádění tzv. molekulární pitvy a provedení detekce genetických příčin úmrtí u mladých osob. Cílem projektu je také vytvoření podmínek pro následné rutinní genetické testování SCD.
- 3/ Vyšetření souboru pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, která je nejčastější formou dědičné kardiomyopatie, a také jednou z nejčastějších příčin náhlé srdeční smrti. Cílem je získání nových poznatků o vlivu patogenních variant v genech asociovaných s HCM na četnost a závažnost projevů onemocnění včetně SCD.
- 4/ Vyšetření souboru pacientů s aortální disekcí s cílem identifikace vzácných příčinných variant, které by přispěly k lepšímu porozumění vztahů mezi genotypem a fenotypem u této skupiny onemocnění.
- 5/ Podílet se na zavedení celoexomového sekvenování pro účely rutinního testování kardiovaskulárních onemocnění a náhlé srdeční smrti v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol. Celoexomové sekvenování je vhodnou náhradou za panelové sekvenování vybraných „kardiogenů“, a jeho předpokládaným benefitem je vyšší záchyt kauzálních genetických variant.

3. METODIKA

Všechna molekulárně genetická vyšetření prezentovaná v rámci této disertační práce byla prováděna na našem pracovišti v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol. Byl geneticky vyšetřen soubor zemřelých a jejich příbuzných v rámci pilotní studie náhlé srdeční smrti, soubor pacientů se srdeční zástavou po prodělané KPR a dále soubory pacientů s kardiomyopatií a aortopatiemi. Od všech účastníků našich studií byl získán informovaný souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením a využitím vzorku pro výzkumné účely. Vzory informovaných souhlasů našeho pracoviště jsou k dispozici na webu fnmotol.cz/prakticke-informace/informovane-souhlasy/. Na počátku pilotní studie SCD byl pro pozůstalé vypracován nový dokument - Souhlas s posmrtným genetickým vyšetřením zemřelého při podezření na dědičnou příčinu úmrtí, který je k dispozici na webu nahleumrti.cz.

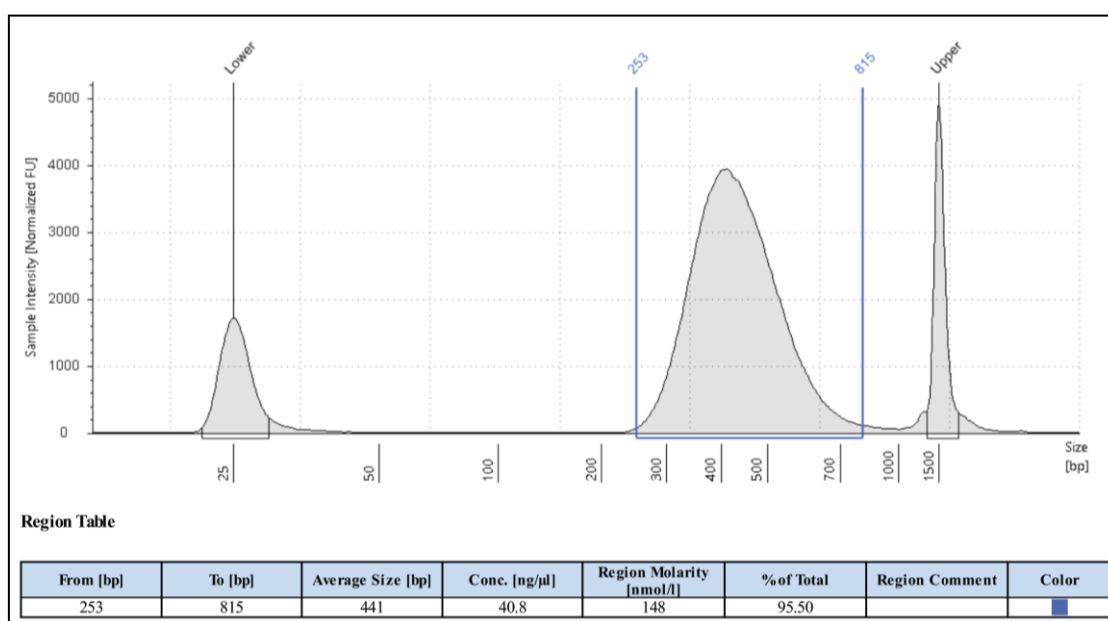
K získání DNA byla jako primární materiál ve většině případů použita periferní krev v K₃EDTA. V rámci pilotní studie příčin SCD byl zpracováván biologický materiál získaný od zemřelých v průběhu pitvy. Jednalo se o tkáň bohatou na lymfocyty (slezina, játra, uzliny). Tato tkáň byla uchovávána při teplotách -20 až -80 °C a převážena na naše pracoviště v mrazicích boxech. V několika případech byla použita tkáň zakonzervovaná v parafinovém bločku (FFPE) či v roztoku RNAlater (thermofisher.com). K extrakci DNA byl použit automatický izolátor Autogen Flex (autogen.com), který byl následně nahrazen novějším izolátorem MagCore HF16 plus (rbcbioscience.com). K izolaci malých množství periferní krve a k izolaci parafinových bločků byla použita kolonková metoda QiaAmp (qiagen.com). Kvalita extrahované DNA byla ověřena spektrofotometricky a také fluorimetricky na přístrojích Nanodrop 2000 a Qubit 2.0 (oba thermofisher.com).

K přípravě knihoven byl na začátku disertační práce používán kit s cíleným panelem 229 vybraných genů spojených s dědičným kardiovaskulárním onemocněním (protokol Roche NimbleGen SeqCap Library, roche.com). Na základě zkušeností byl tento panel snižen na 100 genů (Tabulka 4) a převeden na platformu od společnosti SOPHiA Genetics (sophiagenetics.com), která umožňovala nejen kvalitní analýzu CNV u všech vyšetřovaných genů, ale i bioinformatickou analýzu programem SOPHiA DDM. Od roku 2020 byl pro vyšetřování našich vzorků využíván CES, rovněž od společnosti SOPHiA Genetics, umožňující vyšetřit více než 5 tisíc genů v jedné reakci včetně detekce CNV. U části případů byla použita metoda celoexomového sekvenování SOPHiA WESv2. Po přípravě DNA knihovny byla vždy kontrolována její výsledná kvalita. Koncentrace

finální knihovny byla, pro potřeby dalšího ředění, kontrolována na přístroji Qubit 2.0 (thermofisher.com). Průměrná délka fragmentů (bp) byla kontrolována na přístrojích Bioanalyzer 2100 či TapeStation 4200 (oba agilent.com, Obr. 9). Průměrná délka získaných fragmentů je zásadní parametr, který je definován výrobcem sekvenátoru a její správná hodnota je zárukou, že sekvenování v přístroji proběhne správně po celé jejich délce. Současně také ukazuje na kvalitu přípravy knihovny, během které by kratší i delší fragmenty měly být odstraněny.

Tab. 4: Seznam 100 genů používaných pro cílené kardiogenetické sekvenování

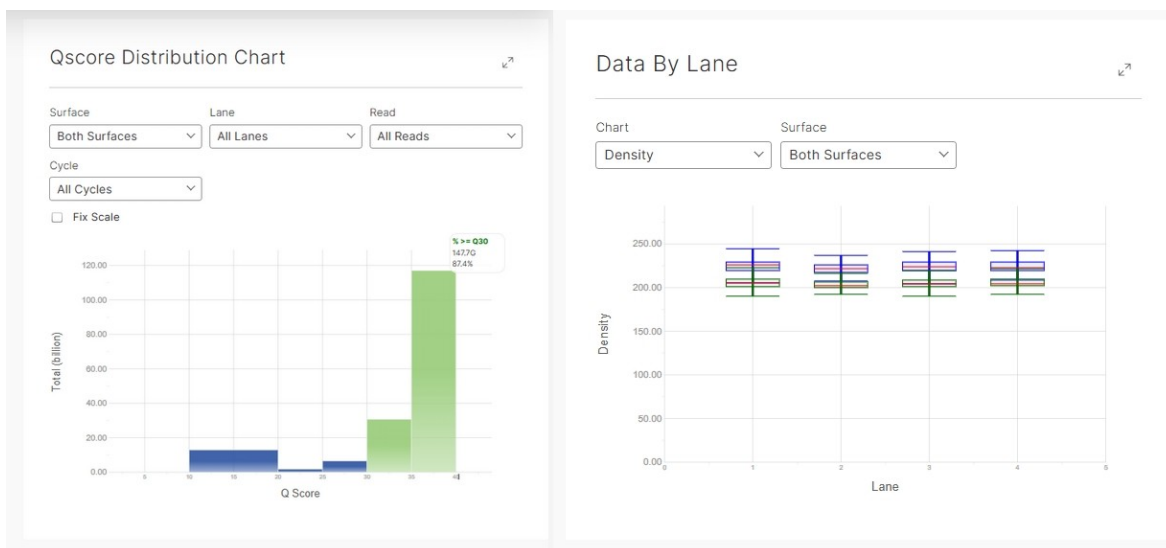
Kardiomyopatie	Arytmie	Aortopatie	VCC
<i>ACTC1, ACTN2, BAG3, CSRP3, CTNNA3, DES, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, FHL1, FLNA, FLNC, GLA, LAMP2, LDB3, LMNA, MIB1, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYPN, NEXN, PKP2, PLN, PRKAG2, PTPN11, RAF1, RBM20, SGCD, TCAP, TMEM43, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTN, VCL</i>	<i>ANK2, CACNA1C, CALM1, CALM2, CASQ2, CAV3, KCNA5, KCNE1, KCNE2, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNQ1, RYR2, SCN5A, SNTA1, TRDN</i>	<i>ACTA2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL5A1, COL5A2, ELN, EMILIN1, FBNI, FBN2, LOX, MAT2A, MFAP5, MYH11, NOTCH1, PLOD1, SKI, SLC2A10, SMAD3, SMAD4, SMAD6, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TNXB</i>	<i>ACTA2, ELN, GATA4, GATA5, GATA6, JAG1, NKX2.5, NOTCH1, NOTCH2, PTPN11, TBX1, TBX20, TBX5, ZIC3</i>



Obr.9 Kontrola kvality připravené DNA knihovny na přístroji TapeStation 4200

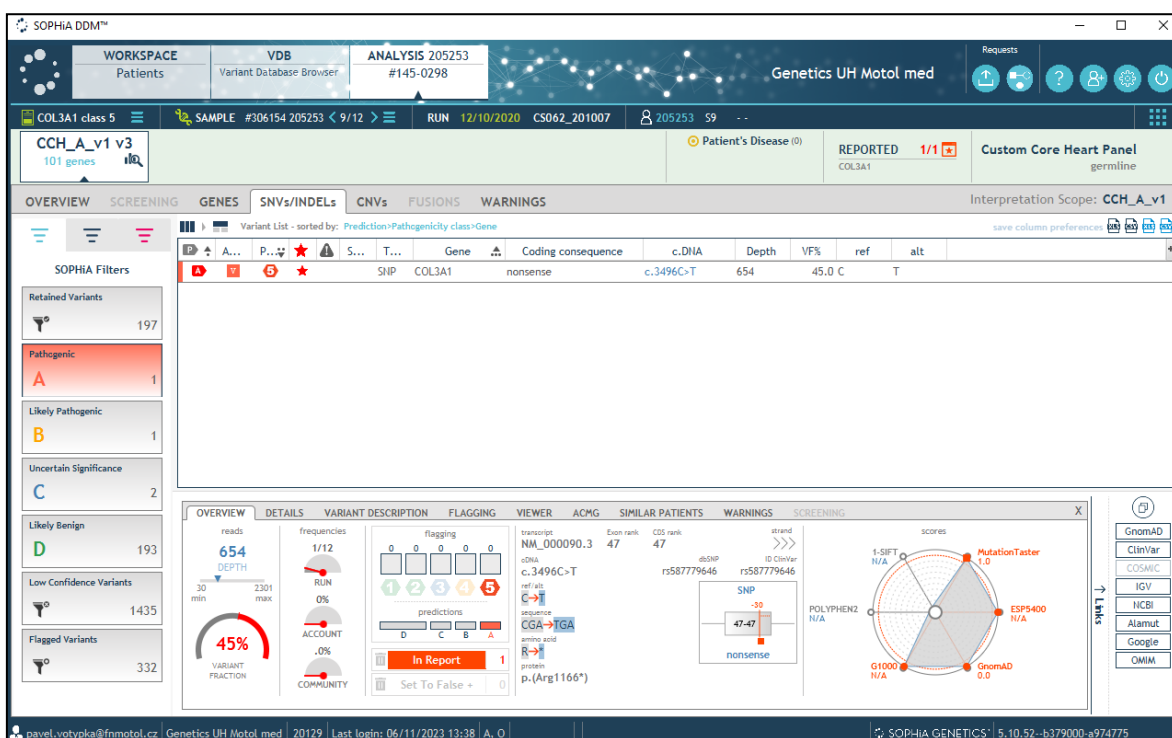
Výsledná DNA knihovna, jejíž kvalita odpovídala kvalitativním standardům, daným výrobcem kitu pro přípravu DNA knihovny, byla sekvenována na jednom ze sekvenátorů od společnosti Illumina (illumina.com). Během přípravy disertační práce jsme používali postupně platformy MiniSeq, MiSeq, NextSeq 550 a NovaSeq 6000. Sekvenační data byla ve všech případech ukládána na cloudové úložiště BaseSpace (basespace.illumina.com). To umožňuje sledovat sekvenační experiment v reálném čase a ukládat veškeré informace o kvalitě sekvenované knihovny včetně tzv. Q30 skóre a hustoty (denzity) pokrytí flowcellu klastry (Obr. 10). Umožňuje také automatické generování FASTQ souborů k další bioinformatické analýze.

Denzita je závislá na vstupní koncentraci DNA knihovny a její správná hodnota je zárukou toho, že při sekvenování se jednotlivé klastry na flowcell nepřekrývají a vysoce citlivý laser je tak dokáže kvalitně přechytit. Hodnota Q30 je základním ukazatelem tzv. skóre kvality experimentu. Skóre kvality představuje předpověď pravděpodobnosti nesprávného přiřazení báze. Vyšší skóre kvality Q30 naznačuje, že přiřazení báze má vyšší kvalitu a s větší pravděpodobností tak bude správné. U našich experimentů tato kvalita nikdy neklesla pod 80 %, byla tedy vždy v hodnotách, které umožňovaly získat vysoce kvalitní sekvenační data.



Obr. 10 Kvalitativní parametry sekvenčního experimentu v programu BaseSpace (basespace.illumina.com)

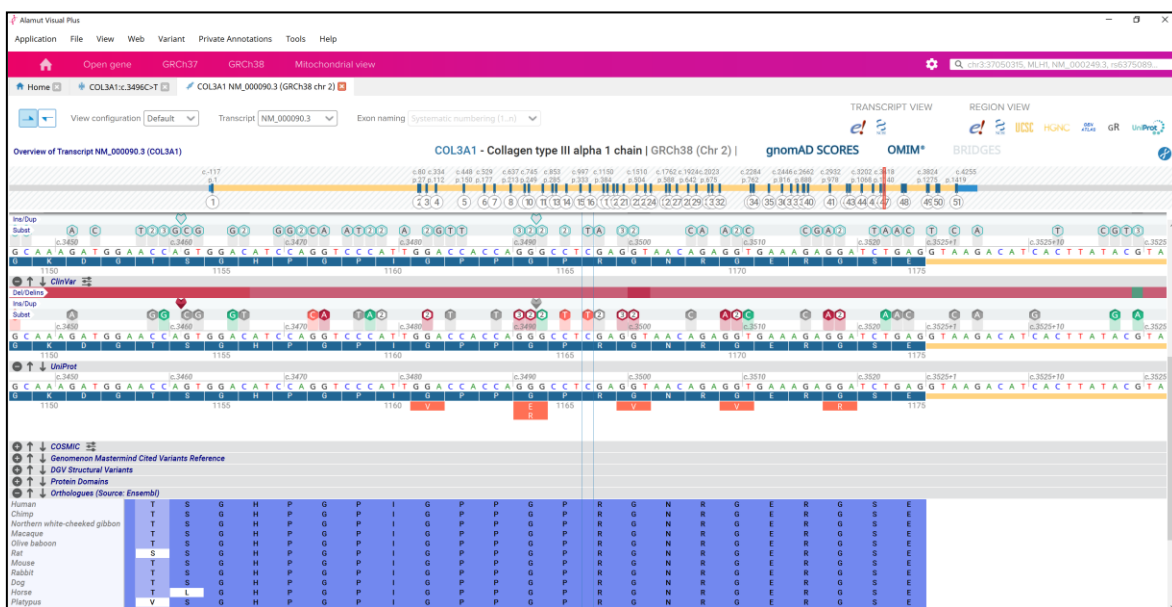
Získaná sekvenční data ve formátu FASTQ byla zpočátku bioinformaticky procesována pomocí metody Burrows-Wheeler aligner (BWA, bio-bwa.sourceforge.net) následované GATK analýzou (gatk.broadinstitute.org) a filtrována softwarem VariantStudio/Variant Interpreter (Illumina.com). Při tomto postupu byl jako referenční používán genom GRCh37 (hg19). Po přechodu na platformu od SOPHiA Genetics byly získané FASTQ soubory nahrávány přímo do programu SOPHiA DDM (sophiagenetics.com), kde probíhala i bioinformatická analýza i následná filtrace variant (Obr. 11). Tím odpadla zdlouhavá analýza prováděná v laboratoři a nový postup umožnil nejen používání referenčního genomu GRCh38 (hg38), ale také přístup k databázi nálezů všech uživatelů daného programu.



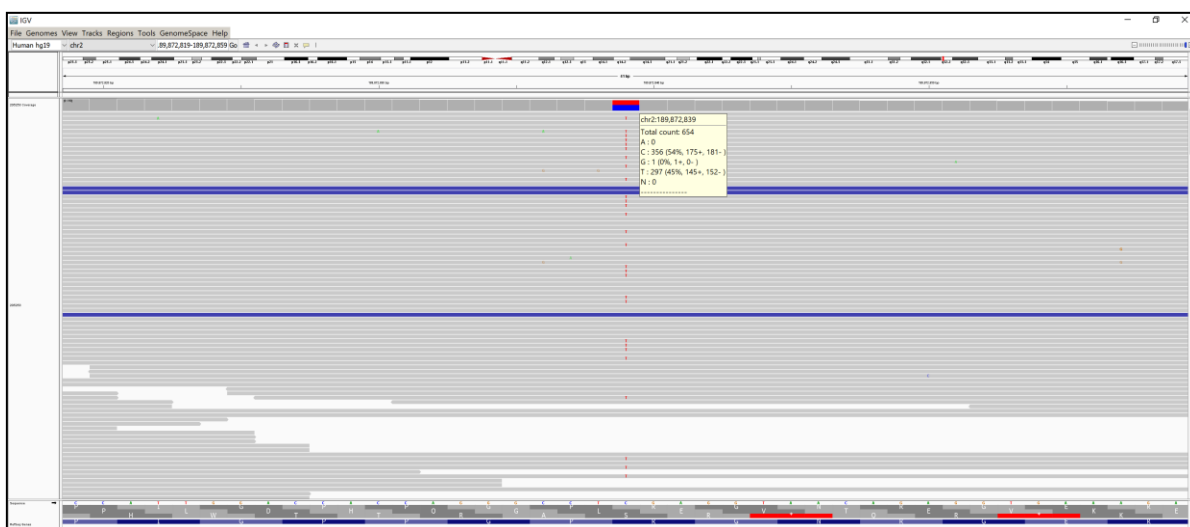
Obr. 11 Záchyt patogenní varianty v genu *COL3A1* u našeho pacienta s aortální disekcí při vyšetření cíleným panelem 100 genů metodou SOPHiA Genetics (sophiagenetics.com)

Zachycené genetické varianty byly filtrovány, prioritizovány a klasifikovány na základě postupu, který je detailně popsán v kapitole 1.6.1. Především na základě korelace genotyp/fenotyp, populační frekvence varianty uvedené v databázi gnomAD (gnomad.broadinstitute.org), předpokládaného vlivu na výsledný protein (*in-silico* predikce), záznamu v databázích (ClinVar, HGMD) atd. K vizualizaci detekovaných

variant v rámci umístění na chromozomu byl využíván program Alamut Visual Plus (sophiagenetics.com, Obr. 12) a sekvenční pokrytí v místě kandidátní varianty bylo kontrolováno v programu IGV (igv.org, Obr. 13). K upřesnění klasifikace variant byly dále využívány analytické nástroje Varsome Premium (varsome.com) a Franklin Genoox (franklin.genoox.com).

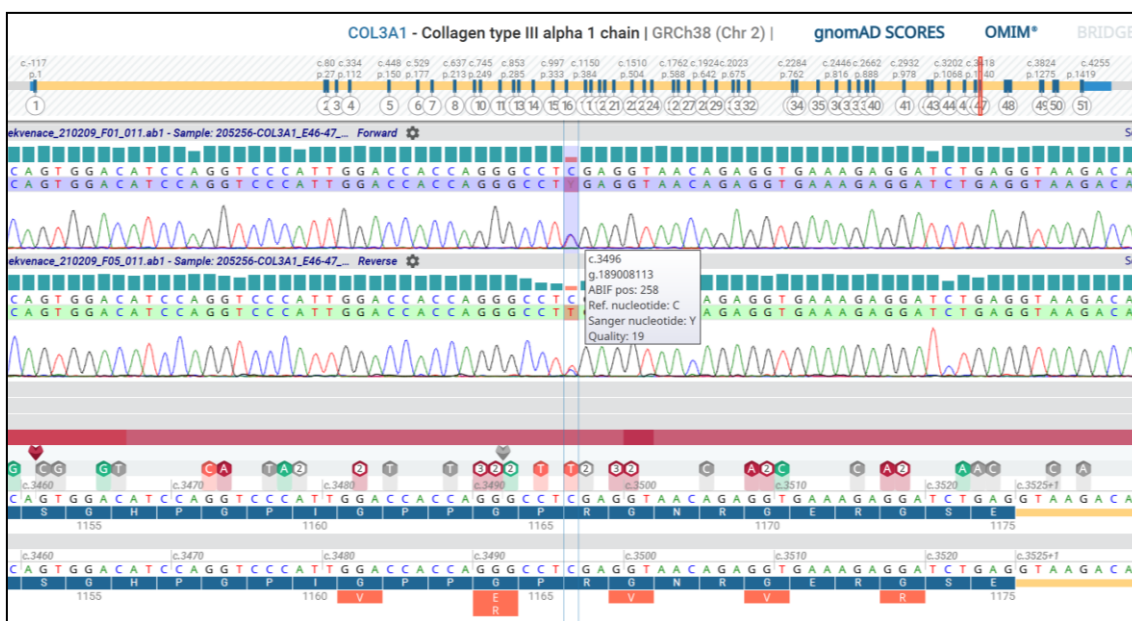


Obr. 12 Zobrazení lokalizace námi detekované patogenicí varianty v genu COL3A1 v programu Alamut Visual Plus (sophiagenetics.com)



Obr. 13 Kontrola pokrytí oblasti s detekovanou patogenicí variantou v programu IGV (igv.org)

Každá varianta byla hodnocena dle aktuální ACMG klasifikace do jedné z pěti tříd: 1-benigní, 2-pravděpodobně benigní, 3-varianta nejasného významu, 4-pravděpodobně patogenní, 5-patogenní. U kandidátních variant (ACMG třída 3-5) bylo provedeno nezávislé ověření nálezu a cílená segregáční analýza u relevantních příbuzných pomocí Sangerova sekvenování DNA (Obr. 14), případně metodou MLPA. Při vyloučení maternálního i paternálního původu varianty metodou Sangerova sekvenování, byl její *de novo* původ ověřen analýzou STR markerů metodou QFPCR.



Obr. 14 Potvrzení patogenní varianty u nemocného otce probanda pomocí Sangerova sekvenování DNA

Všechny nálezy v průběhu studie byly zaznamenány do národního kardiogenetického registru a získané výsledky byly podkladem následujících příložených publikací.

4. VÝSLEDKY, DISKUZE A ODKAZY NA PŘILOŽENÉ PUBLIKACE

4.1 Votýpka et al. (2023) Post-mortem genetic testing in sudden cardiac death and genetic screening of relatives at risk: lessons learned from a Czech pilot multidisciplinary study – Příloha 1

V letech 2016-2021 jsme v České republice provedli multioborovou studii, která měla za cíl zjistit možnosti molekulární pitvy na našem území a pokusit se identifikovat genetickou příčinu u obětí náhlé srdeční smrti mladších 40 let. Studie se účastnilo 12 pracovišť soudního lékařství z celé ČR, Kardiologická klinika IKEM, Dětské kardiocentrum 2. LF UK a FN Motol a další spolupracující pracoviště. Všechna molekulárně genetická vyšetření byla prováděna na našem pracovišti v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol. Do studie bylo zahrnuto 100 nepříbuzných obětí SCD, z toho 71 mužů a 29 žen. Průměrný věk vyšetřovaných byl 32,2 let u mužů a 36 let u žen. U všech vyšetřovaných případů byl od pozůstalých získán informovaný souhlas s genetickým vyšetřením. Byla také získána všechna dostupná demografická data, jako jsou okolnosti úmrtí, předchozí onemocnění či užívání léků.

Ke genetickému testování bylo zařazeno 49 případů kardiomyopatie (CM), 43 případů bez strukturálního onemocnění srdce (SADS - Sudden arrhythmic death syndrome a SUDS - Sudden unexplained death syndrome) a 8 případů aortální disekce. U všech vyšetřovaných případů bylo osekvenováno 100 genů asociovaných s kardiologickým onemocněním. Tento přístup nám umožnil kvalitní pokrytí všech cílových oblastí včetně kvalitní analýzy CNV. U vybraných 24 sekvenačně-negativních SCD případů bylo vyšetření rozšířeno na celoxomové sekvenování umožňující vyšetřit přibližně 20 tisíc genů. Sekvenování bylo prováděno na sekvenátorech NextSeq 550 a NovaSeq 6000 od společnosti Illumina (illumina.com).

V rámci naší pilotní studie se nám podařilo identifikovat u 22/100 (22 %) případů SCD patogenní/pravděpodobně patogenní genetickou variantu, u níž jsme si jisti, že byla příčinou SCD. Kauzální varianty byly ve 20/22 případech zděděny od jednoho z rodičů a ve 2/22 případech vznikly *de novo*. Ve 12/22 případech se jednalo o nové genetické varianty, které nebyly dosud hlášeny v žádné genetické databázi. Ve skupině

kardiomyopatií byla detekována kauzální varianta u 13/49 případů. Nejvíce variant (5) bylo detekováno v genu kódujícím největší protein lidského těla – titin (*TTN*, MIM:188840), který je mimo jiné asociován s rozvojem hypertrofické či dilatační kardiomyopatie. Ve skupině pitevně negativních případů se podařilo identifikovat patogenní variantu u 6/43 případů, kdy postiženými geny byly například gen kódující podjednotku iontově ovládaného draselného kanálu v kardiomyocytech (*KCNH2*, MIM:152427) či gen pro ryanodinový receptor, který v kardiomyocytech řídí uvolňování vápníkových iontů (*RYR2*, MIM:180902). V případech spontánní disekce aorty se podařilo objevit patogenní variantu u 3/8 případů. Jednalo se o varianty v genech pro kolagen typu 3 (*COL3A1*, MIM:120180) či o gen kódující receptor pro transformující růstový faktor beta (*TGFBR1*, MIM:190181). V dalších 10/100 (10 %) případech jsme identifikovali variantu, kterou jsme označili jako VUS*, tedy variantu nejasného významu s významným potenciálem způsobit SCD, kterou však nemůžeme dnes na základě dostupných informací hodnotit vyšší klasifikací.

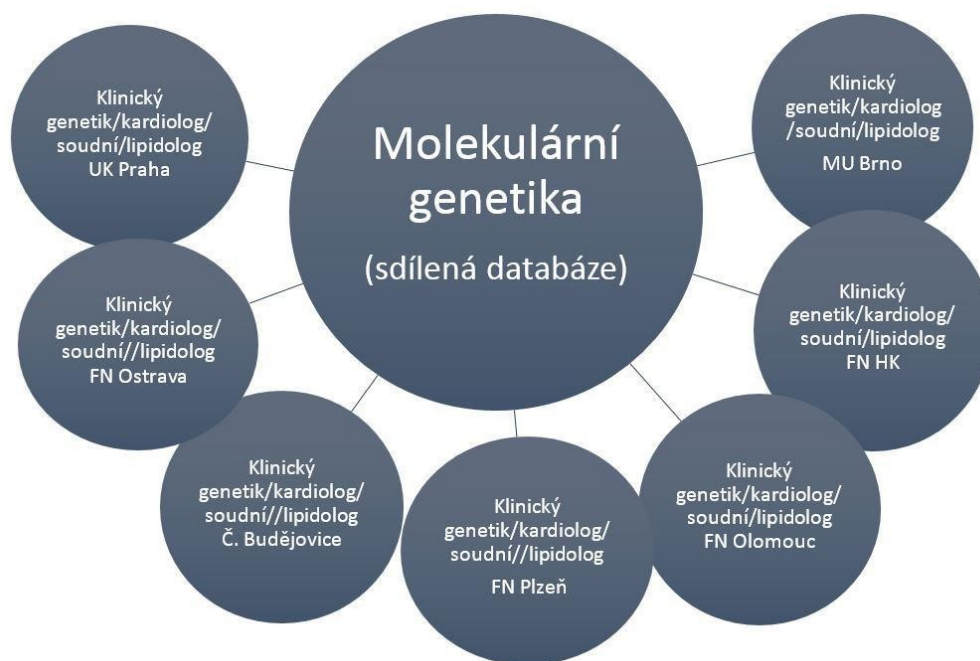
Naše pilotní studie týkající se SCD otevřela nové možnosti spolupráce mezi kardiology, molekulárními genetiky a soudními lékaři. Podařilo se identifikovat příčinu úmrtí u 22 procent zemřelých, což odpovídá světovým studiím, které byly na toto téma prováděny (Larsen et al. 2020, Lahrouchi et al. 2020). Velice úspěšné bylo i testování příbuzných v riziku, kdy se nám v rámci studie podařilo zachytit 87 osob v riziku náhlé srdeční smrti. Překvapením v rámci výsledků byla malá výtěžnost ve skupině arytmogenních kardiomyopatií. Světová literatura uvádí výtěžnost genetického vyšetření mezi 30-60 %. Naše výtěžnost v rámci studie byla pouze 9,1 %. Přitom tato skupina by měla být v rámci makroskopického a mikroskopického vyšetření srdce poměrně snadno diagnostikovatelná. Genetické výsledky však ukázaly, že část úmrtí, která byla při pitvě diagnostikována jako arytmogenní kardiomyopatie, odpovídala jiné klinické jednotce. Tento rozpor je v současné době důkladně konzultován se soudními lékaři.

V rámci laboratorní diagnostiky se ukázalo jako velmi nevhodné použití biologického materiálu získaného z parafinových bločků (FFPE). DNA z takto konzervované tkáně je fragmentovaná a jinak degradovaná, a její použití pro MPS analýzu i případné ověřování Sangerovým DNA sekvenováním se v rámci studie ukázalo jako velmi problematické. Pro genetické vyšetření jsme tak v rámci studie byli zcela odkázáni na odběr tkáně v průběhu pitvy a na jejím kvalitním skladování. V budoucnu se ovšem pokusíme standardizovat i odběry krve do K₃EDTA. Nové postupy v izolaci DNA z parafinových bločků a způsoby genetického vyšetření takto získaných materiálů nás však

nyní, po skončení studie, naplňují mírným optimismem. Díky nim se nám totiž možná retrospektivně podaří úspěšně uzavřít případy, kdy není k dispozici lepší biologický materiál.

Díky studii se podařilo zahájit sjednocování závazných postupů při podezření na SCD, a to v rámci celé republiky. Před začátkem naší studie se postupy pro makroskopické i mikroskopické vyšetření srdce často rozcházely nejen v rámci různých pracovišť, ale dokonce i v rámci jednoho pracoviště soudního lékařství. Předpokládáme, že sjednocení guideline pro pitvu SCD případů nám umožní zvýšení kvality molekulárně genetické diagnostiky. Byl také navržen model centralizace multidisciplinární péče a sdílené databáze používané po skončení pilotní studie (obrázek 15). Post mortem genetická analýza při náhlé srdeční smrti (SCD) představuje důležitý diagnostický nástroj pro primární prevenci srdeční zástavy u příbuzných obětí a vyžaduje multicentrickou a multidisciplinární spolupráci. Naše studie umožnila také zahájení rutinního testování případů SCD, kdy po skončení studie byly dodnes na našem motolském pracovišti testovány další desítky těchto případů. Vznikly také webové stránky spravované IKEM s informacemi pro pozůstalé i odborníky, které jsou dostupné na adrese <https://www.nahleumrti.cz/>.

Obr. 15 Návrh multidisciplinární péče v rámci diagnostiky SCD



Současně se studiem SCD probíhá na našem pracovišti v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol genetické testování příčin srdeční zástavy (SCA) u osob, u nichž se následně pomocí kardiopulmonální resuscitace (KPR) podařilo obnovit krevní oběh. Soubor těchto pacientů vzniká pod vedením hlavní koordinátorky projektu a mé školitelky - MUDr. Alice Krebsové, Ph.D. z Kardiologické kliniky IKEM (<https://www.ikem.cz/cs/kardiocentrum/klinika-kardiologie/a-20/>).

Cílem této studie je na reprezentativní české kohortě posoudit molekulární příčiny idiopatické fibrilace komor v případech, kdy se klinickým vyšetřením nepodaří zajistit důkazy o specifickém strukturálním nebo arytmogenním srdečním onemocnění. Do první vyšetřované skupiny bylo zahrnuto celkem 100 jedinců se srdeční zástavou ve věkovém rozmezí při zástavě 5-69 let. Po důkladném genetické poradenství a získání informovaných souhlasů, bylo u všech provedeno masivní paralelní sekvenování shodným panelem 100 kardiogenů, který byl využit i v případě pilotní studie SCD. Detekované patogenní varianty byly ověřeny Sangerovým sekvenováním DNA a bylo provedeno důkladné kardiologické screeningové vyšetření u prvostupňových příbuzných. Podařilo se identifikovat molekulární příčinu u 20/100 případů KPR, přičemž nejvíce variant bylo detekováno v genu *SCN5A* (MIM:600163, 4x), *PKP2* (MIM:602861, 3x), *RYR2* (MIM:180902, 3x) a *TTN* (MIM:188840, 2x).

I když dnes existují stále protichůdné názory na to, zda by výsledky genetického testování měly podpořit, nebo dokonce určit klinickou diagnózu, naše výsledky jednoznačně prokazují užitečnost genetického testování u případů SCA. Nejenom, že umožňují určitou stratifikaci molekulárních příčin SCA u arytmogenních syndromů, ale umožňují také identifikovat arytmogenní kardiomyopatii (10 z 20 identifikovaných případů v rámci studie), u níž je rozsah morfologických změn pod rozlišovací schopnost zobrazovacích metod. Tyto výsledky umožňují nejen individualizovanou péči o přeživší SCA, ale rovněž umožňují cílený preventivní přístup v péči o jejich rodinné příslušníky. První získaná data jsou tak slibným podkladem pro další zkoumání u této skupiny pacientů a v současné době je naším týmem připravována rozsáhlá publikace na toto téma.

4.2 Bonaventura et al. (2020) Patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy after alcohol septal ablation have favorable long-term outcome irrespective of their genetic background – Příloha 2

Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) patří mezi nejčastější příčiny SCD, přičemž vztahy mezi genotypem a fenotypem nejsou dnes dostatečně prostudovány. Následující 2 rozsáhlé studie měly za cíl zjistit vliv genetických variant na průběh onemocnění a odpověď na léčbu. Soubory pacientů s HCM vznikly pod vedením MUDr. Jiřího Bonaventury, Ph.D. z Kardiologické kliniky 2. LF UK a FN Motol, se kterým dlouhodobě spolupracujeme.

HCM je heterogenní onemocnění nejen z hlediska své genetické příčiny, ale rovněž ve svém klinickém projevu. Zhruba u 2/3 pacientů s HCM dochází k obstrukci výtokového traktu levé komory (LVOTO). U většiny asymptomatických pacientů s LVOTO není vyžadována léčba. Pokud však u pacienta dojde k výrazné obstrukci, je metoda alkoholová septální ablace (ASA) bezpečnou a účinnou metodou léčby LVOTO. Genetické pozadí pacientů léčených pomocí ASA a případný rozdíl v úspěšnosti léčby touto metodou u pacientů s prokázanou přítomností patogenní varianty způsobující HCM však není znám. Cílem studie tak bylo zjistit možný vztah geneticky pozitivní případů na úspěšnost terapie v porovnání s geneticky negativními případy.

Do studie bylo zahrnuto 129 nepříbuzných pacientů s HCM, jejich průměrný věk byl 54 let. U všech bylo provedeno masivní paralelní sekvenování s cílem detekce patogenních variant v genech asociovaných s HCM. Pacienti, u kterých byla detekována patogenní či pravděpodobně patogenní varianta (ACMG třídy 4 nebo 5) byli pro studii označeni jako geneticky pozitivní (G+), všichni ostatní, včetně pacientů se zachycenou variantou nejasného významu (ACMG třída 3) byli označeni jako geneticky negativní (G-). Statistické hodnocení provedené u obou skupin pacientů neprokázalo souvislost mezi závažným genetickým nálezem a odpovědí na léčbu pomocí ASA. Dlouhodobý účinek léčby pomocí ASA je prakticky shodný u obou sledovaných skupin.

4.3 Bonaventura et al. (2024) Relationship Between Genotype Status and Clinical Outcome in Hypertrophic Cardiomyopathy – Příloha 3

Velká mezinárodní studie pacientů s HCM měla za cíl určit, zda genotyp pacientů má vliv na progresi onemocnění, dobu přežití a náhlou srdeční smrt. Do studie bylo zařazeno celkem 1468 pacientů, u nichž byla echokardiografií nebo magnetickou rezonancí určena klinická diagnóza hypertrofické kardiomyopatie. Pacienti byli vyšetřeni ve 2 referenčních centrech pro HCM – v Tufts Medical Center, Boston, USA (988 pacientů) a Fakultní nemocnici Motol v Praze (480 pacientů). Ze studie byli vyloučeni pacienti s typem onemocnění, u nichž je hypertrofie levé komory pouze sekundárním projevem (např. Fabryho choroba, Danonova nemoc, amyloidóza a jiná střídavá onemocnění). Všichni pacienti zařazení do studie byli vyšetřeni pomocí masivního paralelního sekvenování se zaměřením na známé geny asociované s HCM. Hodnocení variant bylo prováděno na základě mezinárodní klasifikace ACMG. Pacienti, u nichž byla detekována patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianta (ACMG třída 4-5), byli označeni pro účely studie jako geneticky pozitivní (G+). Pacienti, u nichž nebyla detekována varianta ACMG třídy 4-5, byli označeni pro účely studie jako geneticky negativní (G-), včetně pacientů u nichž byla detekována varianta nejasného významu (ACMG třída 3). Procentuální záchyt patogenních variant se na obou pracovištích nelišil, na našem pracovišti se podařilo zachytit varianty ACMG třídy 4-5 u 22 % případů, na bostonském pracovišti u 21 % případů. U všech případů byla získána anamnestická data ohledně věku a průběhu onemocnění, a bylo provedeno statistické hodnocení souborů G+ a G-.

Některé předchozí studie naznačovaly, že u pacientů s HCM a prokázanou patogenní variantou v některém z genů pro sarkomerické proteiny, je zvýšené riziko závažných komplikací a čtenější výskyt srdečních zástav a náhlé srdeční smrti oproti negativně testovaným. Tato nejnovější rozsáhlá studie naopak neprokázala žádný rozdíl v progresi onemocnění, srdečním selhání a náhlé srdeční smrti mezi G+ a G- skupinou pacientů s HCM. Výsledky genetického testování tak nejsou spolehlivým nástrojem k předvídání prognózy či stanovování postupu léčby u těchto pacientů. Naopak G- status při HCM neposkytuje pacientovi jakousi ochranu proti nepříznivým komplikacím spojeným s tímto onemocněním.

4.4 Bonventura et al. (2020) Komplexní přístup k pacientům s hypertrofickou kardiomyopatií a indikace ke genetickému vyšetření – Příloha 4

Zkušenosti z prvních velkých souborů pacientů s HCM, kteří byli ve spolupráci s Kardiologickou klinikou 2.LF UK a FN Motol geneticky testováni na našem pracovišti, vedly ke stanovení doporučení pro komplexní přístup při péči o pacienty s HCM. Přehledový článek, který byl uveřejněn v časopise České kardiologické společnosti Cor et Vasa, shrnuje hlavní zásady v indikaci, genetickém vyšetření, interpretaci výsledků a jejich uplatnění v péči o pacienty s HCM.

Doporučení se týkají například i prenatální diagnostiky HCM, kdy molekulárně genetická vyšetření dnes umožňují testování velkého množství genů asociovaných s tímto typem kardiomyopatie u plodu. Vzhledem k neúplné penetranci a variabilní expresivitě onemocnění je však přerušování těhotenství v případě pozitivně testovaného plodu velmi problematické. Zásadní zřetel je brán na správnou interpretaci genetických variant, stejně jako úlohu kaskádového rodinného screeningu. Vyšetření příbuzných totiž často umožňuje doplnit anamnestické informace, upřesnit výsledky genetického vyšetření, ale také zachytit onemocnění v rané fázi. V zájmu lékaře by tam měla být pozitivní motivace příbuzných pacienta k podstoupení genetického a klinického vyšetření.

Na základě zkušeností a nových poznatků ohledně genotypu a fenotypu hypertrofické kardiomyopatie, je dnes už zcela jasné, že pro správné nastavení individualizované péče o pacienty s HCM je nutná úzká mezioborová spolupráce a vyšetření širokého okruhu příbuzných. Poskytovaná péče by tak měla být soustředěna do specializovaných center s dostatkem zkušeností v diagnostice a léčbě onemocnění, která jsou přímo provázána s genetickými pracovišti. Navržený postup předpokládá mimo jiné zvýšení významu genetického testování jak v diagnostice onemocnění, tak i v prevenci SCD.

4.5 Hromaníková et al. (2022) Záchyt laminopatie s převažujícím postižením srdce v rámci předtransplantační diagnostiky - kazuistika, rozbor rizikové stratifikace a kardiologického managementu pacientů s laminopatií – Příloha 5

Kazuistika 16-leté pacientky s dilatační kardiomyopatií a kontrakturami v loketních kloubech, která byla na základě srdečního selhání zařazena do předtransplantačního programu. U pacientky jsme provedli masivní paralelní sekvenování zaměřené na 229 kardiogenů na sekvenátoru MiSeq (illumina.com). Filtrací variant v genech asociovaných s dilatační kardiomyopatií byla detekována pravděpodobně patogenní varianta typu missense (ACMG třída 4). Provedená segregací analýza vyloučila maternální i paternální původ varianty a následná analýza STR markerů pomocí metody QFPCR potvrdila, že varianta vznikla *de novo*. To umožnilo překlasifikovat variantu na jasně patogenní (ACMG třída 5).

Detekce patogenní varianty spolu se symptomy umožnila určit, že probandka trpí laminopatií, přesněji Emeryho-Draifussovou myopatií, mezi jejíž hlavní symptomy patří právě dilatační kardiomyopatie a kloubní kontraktury. Určení přesné diagnózy má zásadní význam pro management péče o takového pacienta. U pacientů s laminopatií jsou přísnější pravidla pro implementaci defibrilátoru (ICD), je omezená léčba pomocí betablokátorů či radiofrekvenční ablace. U mladých pacientů bez výrazných komorbidit je naopak doporučeno zařazení do transplantačního programu. Nález patogenní varianty pro laminopatii má rovněž zásadní význam pro případné potomky této pacientky. Pacientka byla zařazena jako urgentní kandidátka na transplantaci srdce, která u ní byla o měsíc později úspěšně provedena.

4.6 Isle Van Gucht et al. (2021) Novel *LOX* Variants in Five Families with Aortic/Arterial Aneurysm and Dissection with Variable Connective Tissue Findings – Příloha 6

V naší laboratoři se důkladně zabýváme také genetickým vyšetřením pacientů s aortálními syndromy a dědičnou poruchou pojiva. Pacienti do tohoto souboru jsou pečlivě vybíráni na základě genetické konzultace a potvrzení familiárního výskytu onemocnění MUDr. Alicí Krebsovou, Ph.D. na pracovišti Kardiologické kliniky IKEM a MUDr. Veronikou Zoubkovou v Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol. Do následujících 2 publikací, které vznikly ve spolupráci s Centrem lékařské genetiky Fakultní nemocnice v belgických Antverpách, byly použity zajímavé genetické nálezy z našeho souboru.

První studie si kladla za cíl upřesnit klinické projevy u pacientů s dědičným aortálním syndromem, který je způsoben patogenními variantami v genu *LOX*. Tento gen kóduje enzym lisyloxidázu, který katalyzuje síťování proteinů extracelulární matrix, jako je kolagen a elastin. Patogenní varianty v tomto genu způsobují velmi vzácné familiární TAAD s možnou přítomností variabilních projevů systémového onemocnění pojiva. U jednotlivých nositelů patogenních variant se však výrazně liší nejen klinické projevy onemocnění, ale také věk, při kterém dojde k rozvoji těchto projevů. Dodnes bylo publikováno jen malé množství studií, které zkoumají spojitost fenotypu s patogenními variantami v genu *LOX*. Do této studie bylo zařazeno 5 rodin, u jejichž členů byly detekovány patogenní varianty v genu *LOX*. Ve 2 případech se jednalo o variantu typu frameshift, jedna varianty byla typu nonsense a zbylé 2 varianty typu missense.

Naše laboratoř se na studii podílela detekcí 1 z 5 publikovaných variant v genu *LOX*. Ta byla detekována u 21-letého pacienta s dilatací aorty, u něhož byla diagnóza stanovena ve věku 6 let, a z důvodu rychlé progresy u něj byla provedena ve 14 letech protetická náhrada ascendentní aorty. Mikroskopický nálezy prokázal abnormální texturu elastické složky v adventicii aorty s podezřením na poruchu pojivové tkáně. U pacienta nebyly kromě výšky (95. percentil) zaznamenány žádné projevy typické pro systémové onemocnění pojiva (kloubní hypermobilita, kožní hyperelasticitu ani obličejový dysmorfismus). Z rodinné anamnézy vyplynulo, že byly zaznamenány případy aortální disekce v rodině otce probanda, kde na akutní disekci zemřel paternální dědeček i jeho

bratr, oba před 50. rokem věku. U otce nebylo možné provést klinické ani genetické vyšetření z důvodu dokonané sebevraždy. Echokardiografické vyšetření bylo naopak provedeno u matky probanda s negativním výsledkem.

Genetické vyšetření bylo provedeno masivním paralelním sekvenováním genů asociovaných s aortálními syndromy. Tímto postupem byla u probanda detekována missense varianta v genu *LOX*. Segregační analýza vyloučila tuto variantu u zdravé matky a varianta byla po zhodnocení všech informací klasifikována jako pravděpodobně patogenní (ACMG třída 4).

Výsledky pozorování naznačují, že patogenní varianty typu loss-of-function v genu *LOX* vedou k rozvoji širokého spektra cévních postižení v kombinaci se systémovými projevy poruchy pojivové tkáně – tříselná kýla, pneumotorax, luxace kloubů či ruptura sleziny. Do spektra symptomů asociovaných s onemocněním byla také nově zařazena disekce koronárních tepen. Naopak příčinné varianty typu missense se zdají být příčinou aortální disekce bez projevů, či pouze s mírnými projevy systémové poruchy pojivové tkáně. Studie také ukázala variabilitu věku pro vznik aneurysmatu aorty u pacientů s příčinou variantou v genu *LOX*, které se tak může projevit i u dětí ve věku 6 let. Vzhledem k vzácnosti případů TAAD způsobenými variantami v genu *LOX* nebylo dosud možné provést rozsáhlejší studie. Vzhledem k rozvoji sekvenačních technologií však předpokládáme, že se brzy podaří soubor detekovaných variant rozšířit a další rozsáhlejší studie tato naše pozorování potvrdí či vyvrátí.

4.7 Jotte Rodrigues Bento et al. (2022) Isolated aneurysmal disease as an underestimated finding in individuals with *JAG1* pathogenic variants – Příloha 7

Alagillův syndrom (ALGS, ORPHA:52) je onemocnění postihující především játra, ledviny, plíce a pohybový aparát. Mezi symptomy patří i různé srdeční vady, disekce aorty je však u pacientů s ALGS hlášena pouze sporadicky, přičemž většina je zjištěna až post mortem v průběhu pitvy. Záchyt izolovaného aneurysmatu aorty na podkladě patogenní varianty v genu *JAG1* (MIM:601920), je však velmi vzácný. Patogenní varianty v genu *JAG1* jsou příčinou syndromu zhruba v 94 % případů, u dalších 2,5 % nacházíme patogenní varianty v genu *NOTCH2* (MIM:600275) a u zbytku pacientů zůstává genetická příčina nejasná. Převážnou většinu známých kauzálních variant tvoří varianty typu loss-of-function (frameshift či nonsense), výjimkou však nejsou ani varianty ovlivňující oblast sestřihu.

Tento článek, který je dalším výsledkem spolupráce s pracovištěm profesora Loeyse, popisuje 2 případy pacientů s izolovaným aneurysmatem aorty, u nichž byla detekována patogenní varianta v genu *JAG1*. Jedna ze dvou popisovaných variant (NM_000214.2:c.2114-5_2119delins18) byla zachycena na našem pracovišti u 42-letého probanda v rámci výzkumu aortálních syndromů metodou MPS. Detekovaná varianta ovlivňuje sestřihové akceptorové místo a první nukleotidy exonu 17 genu *JAG1*. Jedná se o novou variantu, která nebyla dosud hlášena v genetických databázích. Analýza RNA prokázala, že varianta vede k chybnému sestřihu a k vynechání celého exonu 17 v genu *JAG1*. Varianta tak byla na základě ACMG klasifikace vyhodnocena jako patogenní (ACMG třída 5). Genetické výsledky vyšetření byly vůbec poprvé ověřeny vyšetřením aorty, které potvrdilo degradaci elastinu a abnormálním ukládáním kolagenu.

Tento článek poskytuje jednoznačný důkaz, že existují případy TAAD u pacientů s patogenní variantou v genu *JAG1*, u nichž nebyly zaznamenány příznaky Alagillova syndromu. Na základě tohoto pozorování je vhodné zařadit gen *JAG1*, případně i *NOTCH2* do skupiny vyšetřovaných genů k detekci příčin TAAD. Dále je vhodné vyšetřit cévní systém u těchto pacientů se zaměřením na intrakraniální a aortální aneurysma, protože cévní příhody podle odhadů tvoří více než 30 % úmrtí na ALGS. Budoucí systematické testování by navíc mohlo upřesnit význam aortopatie u Alagillova syndromu.

4.8 Čopíková et al. (2020) Expanding the phenotype spectrum associated with pathogenic variants in the *COL2A1* and *COL11A1* genes – Příloha 8

Patogenní varianty v genech *COL2A1* (MIM:120140) a *COL11A1* (MIM: 120280) jsou příčinou širokého spektra fenotypových projevů. V tomto článku jsou prezentovány klinické nálezy detekované v souboru 26 českých pacientů (50 % muži, 50 % ženy) z 16 rodin, kteří jsou nosiči patogenních variant v genech *COL2A1* či *COL11A1*. K detekci patogenních variant bylo použito masivní paralelní sekvenování, Sangerovo sekvenování DNA a k segregaci také metoda MLPA. U 19 pacientů z 13 rodin bylo detekováno celkem 11 různých patogenních variant v genu *COL2A1* a u 7 pacientů z 3 rodin byla detekována patogenní varianta v genu *COL11A1*. Převážná většina variant byla dosud nepopsaných, pouze u 4 se jednalo o varianty v minulosti popsané ve spojitosti se Sticklerovým syndromem (ORPHA:828). Porovnáním získaných klinických dat byla pozorována nejen výrazná interindividuální ale i intrafamiliární fenotypová variabilita, stejně jako překryv jednotlivých fenotypů.

Studie upozorňuje na složitost testování dědičných poruch kolagenu spojených s patogenními variantami v genech *COL2A1* a *COL11A1*, které se mohou projevovat izolovanou oční či sluchovou vadou, stejně jako systémovou poruchou pojiva upomínající některý aortální syndrom (myopie, astenický habitus, deformity hrudníku, gotické patro, dilatace aorty apod.). To značně znesnadňuje klinickou i genetickou diagnostiku, což se ukázalo i při genetickém testování našeho souboru pacientů s aortálním syndromem. Především při detekci variant nejasného významu (ACMG třída 3) v genech s extrémně širokým spektrem fenotypových projevů, je velmi obtížné rozhodnout, kterou variantu podrobit dalšímu zkoumání. Pro správné určení diagnózy je tak v těchto případech rozhodující úzká spolupráce klinického a genetického pracoviště a také důkladné vyšetření co nejširšího okruhu příbuzných.

4.9 Brunerová et al. (2023) Case report: Two heterozygous pathogenic variants of *CYP24A1*: A novel cause of hypercalcemia and nephrocalcinosis in adulthood – Příloha 9

Tato kazuistika popisuje případ 43-letého pacienta s marfanoidním habitem, hyperkalcémií, aterosklerotickou aortou a trombózou v ilické tepně. U pacienta byl základním genetickým vyšetřením vyloučen Marfanův syndrom a byla detekována tzv. Leidenská varianta v heterozygotním stavu. Jedná se o variantu v genu pro faktor V krevního srážení, která je rizikovým faktorem pro vznik trombofilních stavů. Nebyla u něj detekována žádná kauzální varianta, která by vysvětlovala marfanoidní habitus ani hyperkalcémii. Bylo tak provedeno masivní paralelní sekvenování klinického exomu (CES) od společnosti SOPHiA Genetics (sophiagenetics.com) na sekvenátoru NextSeq 550 (Illumina.com) s následnou detekcí variant se zaměřením na geny asociované s poruchou pojiva (371 genů) a geny asociované s hyperkalcémií (67 genů). Filtrace, anotace a prioritizace variant probíhala v programu SOPHiA DDM s využitím nástrojů IGV (igv.org), Alamut Visual Plus (sophiagenetics.com), Franklin Genoox (franklin.genoox.com) a Varsome Premium (varsome.com).

Ani sekvenace velkého množství genů pro poruchy pojiva nedetekovala variantu, která by vysvětlovala suspektní poruchu pojiva, byly však detekovány 2 varianty v genu *CYP24A1* (MIM:126065) pro AR dědičnou hyperkalcémii (ORPHA:300547), které byly na základě ACMG kritérií klasifikovány jako patogenní (ACMG třída 5). Vzdálenost obou variant však neumožnila ze sekvenačních dat potvrdit, že nejsou na shodné alele a jsou tak ve vazbě trans. Bylo tak doporučeno vyšetření rodinných příslušníků, všichni však odmítli odběr biologického materiálu, a tím i genetické vyšetření. Tato kazuistika ukazuje na výhody testování širokého spektra genů (v tomto případě CES), které umožnilo vyloučit u pacienta s marfanoidním habitem přítomnost patogenní varianty v některém z genů asociovaných s dědičnou poruchou pojiva, současně ale umožnilo detekovat pravděpodobnou příčinu dědičné hyperkalcémie. Zároveň také ukazuje komplikace, které s sebou přináší nonkompliance ze strany příbuzných vyšetřovaného probanda ve chvíli, kdy je nutné provedení segregační analýzy k dokončení přesné diagnózy.

4.10 Krebsová et al. (2023) Genetické vyšetření v kardiologii: Souhrnné vyjádření a doporučení odborníků Pracovní skupiny kardiogenetiky při ČAPK/ČKS, SLG a ČSSL a ST při ČLS JEP – Příloha 10

Správná kardiogenetická péče vyžaduje ze své podstaty mezioborovou spolupráci kardiologů, klinických genetiků a molekulárních genetiků. Tato skupina je navíc od pilotní studie náhlé srdeční smrti v ČR, která byla dokončena v roce 2021, rozšířena také o spolupráci se soudními lékaři. Vzhledem k velkému množství kardiologických a genetických pracovišť i možných způsobů genetického testování, se jednotlivé postupy v rámci kardiogenetické péče mohou rozcházet. Proto došlo v roce 2023, pod vedením MUDr. Alice Krebsové, Ph.D. z Kardiologické kliniky IKEM, k sepsání doporučení, která byla publikována v časopise České kardiologické společnosti *Cor et Vasa*. Ta shrnují kritéria pro správný postup molekulárně genetického testování při vyšetření kardiovaskulárních onemocnění a náhlé srdeční smrti. Postup zahrnuje správný výběr pacientů a indikační kritéria, doporučený postup pro genetické testování a poradenství v kardiogenetice.

Doporučení se týkají také postupu filtrace, anotace, prioritizace a reportování zjištěných genetických variant. Zvláštní část je věnována postupu při vyšetření příbuzných, který vychází z doporučení Evropské kardiologické společnosti (ESC) ke kaskádovému screeningu u jedinců v riziku onemocnění (Charron et al. 2010). Molekulárně genetické vyšetření je tak doporučeno provádět především v situaci, kdy je z průběhu genetické konzultace pravděpodobné, že pacient i jeho rodina mají o genetické testování zájem a chtějí se dozvědět svůj zdravotní stav a možná rizika, případně chtějí zabránit narození potomka s rizikem onemocnění. Je doporučeno také v případě multiorgánových postižení, které vyžadují výraznou individuální péči.

5. ZÁVĚR

1/ Molekulárně genetická diagnostika kardiovaskulárních onemocnění je v České republice na velmi vysoké úrovni. To dokládají především publikace, jejichž výsledky jsou srovnatelné s těmi světovými. Je zaváděn multioborový přístup péče o pacienta, který vytváří pracovní skupiny kardiologů, molekulárních genetiků a soudních lékařů, což má za cíl komplexní přístup při diagnostice, léčbě i prevenci dědičných kardiovaskulárních onemocnění. Byl vytvořen národní registr genetických variant detekovaných u pacientů s dědičným kardiologickým onemocněním, do kterého kromě pracovišť v IKEM a FN Motol, postupně přispívají i další pracoviště z celé republiky. Cílem registru je sdílení anonymizovaných genetických dat mezi kardiogenetickými pracovišti, ale také záchyt populačně specifických variant v rámci České republiky a snaha usnadnit společné publikování kardiogenetických poznatků na republikové úrovni. Poznatky z pilotní studie náhlé srdeční smrti dále vedly ke vzniku webových stránek s informacemi pro příbuzné náhle zemřelých osob, ale i pro odbornou veřejnost na adrese <https://www.nahleumrti.cz/>. V roce 2023 byla v časopise České kardiologické společnosti publikována doporučení pro správný postup molekulárně genetického testování při vyšetření kardiovaskulárních onemocnění (Krebsová et al. 2023). Postup zahrnuje správný výběr a indikační kritéria, doporučený postup pro genetické testování při podezření na dědičné srdeční onemocnění či SCD.

Kardiogenetika je dynamicky se rozvíjejícím oborem. Reagovat na nově objevené kandidátní geny umožňuje zavedení celoexomového sekvenování pro rutinní testování. Tento sekvenační přístup umožňuje i zpětnou reanalýzu sekvenačních dat zaměřenou na tyto nové kandidátní geny. V genetické laboratoři dnes sledujeme stále rostoucí počet indikací ke kardiogenetickému vyšetření, v čemž může do jisté míry pomoci nyní zaváděná robotizace v postupu přípravy genetických knihoven a vysokokapacitní sekvenátory typu NextSeq 550 či NovaSeq 6000/X (Illumina.com). Pro správnou filtraci, anotaci, prioritizaci a reportování kauzálních a kandidátních variant je však i přes dostupnost řady bioinformatických nástrojů, vyžadována znalost a zkušenost molekulárního genetika.

2/ Studium genetických příčin náhlé srdeční smrti přináší velmi cenné poznatky, které jsou okamžitě využitelné v prevenci a péči o příbuzné v riziku, stejně tak u osob se stejnou klinickou diagnózou. V rámci této disertační práce byla úspěšně provedena pilotní studie náhlé srdeční smrti mladých osob v České republice, která poprvé propojila kardiologická a genetická pracoviště spolu s ústavy soudního lékařství v celé republice. Geneticky jsme vyšetřili celkem 100 nepříbuzných případů náhlé srdeční smrti a podařilo se nám u 22 % z nich identifikovat příčinnou genetickou variantu. U dalších 10 % případů byla detekována zajímavá varianta nejasného významu, kterou budeme v budoucnu podrobovat dalšímu zkoumání a případně reklasifikaci. Velice úspěšné bylo i cílené testování příbuzných v riziku, kdy se nám v rámci studie podařilo zachytit 87 příbuzných osob v riziku SCD. Ti byli převzati do preventivního sledování na pracovišti IKEM. Pilotní studie umožnila zahájit rutinní testování případů náhlé srdeční smrti. Od konce studie již bylo na našem pracovišti otestováno několik desítek případů SCD a genetické testování SCD se tak v ČR stává pevnou součástí kardiogenetické péče.

3/ Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) patří mezi hlavní příčiny dědičných onemocnění myokardu, ale také mezi hlavní příčiny náhlé srdeční smrti. Jejímu genetickému testování je tak věnována náležitá pozornost. Výsledky námi vyšetřovaného souboru pacientů s HCM umožnily vznik velké mezinárodní studie, která u 1468 pacientů s HCM posuzovala vliv genetické diagnózy na léčbu a celkový management péče o pacienta s identifikovanou kauzální variantou. Bylo zjištěno, že u pacientů s HCM, u nichž byla detekována patogenní varianta v některém z genů pro sarkomerické proteiny, dochází ke stejnému průběhu onemocnění a rozvoji komplikací ve srovnání s geneticky negativními pacienty. Genetická diagnóza u hypertrofické kardiomyopatie tak není důvodem ke změně přístupu v léčbě a celkovém managementu péče o pacienty s HCM a měla by sloužit primárně pouze pro potvrzení klinického nálezu a následně pro záchyt onemocnění u příbuzných v riziku onemocnění ještě před nástupem symptomů a jejich klinickým sledováním. K podobným závěrům došla i druhá studie, která zkoumala vliv geneticky pozitivních pacientů na úspěšnost léčby komplikací HCM pomocí alkoholové septální ablace.

4/ Genetické vyšetření aortopatií a obecně dědičných poruch pojivové tkáně se ukázalo jako nejsložitější oblast kardiogenetické diagnostiky s nejmenším procentem úspěšnosti při detekci patogenních variant. Je to způsobeno především častým překryvem fenotypových projevů různých onemocnění, rozdílnou penetrancí a expresivitou dokonce v rámci jedné rodiny, ale často také nesprávným nastavením indikačních kritérií. Každá nová informace v této oblasti je tak cenným střípkem v mozaice poznání této skupiny onemocnění. Vyšetření našeho souboru pacientů s aortopatiemi a dědičnými poruchami pojiva umožnilo dosud vznik dvou publikací ve spolupráci s pracovištěm prof. Barta Loyese (University of Antwerp, Belgie). V první z nich jsme se účastnili studie, při které byly zkoumány fenotypové projevy u pacientů s patogenní variantou v genu *LOX*. Jedná se o velmi vzácnou příčinu TAAD, jejíž fenotypový projev se liší od izolovaného postižení aorty až po závažné projevy systémového onemocnění pojiva. Vzhledem k vzácnosti onemocnění bylo dosud provedeno jen malé množství podobných studií a je zde stále nedostatek informací o vztahu patogenních variant k fenotypu postiženého a také k věku nástupu příznaků onemocnění. Výsledky této studie však naznačují, že rozsah fenotypových projevů závisí mimo jiné na typu patogenní varianty. Zatímco u trunkujících variant je pozorován závažný fenotyp s projevy systémového onemocnění pojiva, varianty typu missense jsou spojeny s izolovaným postižením aorty, případně v kombinaci s mírnými projevy nemoci.

Ve druhé publikaci jsme prezentovali 1 ze 2 popisovaných pacientů s patogenní variantou v genu *JAG1*, který je asociován s rozvojem Alagillova syndromu. U těchto pacientů však nebyly zaznamenány symptomy tohoto onemocnění, naopak u nich bylo zjištěno izolované aneurysma aorty. Genetické nálezy byly potvrzeny histologickým vyšetřením aorty. Tento výsledek jasně prokázal, že patogenní varianty v genu pro Alagillův syndrom mohou být příčinou izolovaného aneurysma aorty. Ukázal tak na vhodnost zařazení genu *JAG1* do panelu vyšetřovaných genů pro testování TAAD také u pacientů bez příznaků Alagillova syndromu.

5/ V Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol se nám v průběhu přípravy disertační práce podařilo úspěšně zahájit rutinní kardiogenetické testování pomocí WES. To nahradilo testování vybraného panelu genů a testování metodou CES. Navýšení sekvenční kapacity umožnilo zakoupení vysokokapacitního sekvenátoru NovaSeq 6000 Dx (illumina.com). Na základě několikaletých zkušeností byla pro přípravu knihoven zvolena platforma společnosti SOPHiA GENETICS (sophiagenetics.com), která kombinuje přípravu knihoven s bioinformatickou analýzou získaných FASTQ souborů. Detekce a prioritizace je tak prováděna v programu SOPHiA DDM, což nám umožňuje navíc kvalitní analýzu mitochondriálního genomu. Právě patogenní mitochondriální varianty mohou být vzácnou příčinou např. dilatační formy kardiomyopatie. V současné době probíhá zavádění robotizace do přípravy DNA knihoven, které by podle očekávání mělo přinést úsporu času laboratorních pracovníků, který je potřebný k hodnocení detekovaných variant.

Všechny vytyčené cíle této disertační práce byly splněny. Informace získané v průběhu její přípravy se daří okamžitě zavádět do laboratorní i klinické praxe, kde mohou být nástrojem ke zlepšení individualizované péče o kardiologicky nemocné pacienty a jejich příbuzné. Nyní se naše pozornost zaměřuje především na vylepšení nástrojů pro molekulárně genetickou diagnostiku aortopatií, vyšetření u pacientů po prodělané srdeční zástavě či na genetické vyšetření dědičných forem hyperlipidemií.

V současné chvíli jsou v přípravě následující publikace:

- a) Rozsáhlá publikace, ve které chceme ve spolupráci s Antverpskou univerzitou zhodnotit několikaleté zkušenosti s genetickým testováním pacientů s aortální disekcí
- b) Rozsáhlá studie příčin SCA u pacientů po prodělané KPR
- c) Kazuistika pacienta s delecí v genu *RYR2* a s kombinací fenotypových projevů CPVT a LVNC.

6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- 1 **ALTHALI, Nouf J.** a HENTGES, Kathryn E. Genetic insights into non-syndromic Tetralogy of Fallot. Online. *Frontiers in Physiology*. 2022, roč. 13. ISSN 1664-042X. doi.org/10.3389/fphys.2022.1012665.
- 2 **ARBELO, Elena;** PROTONOTARIOS, Alexandros; GIMENO, Juan R; ARBUSTINI, Eloisa; BARRIALES-VILLA, Roberto et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. Online. *European Heart Journal*. 2023, roč. 44, č. 37, s. 3503-3626. ISSN 0195-668X. doi.org/10.1093/eurheartj/ehad194
- 3 **BASSO, Cristina;** AGUILERA, Beatriz; BANNER, Jytte; COHLE, Stephan; D'AMATI, Giulia et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. Online. *Virchows Archiv*. 2017, roč. 471, č. 6, s. 691-705. ISSN 0945-6317. doi.org/10.1007/s00428-017-2221-0.
- 4 **BAUDHUIN, Linnea M.;** LAGERSTEDT, Susan A.; KLEE, Eric W.; FADRA, Numrah; OGLESBEE, Devin et al. Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2015, roč. 17, č. 4, s. 456-461. ISSN 15251578. doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.004.
- 5 **RODRIGUES BENTO, Jotte;** KREBSOVÁ, Alice; VAN GUCHT, Ilse; VALDIVIA CALLEJON, Irene; VAN BERENDONCKS, An et al. Isolated aneurysmal disease as an underestimated finding in individuals with JAG1 pathogenic variants. Online. *Human Mutation*. 2022, roč. 43, č. 12, s. 1824-1828. ISSN 1059-7794. doi.org/10.1002/humu.24433.
- 6 **BRUGADA R,** Campuzano O, Sarquella-Brugada G, et al. Brugada Syndrome. Online. UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE. *GeneReviews*®. 2005, akt. 2022-08-25. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1517/>
- 7 **BYERS PH.** Vascular Ehlers-Danlos Syndrome. Online. UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE. *GeneReviews*®. 1999, akt. 2019-02-21. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1494/>
- 8 **CAMPBELL, Matthew J.;** CZOSEK, Richard J.; HINTON, Robert B. a MILLER, Erin

- M. Exon 3 deletion of ryanodine receptor causes left ventricular noncompaction, worsening catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, and sudden cardiac arrest. Online. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2015, roč. 167, č. 9, s. 2197-2200. ISSN 1552-4825. doi.org/10.1002/ajmg.a.37140. [cit. 2024-06-07].
- 9 **ČESKÝ STATISTICKÝ ÚSTAV**. Zemřelí podle zkráceného seznamu příčin smrti v ČR a krajích 2018-2022. Online. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/zemreli-podle-zkraceneho-seznamu-pricin-smrti-v-cr-a-krajich-pololetni-data>.
 - 10 **DELISLE, Brian P.**; GEORGE, Alfred L.; NERBONNE, Jeanne M.; BASS, Joseph T.; RIPPLINGER, Crystal M. et al. Understanding Circadian Mechanisms of Sudden Cardiac Death: A Report From the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop, Part 2: Population and Clinical Considerations. Online. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2021, roč. 14, č. 11. ISSN 1941-3149. doi.org/10.1161/CIRCEP.121.010190
 - 11 **DIETZ, H.** FBN1-Related Marfan Syndrome. Online. UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE. GeneReviews®. 2001, akt. 2022-02-17. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1335/>.
 - 12 **DIETZ, HC** a PYERITZ, RE. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. Online. *Human Molecular Genetics*. 1995, roč. 4, č. suppl_1, s. 1799-1809. ISSN 0964-6906. doi.org/10.1093/hmg/4.suppl_1.1799.
 - 13 **FUJII, Yusuke**; MATSUMOTO, Yuichi; HAYASHI, Kenshi; DING, Wei-Guang; TOMITA, Yukinori et al. Contribution of a KCNH2 variant in genotyped long QT syndrome: Romano–Ward syndrome under double mutations and acquired long QT syndrome under heterozygote. *Journal of Cardiology*. 2017, roč. 70, č. 1, s. 74-79. ISSN 09145087. doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.09.010.
 - 14 **GENTILINI, Davide**; OLIVERI, Antonino; FAZIA, Teresa; PINI, Alessandro; MARELLI, Susan et al. NGS analysis in Marfan syndrome spectrum: Combination of rare and common genetic variants to improve genotype-phenotype correlation analysis. Online. *PLOS ONE*. 2019, roč. 14, č. 9. ISSN 1932-6203. doi.org/10.1371/journal.pone.0222506.
 - 15 **GERECKE, Birgit J.** a ENGBERDING, Rolf. Noncompaction Cardiomyopathy—History

- and Current Knowledge for Clinical Practice. Online. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, roč. 10, č. 11. ISSN 2077-0383. doi.org/10.3390/jcm10112457.
- 16 **GOLDSTEIN, Sidney**. The necessity of a uniform definition of sudden coronary death: Witnessed death within 1 hour of the onset of acute symptoms. *American Heart Journal*. 1982, roč. 103, č. 1, s. 156-159. ISSN 00028703. doi.org/10.1016/0002-8703(82)90552-X.
- 17 **GROFFEN, AJ; BIKKER, H a CHRISTIAANS, I**. Long QT Syndrome Overview. Online. UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE. *GeneReviews®*. 2003, akt.2022-02-17. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1129/>.
- 18 **HASSANE, Sabine; CLAIJ, Nanna; LANTINGA-VAN LEEUWEN, Irma S.; VAN MUNSTEREN, J. Conny; VAN LENT, Natascha et al**. Pathogenic Sequence for Dissecting Aneurysm Formation in a Hypomorphic Polycystic Kidney Disease 1 Mouse Model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, roč. 27, č. 10, s. 2177-2183. ISSN 1079-5642. doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149252.
- 19 **HOUGE, Gunnar; LANER, Andreas; CIRAK, Sebahattin; DE LEEUW, Nicole; SCHEFFER, Hans et al**. Stepwise ABC system for classification of any type of genetic variant. *European Journal of Human Genetics*. 2022, roč. 30, č. 2, s. 150-159. ISSN 1018-4813. doi.org/10.1038/s41431-021-00903-z.
- 20 **CHARRON, P.; ARAD, M.; ARBUSTINI, E.; BASSO, C.; BILINSKA, Z. et al**. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*. 2010, roč. 31, č. 22, s. 2715-2726. ISSN 0195-668X. doi.org/10.1093/eurheartj/ehq271.
- 21 **INABA, Yu; OSAKO, Motohiko; AOKI, Michiko; KASAI, Mio a YAMABE, Kentaro**. Aortic Dissection in Familial Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Annals of Vascular Diseases*. 2021, roč. 14, č. 1, s. 68-70. ISSN 1881-641X. doi.org/10.3400/avd.cr.20-00149.
- 22 **KAMIAR, Ali; ALITTER, Qusai; CAPCHA, Jose M. C.; SAAD, Ali; WEBSTER, Keith A. et al**. Ascending aortic aneurysm and histopathology in Alport syndrome: a case report.

- BMC Nephrology*. 2023, roč. 24, č. 1. ISSN 1471-2369. doi.org/10.1186/s12882-023-03345-5.
- 23 **KASHTAN, Clifford E.**; SEGAL, Yoav; FLINTER, Frances; MAKANJUOLA, David; GAN, Jay-Sen et al. Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010, roč. 25, č. 11, s. 3554-3560. ISSN 1460-2385. doi.org/10.1093/ndt/gfq271.
- 24 **KREBSOVÁ, Alice**; KUTÍLKOVÁ, Eva; ZOUBKOVÁ, Veronika; TAVAČOVÁ, Terezia; PELDOVÁ, Petra et al. (Czech Association for Preventive Cardiology Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for Inherited Cardiovascular Diseases). *Cor et Vasa*. 2023, roč. 65, č. 5, s. 798-805. ISSN 00108650. doi.org/10.33678/cor.2023.057.
- 25 **LAHROUCHI, Najim**; RAJU, Hariharan; LODDER, Elisabeth M.; PAPTAEODOROU, Stathis; MILES, Chris et al. The yield of postmortem genetic testing in sudden death cases with structural findings at autopsy. *European Journal of Human Genetics*. 2020, roč. 28, č. 1, s. 17-22. ISSN 1018-4813. doi.org/10.1038/s41431-019-0500-8.
- 26 **LANNER, J. T.**; GEORGIU, D. K.; JOSHI, A. D. a HAMILTON, S. L. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, roč. 2, č. 11, s. a003996-a003996. ISSN 1943-0264. doi.org/10.1101/cshperspect.a003996.
- 27 **LARSEN, Maiken Kudahl**; CHRISTIANSEN, Sofie Lindgren; HERTZ, Christin Løth; FRANK-HANSEN, Rune; JENSEN, Henrik Kjærulf et al. Targeted molecular genetic testing in young sudden cardiac death victims from Western Denmark. *International Journal of Legal Medicine*. 2020, roč. 134, č. 1, s. 111-121. ISSN 0937-9827. doi.org/10.1007/s00414-019-02179-x.
- 28 **LOEYS, B. L.**; DIETZ, H. C.; BRAVERMAN, A. C.; CALLEWAERT, B. L.; DE BACKER, J. et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2010, roč. 47, č. 7, s. 476-485. ISSN 0022-2593. doi.org/10.1136/jmg.2009.072785.

- 29 **LOEYS, BL** a **DIETZ, HC**. Loeys-Dietz Syndrome. Online. UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE. *GeneReviews*®. 2008, akt. 2018-03-01. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1133/>.
- 30 **LOEYS, Bart L.**; **SCHWARZE, Ulrike**; **HOLM, Tammy**; **CALLEWAERT, Bert L.**; **THOMAS, George H.** et al. Aneurysm Syndromes Caused by Mutations in the TGF- β Receptor. *New England Journal of Medicine*. 2006, roč. 355, č. 8, s. 788-798. ISSN 0028-4793. doi.org/10.1056/NEJMoa055695.
- 31 **MALFAIT, F**; **SYMOENS, S** a **SYX, D**. Classic Ehlers-Danlos Syndrome. Online. UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE. *GeneReviews*®. 2007, akt. 2024-02-01. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1244/>.
- 32 **MANN, Kathy** a **OGILVIE, Caroline Mackie**. QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenatal Diagnosis*. 2012, roč. 32, č. 4, s. 309-314. ISSN 0197-3851. doi.org/10.1002/pd.2945.
- 33 **MARFÁNEK.CZ**. Gentská kritéria pro diagnostiku Marfanova syndromu. Online. Marfánek.cz. Dostupné z: <https://www.marfanek.cz/cz/diagnostika-2/>
- 34 **MARON, Barry J**. Hypertrophic Cardiomyopathy. *JAMA*. 2002, roč. 287, č. 10. ISSN 0098-7484. doi.org/10.1001/jama.287.10.1308
- 35 **MILEWICZ, Dianna M.**; **GUO, Dongchuan**; **HOSTETLER, Ellen**; **MARIN, Isabella**; **PINARD, Amelie C.** et al. Update on the genetic risk for thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections: implications for clinical care. *The Journal of Cardiovascular Surgery*. 2021, roč. 62, č. 3. ISSN 00219509. doi.org/10.23736/S0021-9509.21.11816-6.
- 36 **OSTBERG, Nicolai**; **ZAFAR, Mohammad**; **ZIGANSHIN, Bulat** a **ELEFTERIADES, John**. The Genetics of Thoracic Aortic Aneurysms and Dissection: A Clinical Perspective. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 2. ISSN 2218-273X. doi.org/10.3390/biom10020182.
- 37 **PRIORI, Silvia G.**; **BLOMSTRÖM-LUNDQVIST, Carina**; **MAZZANTI, Andrea**; **BLOM, Nico**; **BORGGREFE, Martin** et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *European Heart Journal*. 2015, roč. 36, č. 41, s. 2793-2867. ISSN 0195-668X. doi.org/10.1093/eurheartj/ehv316.

- 38 **RAHMAN, E;** NIAZ, FA; AL-SUWAIDA, A; NAHRIR, S; BASHIR, M et al. Analysis of causes of mortality in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center study. Online. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009, roč. 20, č. 5, s. 806-810.
- 39 **RICHARDS, Sue;** AZIZ, Nazneen; BALE, Sherri; BICK, David; DAS, Soma et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine.* 2015, roč. 17, č. 5, s. 405-424. ISSN 10983600. doi.org/10.1038/gim.2015.30.
- 40 **RIPA, R;** GEORGE, T a SHUMWAY, KR. Physiology, Cardiac Muscle. Online. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.* 2023, akt. 2023-08-30. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572070/>.
- 41 **SAKAI, Lynn Y.;** KEENE, Douglas R.; RENARD, Marjolijn a DE BACKER, Julie. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene.* 2016, roč. 591, č. 1, s. 279-291. ISSN 03781119. doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.033.
- 42 **SCHULTHEISS, Heinz-Peter;** FAIRWEATHER, DeLisa; CAFORIO, Alida L. P.; ESCHER, Felicitas; HERSHBERGER, Ray E. et al. Dilated cardiomyopathy. *Nature Reviews Disease Primers.* 2019, roč. 5, č. 1. ISSN 2056-676X. doi.org/10.1038/s41572-019-0084-1.
- 43 **SILVERIO, Angelo;** PROTA, Costantina; DI MAIO, Marco; POLITO, Maria Vincenza; COGLIANI, Francesco Maria et al. Aortic dissection in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: A series of two cases and a review of the Literature. *Nephrology.* 2015, roč. 20, č. 4, s. 229-235. ISSN 1320-5358. doi.org/10.1111/nep.12373.
- 44 **SLATKO, Barton E.;** GARDNER, Andrew F. a AUSUBEL, Frederick M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology.* 2018, roč. 122, č. 1. ISSN 1934-3639. doi.org/10.1002/cpmb.59.
- 45 **STILES, Martin K.;** WILDE, Arthur A.M.; ABRAMS, Dominic J.; ACKERMAN, Michael J.; ALBERT, Christine M. et al. 2020 APHRS/HRS expert consensus statement on the investigation of decedents with sudden unexplained death and patients with sudden cardiac arrest, and of their families. *Heart Rhythm.* 2021, roč. 18, č. 1, s. e1-e50. ISSN

15475271. doi.org/10.1016/j.hrthm.2020.10.010.

- 46 **SUN, Heather Y.** Prenatal diagnosis of congenital heart defects: echocardiography. *Translational Pediatrics*. 2021, roč. 10, č. 8, s. 2210-2224. ISSN 22244336. doi.org/10.21037/tp-20-164. [cit. 2024-06-16].
- 47 **TOMEK, Viktor;** GILÍK, Jiří; JIČÍNSKÁ, Hana; PAVLÍČEK, Jan; NAVRÁTIL, Jiří et al. Prenatální detekce srdečních vad a její důsledky. *Česko-slovenská pediatrie*. 2018, roč. 73, č. 5, s. 284-290. ISSN 0069-2328.
- 48 **VAN DER VOORN, Stephanie M;** TE RIELE, Anneline S J M; BASSO, Cristina; CALKINS, Hugh; REMME, Carol Ann et al. Arrhythmogenic cardiomyopathy: pathogenesis, pro-arrhythmic remodelling, and novel approaches for risk stratification and therapy. *Cardiovascular Research*. 2020, roč. 116, č. 9, s. 1571-1584. ISSN 0008-6363. doi.org/10.1093/cvr/cvaa084.
- 49 **VERHAGEN, Judith M.A.;** KEMPERS, Marlies; COZIJNSEN, Luc; BOUMA, Berto J.; DUIJNHOUWER, Anthonie L. et al. Expert consensus recommendations on the cardiogenetic care for patients with thoracic aortic disease and their first-degree relatives. *International Journal of Cardiology*. 2018, roč. 258, s. 243-248. ISSN 01675273. doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.01.145.
- 50 **WILDE, Arthur A M;** SEMSARIAN, Christopher; MÁRQUEZ, Manlio F; SHAMLOO, Alireza Sepehri; ACKERMAN, Michael J et al. European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the state of genetic testing for cardiac diseases. *EP Europace*. 2022, roč. 24, č. 8, s. 1307-1367. ISSN 1099-5129. doi.org/10.1093/europace/euac030.
- 51 **ZEPPENFELD, Katja;** TFELT-HANSEN, Jacob; DE RIVA, Marta; WINKEL, Bo Gregers; BEHR, Elijah R et al. 2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *European Heart Journal*. 2022, roč. 43, č. 40, s. 3997-4126. ISSN 0195-668X. doi.org/10.1093/eurheartj/ehac262.