

Ứng dụng giải trình tự gen toàn bộ vùng mã hoá (exome) phát hiện biến thể mới trên gen acyl-CoA dehydrogenase chuỗi rất dài (ACADVL) ở bệnh nhân bệnh cơ tim

Nguyễn Thị Huỳnh Nga*, Bùi Chí Bảo**,***, Nguyễn Minh Hiệp****
Phạm Thị Thu Trang*****, Vũ Nguyễn Thanh Tùng**, Võ Văn Thành Niệm**
Lương Thị Thắm*****, Hà Thị Thanh Nga*****

Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt, Thành phố Đà Lạt *
Trung tâm Y Sinh học Phân tử, Trường Đại học Y Dược, Thành phố Hồ Chí Minh **
Đơn vị Sinh học Phân tử Di truyền, Bệnh viện Nhi đồng 2, Thành phố Hồ Chí Minh ***
Trung tâm Công nghệ bức xạ, Viện nghiên cứu hạt nhân, Thành phố Đà Lạt ****
Khoa Sau Đại học, Trường Đại học Đà Lạt, Thành phố Đà Lạt *****

TÓM TẮT

Cơ sở nghiên cứu: Ở nhóm bệnh cơ tim vô căn, sự trùng lặp trong biểu hiện lâm sàng gây hạn chế cho việc chẩn đoán và điều trị, do đó, việc nghiên cứu di truyền về các gen gây bệnh là rất cần thiết.

Phương pháp nghiên cứu: Chúng tôi ứng dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS) nhằm khảo sát 142 gen có liên quan đến các bệnh cơ tim ở 9 bệnh nhân thuộc Bệnh viện Nhi đồng 2.

Kết quả: Bằng chiến lược giải trình tự toàn bộ vùng mã hoá (WES), qua quá trình phân tích và sàng lọc phân tử, chúng tôi đã xác định được 63 biến thể hiếm thuộc 19 gen, bao gồm 27 biến thể đồng hợp tử và 36 biến thể dị hợp tử. Tần số biến thể của gen TTN chiếm nhiều nhất với 13 biến thể. Tiếp theo là các gen SYNE1 và MYPN lần lượt có 9 và 7 biến thể. Mỗi gen NDUFV2 và SCN5A có 5 biến thể, các gen COX15 và SYNE2 đều có 4 biến thể. Chúng tôi xác định được 2 biến thể của mỗi gen DMD, KCNE1, NEBL, RBM20 và 1 biến thể của các gen ACADVL, AKAP9, CAV3, DSC2, DSG2,

DSP, MYH6 và NEXN. Trong đó, có 1 biến thể mới là đột biến dị hợp tử c.197G>A của gen ACADVL.

Kết luận: Các kết quả nghiên cứu di truyền trên sẽ góp phần vào việc chẩn đoán phân tử và tầm soát bệnh tim mạch được triệt để hơn.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cơ tim vô căn (cardiomyopathy) là nhóm bệnh đa gen gây rối loạn ở nguyên bào cơ tim, dẫn đến suy tim, loạn nhịp tim hoặc đột tử [1]. Các nhóm bệnh đã được phân loại bao gồm: bệnh cơ tim giãn nở (DCM), bệnh cơ tim phì đại (HCM), bệnh cơ tim hạn chế (RCM) và bệnh cơ tim thất phải gây loạn nhịp (ARVC) [2]. Những bệnh này có tính đa dạng di truyền và liên quan đến các đột biến hiếm ở một số lượng lớn các gen, nhiều loại gen này trùng lặp với các bệnh lý cơ tim khác nhau [2]. Sự trùng lặp trong biểu hiện lâm sàng giữa các bệnh tim mạch đã gây hạn chế cho việc chẩn đoán và điều trị.

Giải trình tự Sanger là một kỹ thuật chẩn đoán

phân tử chính xác đối với các rối loạn chủ yếu liên quan đến một gen gây bệnh đơn lẻ [3]. Tuy nhiên, phương pháp sàng lọc này rất mất thời gian và cho mức độ không đồng nhất di truyền cao. Cho đến nay, với hơn 100 gen liên quan đến bệnh cơ tim được xác định, có thể được giải quyết hiệu quả hơn bằng cách sắp xếp trình tự thông tin cao, được gọi là giải trình tự thế hệ mới (NGS). Trong đó, kỹ thuật giải trình tự gen toàn bộ vùng mã hoá (WES) là một ứng dụng của công nghệ NGS nhằm xác định các biến thể của tất cả các vùng mã hoá (exome) của các gen mục tiêu theo từng loại bệnh đã biết, giúp sàng lọc, chẩn đoán và đánh giá biến thể [4,5].

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ thiết kế một “Pan 146 Cardiomyo” tùy chỉnh có chứa 142 gen liên quan đến các bệnh cơ tim. Chúng tôi sẽ tiến hành sàng lọc phân tử ở các đối tượng nghiên cứu nhằm tìm ra các biến thể mới liên quan đến bệnh cơ tim tương ứng, góp phần vào việc chẩn đoán phân tử đối với bệnh cơ tim được chính xác hơn, nhằm xác định sớm quá trình phát triển loạn nhịp tim và quản lý lâm sàng tốt hơn đối với bệnh nhân cơ tim.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng

Bệnh nhân tim mạch: được lập hồ sơ hội chứng, di truyền và quản lý lâm sàng tại Bệnh viện Nhi đồng Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp tách chiết và tinh sạch DNA tổng số

DNA từ 200 µl mẫu máu bệnh nhân được tách chiết và tinh sạch bằng bộ kit Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tách chiết, các mẫu DNA được đo bằng máy NanoDrop có nồng độ trong khoảng 100 - 200 ng/µL và giá trị OD 260/280 trong khoảng 1.8 - 1.9. Mẫu DNA sau đó được chuyển đi giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa trên hệ

thống HiSeq 4000 (Illumina) tại công ty MacroGen.

Phương pháp chuẩn bị và thiết kế mẫu hệ gen

Phân mảnh sử dụng nền tảng Illumina như sau: 1µg gDNA được cắt thành 100-900 bp mảnh với Covaris E210 (Covaris, Inc., Woburn, MA) để chạy trên thư viện NGS. Thư viện cho giải trình tự được dựa trên nguyên tắc số mẫu dò (probe) được thiết kế cho hệ gen hoặc cho nhóm gen mục tiêu Agilent SureSelectRT Reagent. Chúng tôi cũng tạo số lượng mẫu dò cho nhóm gen mục tiêu 142 gen của bệnh cơ tim. Đây là mẫu dò thư viện được ký hiệu “Pan 146 Cardiomyo”. Trong bước này chúng tôi thu thập trình tự mã hóa (exon) của toàn bộ 142 gen, sau đó sử dụng phần mềm Afident Probe Library Select để chạy tìm mẫu dò. Tổng cộng có 2.072.000 mẫu dò bao phủ cho 142 gen được đặt hàng riêng cho nhóm nghiên cứu Thư viện có thể được định lượng bằng PCR định lượng (qPCR) bằng cách sử dụng Bộ định lượng thư viện Kapa (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA) trên 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Giải trình tự được thực hiện trên 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). Dữ liệu sau cùng được xuất ra và gửi về ở dạng file *.Fastq.

KẾT QUẢ

Thông tin của nhóm đối tượng nghiên cứu

Tất cả các mẫu trong nghiên cứu này được thu thập tại Bệnh viện Nhi đồng TP. Hồ Chí Minh khi đã được chẩn đoán là có biểu hiện mắc bệnh tim và đã được sự đồng ý của bệnh nhân.

Nhiều nghiên cứu cho thấy có một mối liên hệ mật thiết giữa các bệnh cơ tim và bệnh lý về da vì độ vững chắc của các cầu nối bám được quyết định bởi phần lớn những protein liên kết ở cả tế bào tim và da [6 - 8]. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát cả trên một đối tượng bệnh nhân có bệnh lý về da.

Bảng 1. Thông tin của nhóm đối tượng nghiên cứu

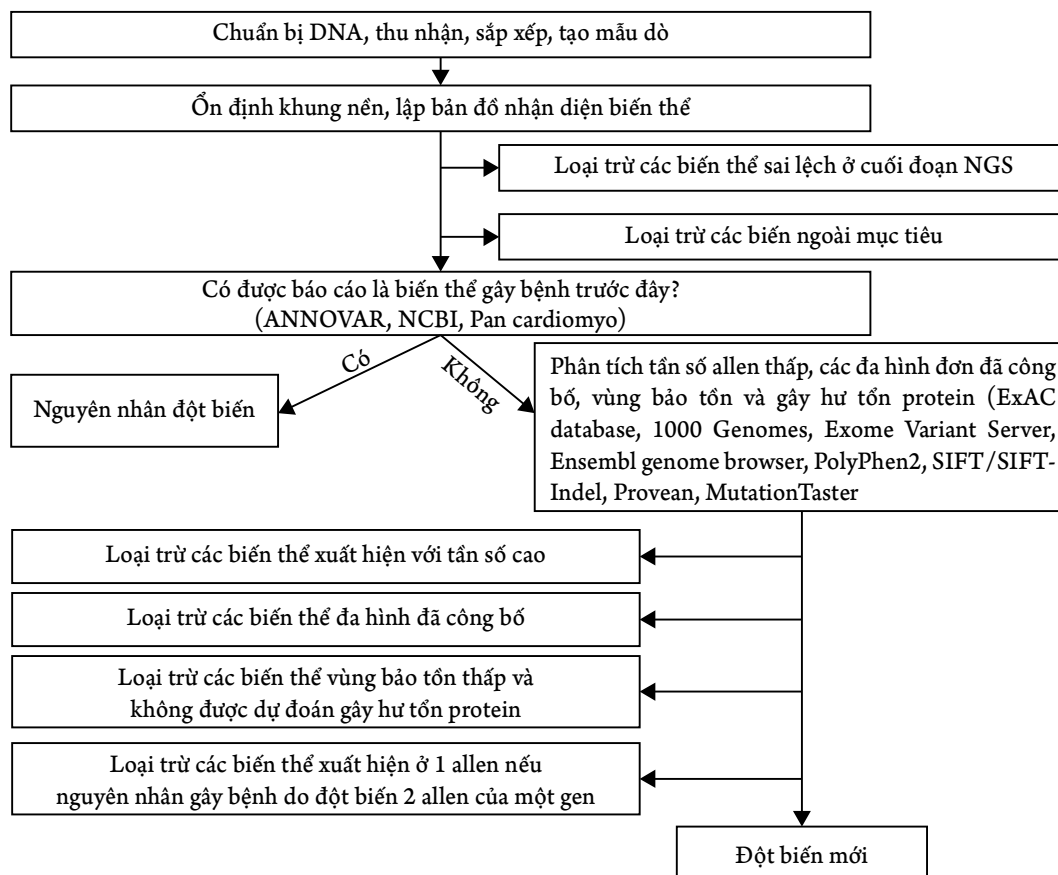
STT	Mã số	Giới tính	Gen (số lượng biến thể) ĐỒNG HỢP/DỊ HỢP	Biến thể tiềm năng
1	NH-1	Nam	COX15 (1) HET; MYPN (1) HOM; SCN5A (1) HET; SYNE1 (7) 6 HOM, 1 HET; SYNE2 (1) HET; TTN (1) HOM	MYPN (1) HOM; SYNE2 (1) HET
2	NH-2	Nam	AKAP9 (1) HET; NDUFV2 (1) HOM; SYNE1 (1) HET; TTN (1) HOM	AKAP9 (1) HET; SYNE1 (1) HET
3	NH-3	Nam	DSC2 (1) HET; NDUFV2 (1) HET; TTN (1) HET	DSC2 (1) HET
4	NH-4	Nam	DSG2 (1) HET; NDUFV2 (1) HOM; SCN5A (1) HOM; TTN (1) HOM	DSG2 (1) HET
5	ARVC-1	Nam	CAV3 (1) HET; DMD (2) HET; DSP (1) HET; KCNE1 (1) HOM; MYH6 (1) HET; NEBL (1) HET; RBM20 (1) HOM; SCN5A (1) HET; TTN (6) HET	-
6	ARVC-2	Nam	KCNE1 (1) HOM; NEBL (1) HET; RBM20 (1) HOM; SCN5A (1) HOM	-
7	ARVC-3	Nam	COX15 (1) HET; MYPN (1) HET; NDUFV2 (1) HOM; SCN5A (1) HET; SYNE2 (1) HET	MYPN (1) HET; SYNE2 (1) HET
8	SD-1	Nam	COX15 (1) HOM; MYPN (5) HOM; NDUFV2 (1) HET; SYNE1 (1) HET; SYNE2 (2) HET; TTN (2) 1 HET, 1 HOM	MYPN (2) HOM; SYNE1 (1) HET; SYNE2 (2) HET
9	SCID-1	Nam	ACADVL (1) HET; COX15 (1) HET; NEXN (1) HET; TTN (1) HOM	ACADVL (1) HET; NEXN (1) HET

ARVC (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy): bệnh nhân cơ tim thất phải gây loạn nhịp; HET (heterozygous): dị hợp tử; HOM (homozygous): đồng hợp tử; NH (normal human): đối tượng nghiên cứu không biểu hiện bệnh; SCID (severe combined immunodeficiency): bệnh nhân có hội chứng suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng; SD (skin disorder): bệnh nhân có bệnh lý về da.

Quy trình giải trình tự gen toàn bộ vùng mã hoá (exome) và lọc biến thể

Chúng tôi đã thiết kế một pan 146 cardiomyo tùy chỉnh có chứa 142 gen. Bảng điều khiển gen tùy chỉnh bao gồm tất cả các exon của mỗi gen và các vị trí nối. Chúng tôi ứng dụng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới Illumina. Bằng cách sử dụng bảng điều khiển tùy chỉnh, chúng tôi xác định được bộ

số liệu các đột biến gen và biến dị di truyền ở vùng mã hoá liên quan đến bệnh cơ tim ở 9 đối tượng nghiên cứu. Dung lượng giải trình tự của mỗi mẫu vào khoảng 5,9 Gbp, depth coverage từ 65x đến 105x. Phần lớn các lần đọc có chất lượng base cao, với Q30 (Phred-score) là 96%.

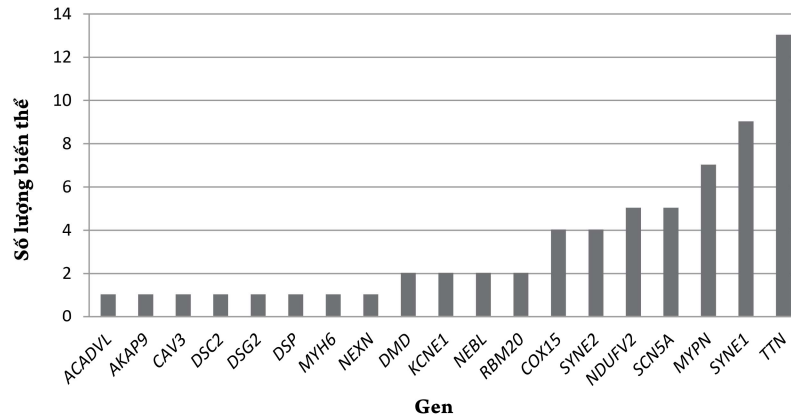


Hình 1. Quy trình phân tích và lọc biến thể. NCBI (National Center for Biotechnology Information): Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia), Pan cardiomyo: panel bệnh cơ tim, PolyPhen (Polymorphism Phenotyping): phân tích tính đa hình về kiểu hình, SIFT: (Sorting Intolerant From Tolerant): công cụ dự đoán chức năng.

Kết quả đánh giá biến thể

Trong số 9 đối tượng nghiên cứu, chúng tôi phát hiện 63 biến thể thuộc 19 gen. Trong đó có 27 biến thể ở dạng đồng hợp tử và 36 biến thể dị hợp tử. Có 2 biến thể thuộc nhiễm sắc thể X ở dạng dị hợp tử. Trong 63 biến thể có 43 biến thể thuộc loại nonsynonymous (chiếm 68,2%), 14 biến thể missense (chiếm 22,2%), 3 biến thể splice region (chiếm 4,8%), 1 biến thể stopgain (chiếm 1,6%), 1 biến thể upstream (chiếm 1,6%) và 1 biến thể frameshift (chiếm 1,6%).

Tần số biến thể của gen *TTN* chiếm nhiều nhất với 13 biến thể. Tiếp theo là các gen *SYNE1* và *MYPN* được phát hiện lần lượt có 9 và 7 biến thể. Các gen *NDUFV2* và *SCN5A* đều có 5 biến thể. Mỗi gen *COX15* và *SYNE2* có 4 biến thể. Ngoài ra, chúng tôi xác định được 2 biến thể của mỗi gen *DMD*, *KCNE1*, *NEBL*, *RBM20* và 1 biến thể của các gen *ACADVL*, *AKAP9*, *CAV3*, *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *MYH6* và *NEXN* (Hình 2). Trong đó, có 1 biến thể mới là đột biến dị hợp tử c.197G>A của gen *ACADVL*.



Hình 2. Biểu đồ thể hiện tần số xuất hiện của các biến thể ở 9 đối tượng nghiên cứu. Ở 9 đối tượng nghiên cứu, xác định được tổng cộng 63 biến thể xuất hiện ở 19 gen. Số lượng biến thể ở gen TTN là cao nhất với 13 biến thể, gen SYNE1 với 9 biến thể, gen MYPN với 7 biến thể. Mỗi gen NDUFV2 và SCN5A đều có 5 biến thể. Mỗi gen COX15 và SYNE2 có 4 biến thể. Các gen DMD, KCNE1, NEBL và RBM20 có 2 biến thể. Các gen ACADVL, AKAP9, CAV3, DSC2, DSG2, DSP, MYH6 và NEXN có 1 biến thể.

BÀN LUẬN

Hiện nay công nghệ giải trình tự NGS là cách tiếp cận mạnh mẽ để khám phá toàn diện các đột biến di truyền đối với hàng loạt các bệnh lý ở người [9]. Trong đó, kỹ thuật WES là một ứng dụng của công nghệ NGS nhằm xác định các biến thể trên tất cả các vùng mã hóa trong hệ gen. WES ngày càng được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu các bệnh hiếm nghèo, khó chẩn đoán, không phát hiện rõ nguyên nhân như ung thư, tim mạch, thần kinh, v.v. [10 - 13]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng các phần mềm và thuật toán tin sinh học để xác định các biến đổi di truyền mới có liên quan đến các bệnh về cơ tim và những bệnh lý khác ảnh hưởng đến hệ tim mạch.

Đối với nhóm 4 đối tượng nghiên cứu không có biểu hiện bệnh lý cơ tim (nhóm NH), công nghệ giải trình tự NGS đã xác định được 10 gen là AKAP9, COX15, DSC2, DSG2, MYPN, NDUFV2, SCN5A, SYNE1, SYNE2, TTN với 23 biến thể gây bệnh cơ tim (Bảng 1). Gen SYNE1 được phát hiện có nhiều biến thể nhất với 8 biến thể, và gen TTN có 4 biến thể xuất hiện ở tất cả các đối tượng được khảo sát. Kết quả cho thấy phổ xuất hiện các đột biến liên quan đến bệnh cơ tim là khá cao, tương ứng với nguy cơ tiền ảm mắc

bệnh ở nhóm đối tượng trên, thể hiện cả ở 3 loại bệnh lý cơ tim gồm bệnh ARVC, DCM và HCM.

Ở nhóm 3 bệnh nhân ARVC, có 13 gen được xác định bao gồm CAV3, COX15, DMD, DSP, KCNE1, MYH6, MYPN, NDUFV2, NEBL, RBM20, SCN5A, SYNE2, TTN với 24 biến thể (Bảng 1). Trong đó gen TTN chiếm số lượng biến thể nhiều nhất với 6 biến thể và gen SCN5A với 3 biến thể, xuất hiện ở cả 3 bệnh nhân. Mỗi gen KCNE1, NEBL, RBM20 được xác định có 2 biến thể và các gen còn lại có 1 biến thể. Đáng lưu ý là các gen CAV3, COX15, KCNE1, MYH6, MYPN, NDUFV2, NEBL, RBM20 thường không xuất hiện ở bệnh lý ARVC, điều này cho thấy sự trùng lặp của nhiều kiểu gen và kiểu hình ở bệnh cơ tim.

Một bệnh nhân SD mang bệnh lý về da mà chúng tôi nghi ngờ có liên quan đến bệnh tim mạch được phát hiện có 6 gen gồm COX15, MYPN, NDUFV2, SYNE1, SYNE2, TTN với 12 biến thể (Bảng 1). Gen mang nhiều biến thể nhất là MYPN với 5 biến thể, tiếp theo là các gen SYNE2 và gen TTN với 2 biến thể. Bệnh nhân này mang số lượng biến thể gây các bệnh cơ tim cao nhất trong số 4 nhóm đối tượng nghiên cứu được khảo sát. Kết quả cho thấy bệnh nhân trên có nguy cơ cao mắc bệnh tim mạch.

Bệnh nhân cuối cùng mang hội chứng SCID được xác định có 4 gen *ACADVL*, *COX15*, *NEXN* và *TTN* với 4 biến thể có khả năng gây bệnh cơ tim (**Bảng 1**). Đáng lưu ý là chúng tôi đã tìm thấy một đột biến mới nonsynonymous ở dạng dị hợp tử là c.197G>A ở gen *ACADVL*. Gen *ACADVL* mã hoá cho enzyme acyl-CoA dehydrogenase chuỗi rất dài (*ACADVL*) nằm trên nhiễm sắc thể 17p13.1 [14]. Đột biến này xảy ra ở exon thứ 3, trong đó G được thay thế bằng A ở vị trí 197 trong cDNA, dẫn đến việc thay đổi một amino acid ở vị trí 66, nơi Gly(G) thay thế cho Asp(D) trên protein *ACADVL*. Đột biến này có tần số allel là 0.0328 theo ExAC. Đột biến có khả năng ảnh hưởng đến bệnh tim mạch và bệnh SCID [15 - 17]. Đây là nguyên nhân dẫn đến rối loạn chuyển hóa acid béo, là con đường quan

trọng để sản xuất năng lượng cho tim [18].

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu di truyền của công trình này cho thấy rõ vai trò của các biến thể liên quan đến các bệnh lý cơ tim, góp phần vào việc chẩn đoán phân tử và tầm soát bệnh tim mạch được triệt để hơn. Việc giải trình tự và sàng lọc phân tử ở người bình thường hoặc bệnh nhân tim mạch là rất quan trọng, giúp cho việc xác định sớm quá trình phát triển loạn nhịp tim và quản lý lâm sàng tốt hơn đối với bệnh nhân cơ tim.

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

Whole exome sequencing identified a novel acyl-CoA dehydrogenase very long chain (*ACADVL*) gene mutation in a cardiomyopathy patient

Background: In cardiomyopathies (CMs), a heterogenous group of disorders that affects the heart muscle, phenotypic overlap among the inherited cardiovascular diseases (CVDs) limits the ability to establish a diagnosis based solely on clinical features.

Objectives: To provide a genetic study of pathogenic genes of cardiomyopathies.

Methods: We developed a next generation sequencing (NGS) assay to analyze a panel of 142 known cardiomyopathy genes in 9 Vietnamese patients from Children Hospital 2.

Results: Whole exome sequencing (WES) - a technique which determines the variations of all coding regions (exons) of the known genes - validated a total of 63 rare variants in 19 cardiomyopathy genes among the studied Vietnamese unrelated patients. Of 63 variants identified, 27 variants were homozygous and the other 36 ones were heterozygous. Among the 63 variants, *TTN* gene variants accounted the most for 13 mutations, which are known to be benign. Other groups of 9 and 7 mutations belong to *SYNE1* and *MYPN* genes, respectively. Ten out of 69 mutations distributed equally to *NDUFV2* and *SCN5A* gene variants. We detected 4 variants for each gene of *COX15* and *SYNE2* genes and 2 variants for each gene of *DMD*, *KCNE1*, *NEBL* and *RBM20*. A single variant was detected for *ACADVL*, *AKAP9*, *CAV3*, *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *MYH6* and *NEXN* genes. Especially, among them, we found a novel heterozygous nonsynonymous mutation c.197G>A on the *ACADVL* gene.

Conclusions: These genetic results support the “pan-cardiomyopathy panel” approach, by which the molecular diagnosis of cardiomyopathies, early identification of arrhythmia development and better clinical management of cardiomyopathic patients are applied.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Sisakian H.** Cardiomyopathies: Evolution of pathogenesis concepts and potential for new therapies. *World J Cardiol* 2014; 6: 478 - 494.
2. **Simpson S, Rutland P, Rutland CS.** Genomic Insights into Cardiomyopathies: A Comparative Cross-Species Review. *Vet Sci* 2017; 4: 19.
3. **Chen L, Cai Y, Zhou G et al.** Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens. *PLoS One* 2014; 9: e88886.
4. **Faita F, Vecoli C, Foffa I et al.** Next generation sequencing in cardiovascular diseases. *World J Cardiol* 2012; 4: 288 - 295.
5. **Morini E, Sangiuolo F, Caporossi D et al.** Application of next generation sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death. *Front Genet* 2015; 6: 55.
6. **Alcalai R, Metzger S, Rosenheck S et al.** A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder and woolly hair. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 319 - 327.
7. **McKoy G, Protonotarios N, Crosby A et al.** Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 2000; 355: 2119 - 2124.
8. **Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L et al.** Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2761 - 2766.
9. **Di Resta C, Galbiati S, Carrera P et al.** Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC* 2018; 29: 4 - 14.
10. **Qiao D, Ameli A, Prokopenko D et al.** Whole exome sequencing analysis in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Mol Genet* 2018; 27: 3801 - 3812.
11. **Goh G, Choi M.** Application of whole exome sequencing to identify disease-causing variants in inherited human diseases. *Genomics Inform* 2012; 10: 214 - 219.
12. **Haskell GT, Adams MC, Fan Z et al.** Diagnostic utility of exome sequencing in the evaluation of neuromuscular disorders. *Neurol Genet* 2018; 4: e212.
13. **Golbus JR, Puckelwartz MJ, Dellefave-Castillo L et al.** Targeted analysis of whole genome sequence data to diagnose genetic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7: 751 - 759.
14. **Schiff M, Mohsen AW, Karunanidhi A et al.** Molecular and cellular pathology of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2013; 109: 21 - 27.
15. **Boemer F, Fasquelle C, d'Otreppe S et al.** A next-generation newborn screening pilot study: NGS on dried blood spots detects causal mutations in patients with inherited metabolic diseases. *Sci rep* 2017; 7: 17641.
16. **Strauss AW, Powell CK, Hale DE et al.** Molecular basis of human mitochondrial very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10496 - 10500.
17. **Tucci S, Flögel U, Hermann S et al.** Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice. *Biochim Biophys Acta*, 1842: 677 - 685.
18. **Gregersen N, Andresen BS, Corydon MJ et al.** Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Hum Mutat* 2001; 18: 169 - 189.