

Bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp: Phát hiện đột biến mới bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ vùng mã hoá

Nguyễn Minh Hiệp¹, Bùi Chí Bảo^{2,3,4}, Nguyễn Trường An⁵, Vũ Bảo Quốc⁶, Phạm Hồ Thuật Khoa⁶
Lê Thị Thu Thủy⁶, Phan Sỹ Đức⁵, Nguyễn Văn Phúc⁶, Lê Minh Trọng⁶, Nguyễn Thị Huỳnh Nga⁶

Trung tâm Công nghệ bức xạ, Viện nghiên cứu hạt nhân¹

Trung tâm Y Sinh học Phân tử, Đại học Y Dược²

Đơn vị Sinh học Phân tử Di truyền, Bệnh viện Nhi đồng 2³

Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh⁴

Khoa Sau Đại học, Trường Đại học Đà Lạt⁵

Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt⁶

TÓM TẮT

Cơ sở nghiên cứu: Bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC) là một bệnh cơ tim di truyền với đặc điểm thường thấy như tổn thương ở thất phải, rối loạn nhịp thất và gây nguy cơ đột tử cao. Hiện nay, việc nghiên cứu về ARVC ở Việt Nam còn rất hạn chế và chủ yếu chỉ mới tập trung vào các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và dịch tễ học. Vì vậy, việc thực hiện một nghiên cứu về di truyền và cơ chế phân tử của sự khởi phát bệnh ARVC là rất cần thiết, tạo cơ sở cho việc phòng ngừa, phát hiện sớm và điều trị bệnh.

Phương pháp: Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS), 21 gene liên quan đến ARVC đã được khảo sát ở một bệnh nhân nữ 35 tuổi.

Kết quả: Bằng chiến lược giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (WES), quá trình phân tích và sàng lọc phân tử đã xác định được một đột biến vô nghĩa thuộc exon thứ 72 trên gene ryanodine receptor 2 (RYR2). Đột biến dừng c.T10377G:p.(Tyr3459Ter) khiến protein RYR2 mất một đoạn polypeptide lớn bao gồm 1508 amino acid ở phía đuôi -COOH, làm thụ thể ryanodine 2 mất vùng

tương tác với protein calmodulin, là nguyên nhân gây loạn nhịp tim và khởi phát ARVC ở bệnh nhân.

Kết luận: Kết quả nghiên cứu di truyền và cơ chế gây bệnh giúp khẳng định chẩn đoán, tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân và tầm soát bệnh tim mạch được triệt để hơn.

Từ khóa: ARVC, calmodulin, cơ tim thất phải gây loạn nhịp, đột biến, exome, RYR2.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC) hay bệnh loạn sản thất phải gây loạn nhịp (arrhythmogenic right ventricular dysplasia, ARVD) là một dạng bệnh cơ tim vô căn hiếm gặp với tỷ lệ mắc bệnh 1:2.000 – 1:5.000 [1]. Đây là bệnh di truyền trên nhiễm sắc thể thường cùng những biểu hiện đặc trưng như rối loạn nhịp thất và nguy cơ đột tử cao do tim [2]. Hiện nay, để chẩn đoán bệnh, người ta dựa trên các biểu hiện lâm sàng bao gồm những thay đổi hình thái từ những tổn thương ở vùng tam giác loạn sản (teo cục bộ, xơ hóa cơ tim), hiện tượng khử cực và bất thường tái cực, rối loạn nhịp thất, gia đình có người mắc bệnh ARVC và

đột tử do tim mạch. ARVC có những biểu hiện lâm sàng khá đa dạng và phức tạp, khiến công tác chẩn đoán gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, việc nghiên cứu các cơ chế di truyền phân tử đối với việc tiến triển của bệnh được xem là một bước đột phá trong công tác điều trị bệnh [3]. Những nghiên cứu trước đây cho thấy có 21 gene được cho là có mối liên quan đến việc phát bệnh, bao gồm nhóm gene mã hóa cho thành phần của cầu nối bám chiếm 40 – 50% [4] và những gene có liên quan đến kiểu hình của bệnh. Tóm lại, việc chẩn đoán dựa trên kết quả giải trình tự toàn bộ gene là rất cần thiết, nhằm phục vụ cho công tác phát hiện sớm, hỗ trợ điều trị cũng như công tác tư vấn di truyền đối với gia đình của bệnh nhân.

Kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (next generation sequencing, NGS) ra đời cho phép phân tích các nhóm gene lớn, thậm chí là toàn bộ trình tự vùng mã hóa (exome) nhằm phục vụ cho việc nghiên cứu, phát hiện các biến thể và mối liên quan đến việc biểu hiện lâm sàng của bệnh [5]. Kỹ thuật NGS giúp việc xét nghiệm di truyền trở nên nhanh, dễ thực hiện, có độ chính xác cao với chi phí thấp [6]. Đối với bệnh nhân ARVC, NGS trở thành sự lựa chọn tiềm năng cho việc chẩn đoán, phòng ngừa và điều trị bệnh một cách hiệu quả [7]. Vùng mã hóa là tập hợp của tất cả các exon trong bộ gene, chỉ chiếm khoảng 1% bộ gene nhưng chứa khoảng 85% các đột biến liên quan đến các bệnh di truyền theo quy luật Mendel đã được ghi nhận [8]. Theo đó, việc giải trình tự đối với vùng mã hóa trong quá trình chẩn đoán và điều trị bệnh sẽ đem lại kết quả cao hơn so với vùng không mã hóa [9,10]. Vì vậy, việc xác định các biến thể gây bệnh bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (whole exome sequencing, WES) cho thấy mức độ hiệu quả cao [11].

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân

tích toàn bộ vùng mã hóa bằng kỹ thuật WES đối với một bệnh nhân người Việt Nam có kết quả lâm sàng nghi ngờ mắc bệnh ARVC. Kết quả giải trình tự vùng mã hóa sẽ được sàng lọc và phân tích để tìm ra biến thể gây bệnh, góp phần làm tăng tính chính xác của kết quả chẩn đoán phân tử đối với bệnh nhân. Theo đó, việc chẩn đoán ở giai đoạn sớm nhằm tìm ra quá trình phát triển bệnh, quản lý lâm sàng và xác định các đối tượng có khả năng bị ảnh hưởng. Từ đó, chúng tôi có thể đưa ra các tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân nhằm quản lý các đột biến ở những thế hệ tiếp theo.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng

Một bệnh nhân người Việt Nam được chẩn đoán nghi ngờ mắc bệnh ARVC. Bệnh nhân là nữ, 35 tuổi. Toàn bộ dữ liệu bệnh án được bệnh nhân chấp thuận sử dụng cho nghiên cứu.

Phương pháp tách chiết và tinh sạch DNA

DNA tổng số (gDNA) từ tế bào bạch cầu trong 200 μ L mẫu máu toàn phần của bệnh nhân được tách chiết và tinh sạch bằng bộ kit QIAamp DNA Blood Mini Kit – QIAGEN (Đức). Sau đó, mẫu DNA được kiểm tra lại bằng máy NanoDrop. Mẫu DNA đạt tiêu chuẩn cần có nồng độ trong khoảng 100 – 200 ng/ μ L và giá trị OD 260/280 trong khoảng 1,8 – 1,9.

Chuẩn bị thư viện và giải trình tự

DNA tổng số được phân cắt thành các đoạn có kích thước 100 – 900 bp và được nối với các adaptor cùng với các cặp DNA thư viện. Tiếp theo, phản ứng PCR được tiến hành nhằm khuếch đại các phân đoạn DNA đã được chuẩn bị. Thư viện DNA sau đó được giải trình tự bằng hệ thống máy HiSeq 4000 với bộ kit TruSeq 3000/4000 SBS Kit v3 (protocol HiSeq 3000/4000 System User Guide Part # 15066496, Rev. A HCS 3.3.20). Các mẫu dò (probe) phục vụ cho quá trình giải trình tự

được thiết kế phù hợp với hệ gene hoặc nhóm gene mục tiêu. Chúng tôi đã tạo số lượng mẫu dò cho nhóm 21 gene mục tiêu liên quan đến bệnh ARVC bao gồm các gene *BAG3*, *CDH2*, *CTNNA3*, *DES*, *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *FLNC*, *JUP*, *LDB3*, *LEMD2*, *LMNA*, *MYH7*, *NKX2-5*, *PKP2*, *PLN*, *RYR2*, *SCN5A*, *TGFB3*, *TMEM43* và *TTN* được cập nhật tại website www.arvcdatabase.info.

Sắp xếp và phân tích dữ liệu

Kết quả giải trình tự được loại bỏ những đoạn đọc có chất lượng thấp. Tiếp đó, dữ liệu được sắp xếp và đối chiếu với ngân hàng gene người (UCSC Genome Build hg19) bằng phần mềm Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Sau đó, dữ liệu được phân tích bằng Genome Analysis Toolkit (GATK) và Sequence Alignment Map (SAMtools) để tìm tất cả những vị trí có sự thay đổi allele với tần số thống kê cao, bao gồm SNPs, đoạn chèn, đoạn mất ngắn và CNVs.

Chú giải và sàng lọc biến thể

Biến thể được chú giải bằng các phần mềm ANNOVAR và VEP. Sau đó, biến thể được đối chiếu với bảng biến thể gây bệnh trên Human Gene Mutation Database (HGMD). Chúng tôi lọc các biến thể hiếm thuộc exon và vùng splice site có tần số allele lặn (minor allele frequency, MAF) $\leq 0,0005$.

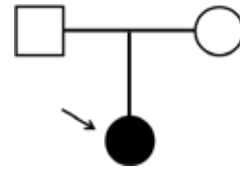
Phân loại biến thể

Biến thể được phân loại theo tiêu chuẩn của American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Tần số allele được đối chiếu với Exome Aggregation Consortium (ExAC). Việc kết luận khả năng gây bệnh của biến thể còn được kết hợp với kết quả từ các công cụ dự đoán chức năng bao gồm ENTPRISE-X, MutationTaster, PROVEAN và SIFT.

KẾT QUẢ

Thông tin của đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân là nữ, 35 tuổi, được sinh ra trong gia đình có cha mẹ khỏe mạnh, không mắc bệnh tim (Hình 1).



Hình 1. Sơ đồ phả hệ của gia đình bệnh nhân. Đối tượng nghiên cứu (mũi tên) là người duy nhất trong gia đình mắc bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp

Kết quả đánh giá biến thể

Bằng việc ứng dụng công nghệ NGS của Illumina, chúng tôi nhận thấy kết quả thu được đều đáp ứng tốt các chỉ số kiểm soát chất lượng của quá trình giải trình tự. Dung lượng giải trình tự của mẫu là 7,5 Gbp, độ bao phủ (depth coverage) 138x, hàm lượng GC chiếm 49,4%. Phần lớn các lần đọc có chất lượng base cao với Q30 (Phred-score) 93,7%. Sau quá trình giải trình tự WES, kết quả thu được 103.651 biến thể trong exome của bệnh nhân. Kết quả được lọc nhằm loại bỏ những biến thể không liên quan đến bệnh ARVC dựa trên 21 gene có liên quan đến bệnh ARVC đã được công bố trước đây. Cuối cùng, các đột biến “synonymous” và những đột biến có chỉ số MAF $\geq 0,05\%$ được loại bỏ.

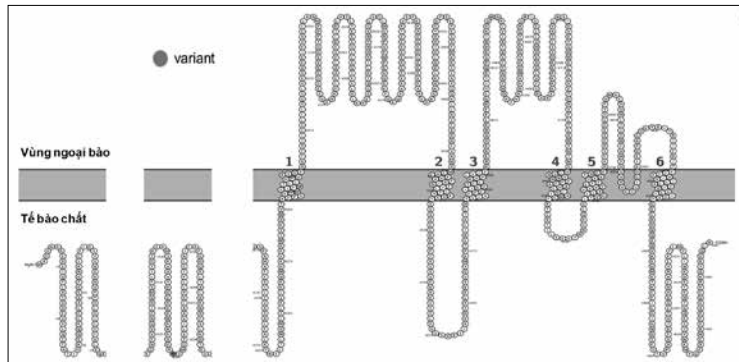
Kết quả là chúng tôi đã ghi nhận một đột biến vô nghĩa c.T10377G:p.(Tyr3459Ter) thuộc exon thứ 72 của gene ryanodine receptor 2 (RYR2) (NM_001035) với vị trí 237880551 thuộc chromosome 1 (1q42.1 - q43).

Biến thể p.(Tyr3459Ter) đã làm thay thế 1 amino acid tyrosine ở vị trí 3459 thành amino acid kết thúc (termination) (Hình 2). Do đây là một amino acid với chức năng làm tín hiệu dừng quá trình dịch mã nên protein RYR2 sẽ bị mất một đoạn polypeptide khá lớn ở phía đuôi -COOH.

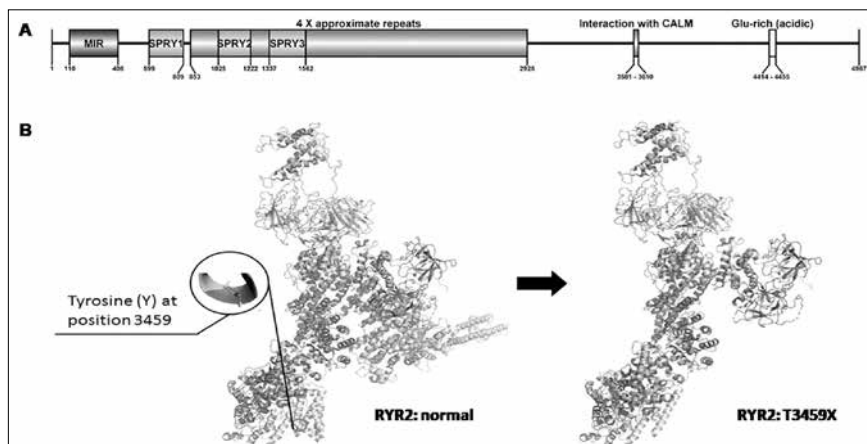
Bên cạnh đó, kết quả sàng lọc biến thể cũng chỉ

ra rằng p.(Tyr3459Ter) là biến thể duy nhất có khả năng gây bệnh ARVC ở bệnh nhân. Kết hợp với kết quả của các công cụ dự đoán chức năng, chúng tôi nhận thấy đột biến p.(Tyr3459Ter) gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cấu trúc của protein RYR2 (Hình 3) và đáp ứng các tiêu chuẩn về khả năng

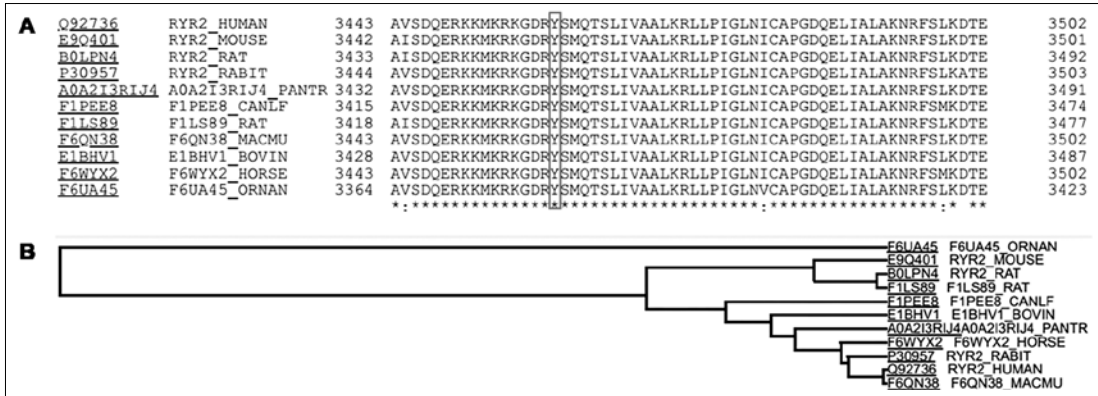
gây bệnh ARVC. Nguy cơ gây bệnh cao càng được củng cố khi đột biến nêu trên xuất hiện ở vùng amino acid có độ bảo tồn cao. Trong đó, tyrosine ở codon thứ 3459 trên chuỗi polypeptide của RYR2 được xác định là đều xuất hiện ở một số loài động vật có vú (Hình 4).



Hình 2. Sơ đồ một phần cấu trúc của protein RYR2 ở người. Protein RYR2 (thụ thể ryanodine 2) là một kênh vận chuyển ion Ca^{2+} trong tế bào. Protein RYR2 được mã hóa bởi gene RYR2. RYR2 là một protein xuyên màng với tổng cộng 6 vùng xuyên màng (được đánh số màu xanh dương) phía đuôi -COOH. Vị trí bắt đầu của đột biến mới phát hiện được ký hiệu màu đỏ. Hình chữ nhật lớn màu cam minh họa cho màng tế bào. Hình ảnh được vẽ bằng phần mềm Protter với các dữ liệu được tham khảo từ UniProt



Hình 3. Sự phân bố domain và mô hình cấu trúc tổng thể của protein RYR2. (A) Protein RYR2 được cấu tạo bởi 4967 amino acid. Thụ thể RYR2 bao gồm 8 domain, trong đó domain MIR (gồm 5 vùng: MIR1, MIR2, MIR3, MIR4 và MIR5), domain SPRY (gồm các vùng: SPRY1, SPRY2 và SPRY3) giữ chức năng tương tác với các protein khác. (B) Sự biến đổi hoàn toàn về cấu trúc không gian 3D của thụ thể RYR2 khi đột biến xuất hiện cho thấy protein bị mất các vùng chức năng ở phía đuôi -COOH. Các domain tương ứng ở Hình A và Hình B được chú thích cùng màu. Hình ảnh được vẽ bằng phần mềm PyMOL và DOG 2.0 với các dữ liệu được tham khảo từ Protein Data Bank và UniProt



Hình 4. Sự bảo tồn tự nhiên của protein RYR2. (A) Một phần của các trình tự polypeptide khác nhau cho thấy tyrosine (Y) ở vị trí 3459 trên protein RYR2 ở người được giữ nguyên khi đối chiếu với trình tự tương ứng của một số loài động vật có vú khác bao gồm: chuột nhỏ, chuột lớn, thỏ, tinh tinh, chó, khỉ Rêzut, bò, ngựa và thú mỏ vịt. (B) Cây phát sinh protein RYR2 thể hiện mối liên hệ tiến hoá giữa các loài động vật có vú. Độ dài của các nhánh tỷ lệ với mối quan hệ họ hàng giữa các loài. Thông tin được tham khảo và trích xuất từ UniProt

THẢO LUẬN

Sự thống nhất trong quá trình cơ bóp của cơ tim chủ yếu phụ thuộc vào mức độ hiệu quả của quá trình giải phóng và tái hấp thụ các ion Ca²⁺ [12]. Thụ thể RYR2 là một protein lớn chứa 4967 amino acid (565 kDa) được mã hóa bởi 105 exon, chủ yếu phân bố trong mô tim và tham gia vào quá trình cơ bóp của cơ tim thông qua quá trình cảm ứng giải phóng Ca²⁺ (CICR) [13]. RYR2 thuộc nhóm thụ thể ryanodine, bao gồm ba phần RyR1, RyR2 và RyR3, với các gene mã hóa khác nhau [14]. Mối quan hệ giữa chức năng của gene RYR2 và những biểu hiện lâm sàng của bệnh còn chưa được biết rõ do sự đa dạng về các loại đột biến. Một số bệnh tim khác liên quan đến đột biến gene cũng đã được báo cáo như bệnh cơ tim giãn (dilated cardiomyopathy, DCM) và bệnh nhịp nhanh thất đa hình do tăng tiết catecholamine (catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, CPVT). Đối với bệnh ARVC, đột biến xảy ra ở gene RYR2 thường có biểu hiện lâm sàng đặc trưng như thâm nhiễm mỡ và xơ hóa cơ tim [15,16]. RYR2 là kênh giải phóng Ca²⁺ chính ở cơ tim, chứa vùng tương tác với một

số protein khác bao gồm FKBP12.6, calmodulin (CaM), calsequestrin, PP1, PP2A, v.v. với vai trò là một cảm biến quan trọng giúp điều hòa chu kỳ của ion Ca²⁺ được diễn ra bình thường. Những tương tác trên mất đi sẽ góp phần quan trọng trong việc hình thành các cơ chế sinh bệnh suy tim và rối loạn nhịp tim [17].

Việc sử dụng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa trong nghiên cứu này đã phát hiện một đột biến vô nghĩa c.T10377G:p.(Tyr3459Ter) thuộc exon 72 của gene RYR2. Đột biến làm protein RYR2 bị mất một đoạn polypeptide gồm 1508 amino acid phía đuôi -COOH, bao gồm trình tự mã hóa từ exon 72 đến hết exon 105. Đột biến xảy ra khiến RYR2 thiếu vùng chức năng tương tác với ba protein CaM. CaM là một protein cảm nhận ion Ca²⁺ phổ biến ở những loài động vật có xương sống [18]. Quá trình hoạt hóa CaM bởi Ca²⁺ giúp điều tiết và điều chỉnh chức năng của các kênh ion. Đối với RYR2, CaM có vai trò trong việc ức chế giải phóng Ca²⁺ qua RYR2 [19 - 23]. Khi mất đi tương tác RYR2 - CaM, lượng Ca²⁺ có thể sẽ bị giải phóng quá mức trong quá trình tâm trương qua các kênh

RYR2 [19,21,24,25]. Việc rò rỉ Ca^{2+} là một trong những nguyên nhân gây rối loạn nhịp thất [26]. Tóm lại, đột biến p.(Tyr3459Ter) đã làm mất khả năng tương tác giữa *RYR2* và CaM, lượng Ca^{2+} có thể sẽ bị giải phóng quá mức trong quá trình tâm trương và gây ra hiện tượng rối loạn nhịp thất dẫn đến khởi phát bệnh ARVC ở bệnh nhân.

Những nghiên cứu trước đây về sự ảnh hưởng của CaM đối với *RYR2* dựa trên hai cơ chế riêng biệt, bao gồm mức độ liên kết và mức độ ảnh hưởng của CaM đối với hoạt động của *RYR2*. Sự tương tác giữa CaM và *RYR2* có liên quan mật thiết đến bệnh lý rò rỉ Ca^{2+} qua *RYR2* khi bệnh nhân gặp căng thẳng hoặc trong quá trình hoạt động thể chất [27]. Năm 2017, Ehdai và cộng sự đã phát hiện đột biến c.G3038A:p.(Arg1013Gln) trên bệnh nhân nam 40 tuổi gây rò rỉ Ca^{2+} vào trong tế bào trong quá trình khử màng dẫn đến nhịp tim bị rối loạn trong quá trình hoạt động thể chất [28]. Năm 2001, các đột biến thuộc gene *RYR2* (Arg176Gln, Leu433Pro, Asn2386Ile và Thr2504Met) từ ba gia đình mắc ARVC đã được xác định, ảnh hưởng đến việc điều hòa kênh Ca^{2+} [16]. Do đó, chúng tôi khuyến cáo việc kiểm tra định kỳ trên tất cả bệnh nhân có bất thường về gene đối với bệnh ARVC. Việc kiểm tra

nên được bắt đầu từ lúc 10 đến 12 tuổi, vì các biểu hiện lâm sàng của bệnh hiếm khi xuất hiện trước độ tuổi này. Việc đo điện tâm đồ (ECG), điện tâm đồ độ phân giải cao (ECG-HR) và siêu âm tim là những tiêu chuẩn chẩn đoán chính được đề xuất [29].

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu này chứng minh đột biến mới được phát hiện trên gene *RYR2* là nguyên nhân gây bệnh ARVC ở nữ bệnh nhân. Đột biến vô nghĩa tại vị trí c.T10377G đã làm mất sự tương tác giữa protein *RYR2* và CaM, ảnh hưởng đến việc điều hòa kênh ion Ca^{2+} trong quá trình kích thích co bóp ở tế bào cơ tim. Bệnh ARVC di truyền trên nhiễm sắc thể thường. Do đó, việc giải trình tự và sàng lọc phân tử ở bệnh nhân tim mạch và người khỏe mạnh là rất cần thiết, giúp cho việc tư vấn di truyền, phòng ngừa, phát hiện sớm, điều trị và chăm sóc nâng đỡ, cùng với việc tầm soát bệnh tim mạch được triệt để hơn.

LỜI CẢM ƠN

* Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.01-2016.39.

ABSTRACT

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: identification of a novel mutation by whole exome sequencing

Background: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a hereditary disorder of the cardiac muscle characterised by ventricular arrhythmias, cardiac failure and sudden cardiac death. There are few studies conducted on ARVC in Vietnam. Most of which focused only on clinical and subclinical presentations as well as epidemiology of the disorder. Genetic studies together with disease onset mechanism researches of HCM are compulsory in order to provide better disease preventions, diagnoses and therapeutic treatments, therefore.

Methods: A next generation sequencing (NGS) assay was developed in order to analyze a panel of 21 known ARVC genes in a 35-year-old female patient.

Results: Whole exome sequencing (WES) validated a nonsense mutation on exon 72 of ryanodine receptor 2 (RYR2) gene. The stop-gain mutation c.T10377G:p.(Tyr3459Ter) resulted in deletion of a long C-terminal polypeptide chain of 1508 amino acids, including calmodulin-binding domain, leading to ARVC.

Conclusions: These genetic and disease onset mechanism results support clinical diagnoses, provide genetic counseling as well as better clinical managements of cardiomyopathy patients and families.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Fontaine G, Fontaliran F, Frank R.** Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathies - clinical forms and main differential diagnoses. *Circulation* 1998; 97: 1532 - 1535.
2. **Corrado D, Wichter T, Link MS et al.** Treatment of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an international task force consensus statement. *Circulation* 2015; 132: 441 - 453.
3. **Campuzano O, Alcalde M, Allegue C et al.** Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Med Genet* 2013; 50: 280 - 289.
4. **Fressart V, Duthoit G, Donal E et al.** Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice. *Europace* 2010; 12: 861 - 868.
5. **Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW et al.** Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 745 - 755.
6. **Parikh VN, Ashley EA.** Next-generation sequencing in cardiovascular disease: present clinical applications and the horizon of precision medicine. *Circulation* 2017; 135: 406 - 409.
7. **Gandjbakhch E, Redheuil A, Pousset F, et al.** Clinical diagnosis, imaging and genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72: 784 - 804.
8. **Teer JK, Mullikin JC.** Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R145 - 151.
9. **Linthorst GE, Hollak CEM.** Whole exome sequencing and whole genome sequencing in undiagnosed disease: of value for certain patient populations. *Ned Tijdschr Geneesk* 2019; 163: D3711.
10. **Sun Y, Man J, Wan Y et al.** Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for Mendelian diseases: a cohort diagnostic study. *Scientific Reports* 2018; 8: 11646.
11. **Barbitoff YA, Polev DE, Glotov AS et al.** Systematic dissection of biases in whole-exome and whole-genome sequencing reveals major determinants of coding sequence coverage. *Sci Rep* 2020; 10: 2057.
12. **Gambardella J, Trimarco B, Iaccarino G et al.** New insights in cardiac calcium handling and excitation-contraction coupling. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1067: 373 - 385.
13. **Santulli G, Nakashima R, Yuan Q, Marks AR.** Intracellular calcium release channels: an update. *J Physiol* 2017; 595: 3041 - 3051.
14. **Ogawa Y.** Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994; 29: 229 - 274.

15. **Basso C, Corrado D, Bauce B et al.** Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012; 5: 1233 - 1246.
16. **Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A et al.** Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 2001; 10: 189 - 194.
17. **Yano M, Yamamoto T, Matsuzaki M.** Role of ryanodine receptor as a Ca^{2+} regulatory center in normal and failing hearts. *J Cardiol* 2009; 53: 1 - 7.
18. **Sorensen AB, Sondergaard MT, Overgaard MT.** Calmodulin in a heartbeat. *FEBS J* 2013; 280: 5511 - 5532.
19. **Tian X, Tang Y, Liu Y et al.** Calmodulin modulates the termination threshold for cardiac ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release. *Biochem J* 2013; 455: 367 - 375.
20. **Fruen BR, Black DJ, Bloomquist RA et al.** Regulation of the RYR1 and RYR2 Ca^{2+} release channel isoforms by Ca^{2+} insensitive mutants of calmodulin. *Biochemistry* 2003; 42: 2740 - 2747.
21. **Ono M, Yano M, Hino A et al.** Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca^{2+} release in heart failure. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 609 - 617.
22. **Oda T, Yang Y, Nitu FR, et al.** Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure. *Circ Res* 2014; 114: 295 - 306.
23. **Sondergaard MT, Tian X, Liu Y et al.** Arrhythmogenic calmodulin mutations affect the activation and termination of cardiac ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release. *J Biol Chem* 2015; 290: 26151 - 26162.
24. **Sheehan KA, Blatter LA.** Regulation of junctional and non-junctional sarcoplasmic reticulum calcium release in excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol* 2003; 546: 119 - 135.
25. **Hino A, Yano M, Kato T et al.** Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res* 2012; 96: 433 - 443.
26. **Jiang D, Xiao B, Zhang L et al.** Enhanced basal activity of a cardiac Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) mutant associated with ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res* 2002; 91: 218 - 225.
27. **Walweel K, Hurtado NG, Rebbeck NT et al.** Calmodulin inhibition of human RyR2 channels requires phosphorylation of RyR2-S2808 or RyR2-S2814. *J Mol Cell Cardiol* 2019; 130: 96 - 106.
28. **Ehdaie A, Shehata M, Wang X et al.** Ryanodine receptor mutation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical implications. *J Mol Biomark Diagn* 2017; 8: S2.
29. **Neto JE, Tonet J, Frank R et al.** Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVC/D) - What we have learned after 40 years of the diagnosis of this clinical entity. *Arq Bras Cardiol* 2019; 112: 91 - 103.