

Reporte de caso

Autopsia molecular en muerte súbita cardíaca neonatal mediante secuenciación de siguiente generación (NGS): presentación de un caso

Eliana del Pilar Garzón Venegas^a
Cladelis Rubio Gómez MD^b
Suleima Carpetá Sánchez^c
Jennifer Vélez Segura^d
Jenny Blanco Gómez^e
Paola Andrea Beltrán Moreno^f
Diana Sánchez MD^g
Claudia Juliana Serrano MD^h

^{a,d}Departamento de Bioinformática, Centro de Investigación en Genética Humana y Reproductiva GENETIX, Bogotá D.C., Colombia

^{b,h}Dirección Médica, Centro de Investigación en Genética Humana y Reproductiva GENETIX, Bogotá D.C., Colombia

^{c,e,j}Departamento Biología Molecular, Centro de Investigación en Genética Humana y Reproductiva GENETIX, Bogotá D.C., Colombia

^gGenética clínica, Clínica pediátrica Colsanitas, Bogotá D.C., Colombia

RESUMEN

Presentamos un caso de muerte súbita de una lactante de tres meses de edad. La autopsia reveló una miocardiopatía hipertrófica y la muestra de sangre del cordón umbilical almacenada fue utilizada para análisis molecular. Mediante la secuenciación de siguiente generación (NGS) de 4813 genes (exoma clínico), se identificó una variante patogénica en el gen ELAC2, (c.210_222 del p.Gly71ThrfsTer26) en estado heterocigoto y otra variante probablemente patogénica en el mismo gen (c.1177C>T p.His393Tyr) en estado heterocigoto, asociadas con miocardiopatía hipertrófica. Adicionalmente, se identificó una variante patogénica en el exón 358 del gen TTN, (c.104515C>T, het p.Arg34839X) y una VUS (variante de significado incierto) en el gen MYPN (c.2428C>T, p.Arg810Cys), la cual podría tener un efecto aditivo en el fenotipo de la paciente. Así mismo se observa un polimorfismo de riesgo en el exón 16 en el gen LRP8, asociado con enfermedad coronaria (CAD) e infarto de miocardio prematuros (MI) (NM_017522: c.2066G>A, het, p.R689Q). La cardiopatía hereditaria es una causa probable de muerte súbita cardíaca, el análisis molecular por NGS puede ayudar a realizar un diagnóstico precoz para predecir a edad temprana pacientes con riesgo potencial de muerte súbita cardíaca así como un asesoramiento genético dirigido.

Palabras clave: autopsia molecular, muerte súbita cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, secuenciación de próxima generación (NGS).

© 2018 Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud - FUCS.
Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:
Fecha recibido: octubre 13 de 2017
Fecha aceptado: noviembre 11 de 2017

Autor para correspondencia.
Dr. Juan Carlos Bonilla
juanbonillaj@gmail.com

DOI
<https://doi.org/10.31260/RepertMedCir.v27.n1.2018.131>

ABSTRACT

We present the case of sudden death in a three month old female infant. The girl died of sudden death, and the autopsy revealed a hypertrophic cardiomyopathy as the underlying alteration. The stored umbilical cord blood sample was used for molecular analysis. A pathogenic heterocigous variant in ELAC2 (c.210_222del, p.Gly71ThrfsTer26), and another probably pathogenic variant in the same gene (c.1177C>T p.His393Tyr,het) associated with hypertrophic cardiomyopathy was identified. In addition, a pathogenic variant is identified in exon 358 of the TTN gene (c.104515C>T, het p.Arg34839X,het) and a VUS (variant of uncertain significance) in the MYPN gene (c.2428C>T, p.Arg810Cys,het), which may have an additive effect on the patient's phenotype. A risk polymorphism at exon 16 in the LRP8 gene, associated with premature coronary artery disease (CAD) and premature myocardial infarction (MI) (NM_017522: c.2066G>A, het, p.R689Q) was also found. Hereditary heart disease is a probable cause of sudden cardiac death, molecular analysis by NGS can help an early diagnosis and to predict at an early age, the risk of sudden cardiac death as well as directed genetic counseling.

Key words: molecular autopsy, sudden cardiac death, hypertrophic cardiomyopathy, next generation sequencing (NGS).

© 2018 Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud - FUCS.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

INTRODUCCIÓN

Cada año miles de individuos mueren de manera súbita antes de los 45 años de edad, cuyas causas más frecuentes son muerte súbita infantil, embolia pulmonar, rotura de aneurisma aórtico y muerte súbita cardíaca.¹ Se ha descrito que esta última se debe con frecuencia a cardiopatías estructurales, incluyendo las miocardiopatías hipertrófica, dilatada y arritmogénica ventricular derecha, miocarditis y trastornos arritmogénicos primarios (síndrome QT largo congénito, síndrome de Brugada y taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica)^{2,3} las cuales tienen una base genética importante.^{4,5} En algunos casos de muerte súbita la causa no se logra determinar, incluso después de la autopsia clínica, siendo imposible llegar a un diagnóstico que es crucial. Las nuevas tecnologías de secuenciación (secuenciación de próxima generación) han hecho posible examinar en detalle grandes porciones del genoma humano a un costo bajo⁶, permitiendo la realización de pruebas genéticas moleculares postmortem denominadas autopsia molecular. El objetivo de las pruebas genéticas postmortem es tratar de identificar la causa genética de la muerte. Estudios recientes demuestran que la autopsia molecular ayuda a identificar la enfermedad cardíaca hereditaria en un 25 a 35% de los casos de muerte súbita cardíaca en jóvenes.⁷⁻⁹

CASO CLÍNICO

Una paciente de 38 años, G2P1A0V0, consultó por embarazo de 8 semanas, acompañada de su pareja para asesoramiento genético con antecedente de una hija que falleció a los 3 meses de edad a causa de muerte súbita. Los padres no son

consanguíneos y refieren que en ocasiones la recién nacida presentó episodios de tos asociados con cianosis como única sintomatología. En el examen de autopsia se evidencia una miocardiopatía hipertrófica. Como antecedentes de importancia, en la línea materna su madre, hermana, sobrina y prima en segundo grado de consanguinidad han presentado fibrilación auricular tratada con ablación. La paciente trae reporte de exoma (realizado en otra institución) en el que identificaron 3 variantes de interés. TNN: NM_001267550.2, c.63109C>T, p.Val21037Met, en estado heterocigoto, clasificada como VUS (variante de significado incierto) según los criterios PM2, PP3 y BP1 de la ACMG. GAA: NM_001079803, c.1064T>C, p.Leu355Pro, en estado heterocigoto, clasificada como VUS según los criterios PM1, PM2 y PP3 de la ACMG y reportada como patogénica en la base de datos Clinvar asociada con enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II de herencia autosómica recesiva. ELAC2:c.210_222del, p.Gly71ThrfsTer26, en estado heterocigoto, clasificada como patogénica según el criterio PVS1 de la ACMG. Mutaciones bialélicas en ELAC2 se han asociado con deficiencia de fosforilación oxidativa combinada tipo 17 con herencia autosómica recesiva.

Se revisa el exoma clínico del padre de la lactante fallecida (realizado en otra institución) en el que identificaron 3 variantes de interés. TTN: NM_001256850.1, c.99592C>T, p.Arg33198X, en estado heterocigoto, clasificada como patogénica según los criterios PVS1, PM2 y PP3 de la ACMG. ELAC2: NM_018127.6, c.1177C>T (p.His393Tyr), en estado heterocigoto, clasificada como probablemente patogénica según los criterios PM1, PM2, PM3 y PP4 de la ACMG. MYPN: NM_0012567.1, c.2428C>T, p.Arg810Cys, clasificada como VUS (variante de significado incierto) según los criterios de la ACMG. Con las células almacenadas del cordón umbilical de la recién nacida se realiza análisis del exoma clínico para asesoramiento genético y posible diagnóstico prenatal en el embarazo actual.

METODOLOGÍA

El análisis genético por NGS se lleva a cabo en ADN extraído de células madre de cordón umbilical. Se realiza construcción de genotecas con Kit Nextera XT (Illumina), secuenciación de las librerías (2x150) en el secuenciador MiSeq (Illumina) y análisis bioinformático de 4813 genes contenidos en la genoteca TruSight One de Illumina, obteniendo una cobertura total de 98,7% y 95,7% con cobertura mínima 20X.

Se identificaron en total 7313 variantes, previamente anotadas por VarintStudio3 y ANNOVAR. Para cada variación genética identificada se realizó el análisis de la frecuencia poblacional en las bases de datos EXAC, 1000 Genomes y ESP. En la base de datos de polimorfismo de nucleótidos únicos (dbSNP) se revisa la información disponible para cada variante. Como bases de datos de mutaciones causantes de enfermedades se utilizaron las de mutación de genes humanos (HGMD), COSMIC y ClinVar. Se incluyeron 11 tipos de algoritmos predictivos *in silico* para evaluar la patogenicidad de las variantes identificadas. Se siguen las normas y directrices para la interpretación de variantes de secuencia sugeridas por el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) para la clasificación de causalidad de cada una de las variantes.^{10,11}

RESULTADOS

A partir de la autopsia molecular realizada mediante el análisis de secuenciación de siguiente generación (NGS), se identificaron en total 7313 variantes de secuencia. Se realizó filtrado bioinformático teniendo en cuenta la calidad de las variantes, frecuencia poblacional, información suministrada por las diversas bases de datos y predicción *in silico*. Se identificaron cuatro variantes de interés. ELAC2:(NM_018127.6) c.210_222del (p.Gly71ThrfsTer26), en estado heterocigoto, clasificada como patogénica según el criterio PVS1 de la ACMG. La deleción de 13 nucleótidos en las posiciones 210-222 (del-GGGCGCCGCGCTC) ocasiona un codón prematuro de parada y como consecuencia una proteína truncada. Esta variante no ha sido reportada en la literatura y se analiza con 3 algoritmos de predicción de patogenicidad que la clasifican como patogénica, ha sido previamente identificada en la madre de la lactante. En este mismo gen se identifica la variante ELAC2 (NM_018127.6) c.1177C>T (p.His393Tyr) en estado heterocigoto, clasificada como probablemente patogénica según los criterios PM1, PM2, PM3 y PP4 de la ACMG. Esta variante no ha sido reportada en la literatura y es analizada con 12 algoritmos de predicción de patogenicidad de los cuales 6 la clasifican como benigna, 5 como patogénica y uno con efecto medio, ha sido previamente identificada en el padre de la lactante. Variantes bialélicas en el gen *ELAC2* se han asociado con deficiencia combinada de fosforilación oxidativa 17 (MIM 615440) de herencia autosómica

recesiva. La presencia de estas dos variantes en la paciente es altamente sugestivo de ser la causa del fenotipo.

Adicionalmente se identifica la variante c.104515C>T (p.Arg34839X) en el exón 358 del gen *TTN* (NM_001267550) en estado heterocigoto. Es clasificada como patogénica según los criterios PVS1, PM2, PP3 de la ACMG. El cambio de un nucleótido en la posición 104515(C>T) ocasiona un codón prematuro de parada y como consecuencia una proteína truncada. Esta variante no ha sido reportada en la literatura y es analizada con 11 algoritmos de predicción de patogenicidad de los cuales 9 la clasifican como patogénica y 2 de ellos la clasifican con un efecto intermedio. Esta variante es identificada en el padre de la niña en estado heterocigoto (nomenclada bajo otro transcripto como NM_001256850.1, c.99592C>T, p.Arg33198X). Variantes heterocigotas en el gen *TTN* se han asociado con cardiomiopatía hipertrófica familiar tipo 9 (MIM 613765) de herencia autosómica dominante.

Así mismo, se identifica la variante c.2066G>A (p.R689Q) en el exón 16 del gen *LRP8* (NM_017522) en estado heterocigoto. Se clasifica como benigna según los criterios PM1, PP3, BA1, BS1 de la ACMG. En la base de datos pública Clinvar y OMIM aparece clasificada como un polimorfismo de susceptibilidad a infarto de miocardio (MIM 608446). Sin embargo debido a su alta frecuencia poblacional MAF: 0.14 (A) no es posible atribuir a esta variante un efecto patogénico. Se desconoce si podría tener un efecto aditivo en el fenotipo de la lactante.

También se identifican las variantes GAA: NM_001079803, c.1064T>C, p.L355P, en estado heterocigoto, y MYPN: NM_0012567.1, c.2428C>T, p.Arg810Cys, en estado heterocigoto, previamente identificadas en la madre y padre respectivamente.

DISCUSIÓN

La autopsia molecular tiene como objetivo identificar o confirmar la causa de la muerte, afirmar un diagnóstico sospechoso, proporcionar a la familia una explicación de la muerte y brindar un asesoramiento genético objetivo a otros miembros de la familia para prevenir futuros eventos de muerte súbita. Se ha descrito en la literatura que esta desafiante prueba molecular ha logrado determinar la causa genética probable de muerte en una gran proporción de casos con dictámenes de autopsia negativos.^{1,12}

La miocardiopatía en niños se asocia con un grupo genéticamente heterogéneo de trastornos que cursan con una morbilidad y mortalidad significativas. En el transcurso del diagnóstico pueden presentarse consecuencias letales y de acuerdo con estudios poblacionales se presentan en un tercio de los niños afectados, con un fenotipo más severo en lactantes.^{13,14} El gen *ELAC2* (MIM # 605367) se compone de 24 exones codificantes, y se encuentra localizado en el cromosoma 17p12, el cual codifica una proteína de 92 kDa, compuesta por 826

aminoácidos. Esta proteína es una endonucleasa involucrada en la maduración y procesamiento del ARNt mitocondrial¹⁵, la cual es crucial en la síntesis de ADN codificado en mtDNA.¹⁶ Por medio de estudios funcionales se determina el papel de *ELAC2* en el procesamiento del RNA de transferencia mitocondrial, y su asociación con la función de cadena respiratoria en el músculo esquelético. Los pacientes con variantes patogénicas en el gen *ELAC2* han mostrado un defecto significativo del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS), que resulta en un trastorno severo a temprana edad, el cual se detecta en el músculo esquelético de los individuos afectados.¹⁶

Hay variantes en el gen *ELAC2* en estado bialélico que se han relacionado con deficiencia combinada de fosforilación oxidativa-17, la cual tiene como principal manifestación clínica la miocardiopatía hipertrófica severa de inicio infantil, y en algunos casos asociada con hipotonía, acidosis láctica, crecimiento deficiente y retraso en el desarrollo psicomotor. Los pacientes que presentan esta condición clínica tienen un pronóstico de vida reservado, de acuerdo con el tipo de variantes presentes en el gen.^{17,18} Teniendo en cuenta la severidad del fenotipo de la lactante descrita en el presente caso y la presentación del cuadro clínico, podríamos deducir que las variantes en el gen *ELAC2* son las causales del fenotipo.

El gen *TTN* (Conectina) (MIM #188840) se compone de 364 exones (un primer exón no codificante seguido por 363 exones codificantes), se encuentra en el cromosoma 2q31 y transcribe un mRNA de más de 100 kb, que codifica para una proteína con una longitud de 35991 aminoácidos y 4.200 kDa.^{19,20} Es la proteína más grande hasta ahora descrita y desempeña un papel clave a nivel estructural, mecánico, de desarrollo y de regulación en músculos cardíacos y esqueléticos, ya que constituye el tercer tipo de filamento más abundante en estos tejidos junto con la actina y la miosina.^{21,22} Su expresión se extiende desde el disco -Z a la línea -M del sarcómero.²³

Las mutaciones heterocigotas en *TTN* se han relacionado con diferentes patologías como miocardiopatía dilatada, IG (MIM 604145), cardiomiopatía hipertrófica familiar (MIM 613765) autosómica dominante, distrofia muscular cintura miembro tipo 2J (MIM 608807) autosómica recesiva, miopatía proximal con afectación temprana del músculo respiratorio (MIM 603689), miopatía de Salih (MIM 611705) autosómica recesiva y distrofia muscular tibial tardía (MIM 600334) autosómica dominante. La mayoría de variantes patogénicas se han asociado con un fenotipo cardíaco y en menor proporción con fenotipos asociados con distrofia muscular.²⁴ El *TTN* ha sido catalogado como un gen mayor de cardiomiopatía.²⁵ La variante identificada en la paciente *TTN*, c.104515C>T (p.Arg34839X) afecta directamente un dominio catalítico proteína quinasa, teniendo un efecto drástico a nivel de la proteína, lo cual podría aportar un efecto aditivo al fenotipo severo presentado en la paciente con miocardiopatía hipertrófica y muerte súbita.

La variante *MYPN*, c.2428C>T, p.Arg810Cys, identificada en el padre y la recién nacida, podría tener relación con un efecto aditivo en el fenotipo debido a que mutaciones heterocigotas en este gen se han asociado con miocardiopatía dilatada (MIM 615248) de herencia autosómica dominante, miocardiopatía restrictiva familiar 4 (MIM 615248) de herencia autosómica dominante y cardiomiopatía hipertrófica 22 (MIM 615248) de herencia autosómica dominante.

La variante *GAA*, c.1064T>C, p.L355P, heterocigota, identificada en la madre y la recién nacida no se encuentra relacionada con muerte súbita cardíaca o fenotipo cardíaco. Hay mutaciones bialélicas en este gen que han sido relacionadas con enfermedad de Pompe de herencia autosómica recesiva. Al encontrarse en estado heterocigoto indicarían un estado de portador en la madre e hija, sin efectos fenotípicos.

La evaluación detallada de la historia clínica, en especial la familiar, y un examen posmortem completo son esenciales. En los casos de muerte súbita en los que no se identifica ninguna causa de muerte es fundamental la evaluación clínica oportuna y dirigida, junto con las pruebas genéticas moleculares posmortem con la participación de un equipo clínico multidisciplinario especializado. La secuenciación de próxima generación (NGS) ha hecho posible el análisis simultáneo de genes de interés en la búsqueda de posibles causas genéticas de la muerte súbita.

En este caso se identificaron dos variantes potencialmente relacionadas al fenotipo de la lactante en el gen *ELAC2*, una patogénica en el gen *TTN* y un VUS en el gen *MYPN*, que podrían tener un efecto aditivo sobre el fenotipo de la menor. El riesgo de recurrencia para esta familia es del 25% lo que los hace candidatos a diagnóstico genético preimplantatorio (DGP).

CONCLUSIONES

Presentamos una autopsia molecular en un caso de muerte súbita cardíaca neonatal, en el cual se realizó análisis genético NGS en la muestra almacenada de sangre de cordón umbilical, identificando las variantes causales del fenotipo de la recién nacida y la razón de la muerte súbita. El análisis molecular por NGS permitió determinar la causa genética de la miocardiopatía hipertrófica en la recién nacida, logrando realizar asesoramiento genético objetivo, prevención y cálculo del riesgo para futuras gestaciones en esta familia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Torkamani A, Muse ED, Spencer EG, Rueda M, Wagner GN, Lucas JR, et al. Molecular Autopsy for Sudden Unexpected Death. *Jama*. 2016;316(14):1492-4. Epub 2016/10/12.
2. Eckart RE, Shry EA, Burke AP, McNear JA, Appel DA, Castillo-Rojas LM, et al. Sudden death in young adults: an autopsy-based series of a population undergoing active surveillance. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(12):1254-61. Epub 2011/09/10.
3. Semsarian C, Ingles J, Wilde AA. Sudden cardiac death in the young: the molecular autopsy and a practical approach to surviving relatives. *Eur Heart J*. 2015;36(21):1290-6. Epub 2015/03/15.
4. Wilde AA, Behr ER. Genetic testing for inherited cardiac disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(10):571-83. Epub 2013/08/01.
5. Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, Syrris P, Hughes S, Tome Esteban MT, et al. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J*. 2008;29(13):1670-80. Epub 2008/05/30.
6. Lahrouchi N, Behr ER, Bezzina CR. Next-Generation Sequencing in Post-mortem Genetic Testing of Young Sudden Cardiac Death Cases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2016;3:13. Epub 2016/06/16.
7. Tester DJ, Ackerman MJ. The molecular autopsy: should the evaluation continue after the funeral? *Pediatr Cardiol*. 2012;33(3):461-70. Epub 2012/02/07.
8. Behr E, Wood DA, Wright M, Syrris P, Sheppard MN, Casey A, et al. Cardiological assessment of first-degree relatives in sudden arrhythmic death syndrome. *Lancet*. 2003;362(9394):1457-9. Epub 2003/11/07.
9. Tan HL, Hofman N, van Langen IM, van der Wal AC, Wilde AA. Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation*. 2005;112(2):207-13. Epub 2005/07/07.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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 : official journal of the American College of Medical Genetics = Genet. Med.* 2015;17(5):405-24. Epub 2015/03/06.
11. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *American journal of human genetics*. 2017;100(2):267-80. Epub 2017/01/31.
12. Bagnall RD, Semsarian C. Role of the molecular autopsy in the investigation of sudden cardiac death. *Progress in Pediatric Cardiology*. 2017;45:17-23.
13. Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, et al. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children. *Jama*. 2006;296(15):1867-76. Epub 2006/10/19.
14. Colan SD, Lipshultz SE, Lowe AM, Sleeper LA, Messere J, Cox GF, et al. Epidemiology and cause-specific outcome of hypertrophic cardiomyopathy in children: findings from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Circulation*. 2007;115(6):773-81. Epub 2007/01/31.
15. Rossmannith W. Localization of human RNase Z isoforms: dual nuclear/mitochondrial targeting of the ELAC2 gene product by alternative translation initiation. *PLoS One*. 2011;6(4):e19152. Epub 2011/05/12.
16. Haack TB, Kopajtich R, Freisinger P, Wieland T, Rorbach J, Nicholls TJ, et al. ELAC2 mutations cause a mitochondrial RNA processing defect associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2013;93(2):211-23. Epub 2013/07/16.
17. Shinwari ZMA, Almesned A, Alakhfash A, Al-Rashdan AM, Faqeih E, Al-Humaidi Z, et al. The Phenotype and Outcome of Infantile Cardiomyopathy Caused by a Homozygous ELAC2 Mutation. *Cardiology*. 2017;137(3):188-92. Epub 2017/04/26.
18. Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, et al. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*. 2001;89(11):1065-72. Epub 2001/11/22.
19. Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, et al. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet*. 2002;71(3):492-500. Epub 2002/07/30.
20. Furst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*. 1988;106(5):1563-72. Epub 1988/05/01.
21. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry Biochemistry (Mosc)*. 2012;77(13):1515-35. Epub 2013/02/06.
22. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ. Res*. 2004;94(3):284-95. Epub 2004/02/21.
23. Chauveau C, Bonnemann CG, Julien C, Kho AL, Marks H, Talim B, et al. Recessive TTN truncating mutations define novel forms of core myopathy with heart disease. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):980-91. Epub 2013/10/10.
24. Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012;366(7):619-28. Epub 2012/02/18.

