

## Ani açıklanamayan ölümlerde moleküler otopsi

### Molecular autopsy in sudden unexplained death

 Esra Tekcan,  
0000-0002-6953-9202

 Şengül Tural  
0000-0002-8946-8165

Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Samsun, Turkey.

**Corresponding author:** Esra Tekcan

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Atakum, Samsun, Türkiye.

E-mail: esrabkr@hotmail.com

**Cite as:** Tekcan E, Tural Ş. Molecular autopsy in sudden unexplained death. J For Med 2022;36(2):40-47.

#### ABSTRACT

Molecular autopsy is the process of investigating sudden unexplained deaths through genetic analysis. It is particularly useful in cases where the cause of death is unexplained or shows non-diagnostic features despite macroscopic, histopathological, and toxicological examinations at conventional autopsy. Postmortem genetic testing is a complementary tool to a rigorous autopsy. The ultimate purpose of molecular autopsy is to assist forensic investigations and guide the genetic screening of relatives of the victim who may be at risk for sudden unexplained death. Earlier molecular autopsy attempts relied on Sanger sequencing, which although accurate and easy to use, has a low yield and can only be used to analyze a small panel of genes. The recent adoption of next-generation sequencing (NGS) technologies has allowed for exome/genome-wide examination, resulting in an increase in detection of pathogenic variants and the discovery of newer genotype-phenotype associations.

This review summarizes the scientific evidence for the use of molecular autopsy to investigate sudden unexplained deaths. Unlike other recently published articles dealing with this topic, we aimed to the technical aspects of data processing and interpretation as well as report the latest data, focusing on the use of NGS technologies for molecular autopsy.

**Keywords:** Autopsy, sudden death, molecular genetics

#### ÖZET

Moleküler otopsi, ani açıklanamayan ölümlerin genetik analiz yoluyla araştırılması işlemidir. Geleneksel otopside makroskopik, histopatolojik, toksikolojik incelemelere karşın ölüm nedeninin açıklanamadığı veya tanısal olmayan özellikler gösterdiği durumlarda özellikle yararlıdır. Postmortem genetik testler titizlikle yapılan bir otopsi için tamamlayıcı bir araçtır. Moleküler otopsinin nihai amacı, adli tıp araştırmalarına yardımcı olmak ve mağdurun ani açıklanamayan ölümlere karşın risk altında olabilecek akrabalarının genetik taramasına rehberlik etmektir. Eski moleküler otopsi girişimleri, doğru ve kullanımı kolay olmasına rağmen, düşük bir verime sahip olan ve yalnızca küçük bir gen panelini analiz etmek için kullanılabilen Sanger dizilimine dayanıyordu. Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin yakın zamanda benimsenmesi, ekzom/genom çapında incelemeye izin vererek, patojenik varyantların tespitinde bir artış ve daha yeni genotip-fenotip birlikteliklerinin keşfini sağlamıştır.

Bu derlemede, ani açıklanamayan ölümlerin araştırması için moleküler otopsi kullanımına ilişkin bilimsel kanıtlar özetlenmekte ayrıca bu konuyu ele alan yakın zamanda yayınlanan diğer makalelerden farklı olarak moleküler otopsi için NGS teknolojilerinin kullanımına odaklanarak en son verileri, hem de veri işleme ve yorumlamaya ilişkin teknik yönleri raporlamayı amaçladık.

**Anahtar kelimeler:** Otopsi, ani ölüm, moleküler genetik

#### 1. GİRİŞ

Ani kardiyak ölümlerin (AKÖ) %40'ına kadarında otopsi ile kesin bir ölüm nedeni belirlenmemiştir (1). Bu vakalar ani açıklanamayan ölümler (AAÖ) olarak adlandırılır ve temel olarak mikroyapısal kardiyak anormallikler veya kanalopatilerle ilgilidir (2). AKÖ; görünürde sağlıklı olan, semptomların başlamasından sonraki bir saat içinde (veya tanık olunmamışsa, olaydan 24 saat öncesine kadar sağlığının iyi olduğu bilinen) kişinin altta yatan bir kalp hastalığına bağlı olarak beklenmedik ölümüdür (2). AKÖ'lerin yaklaşık %80'i koroner arter hastalığına bağlıdır ve yarısına kadarı önceden teşhis edilmiş kalp hastalığı yokluğunda meydana gelir (3). Gençlerde AKÖ genellikle, hipertrofik kardiyomyopati (HKM), dilate kardiyomyopati (DKM) ve aritmojenik kardiyomyopati (AKM) veya örneğin uzun QT sendromu (UQTS), kısa QT sendromu (KQTS), Brugada sendromu (BrS) ve katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi

(KPVT) gibi iyon kanallarını etkileyen bozukluklar olan kanalopatiler gibi kardiyomyopatilerin ölümcül bir komplikasyonudur. Yaşlı bireylerde koroner arter hastalığı AKÖ'nün ana nedenini temsil eder ve bunu kardiyomyopatiler, miyokardit ve kapak hastalıkları izler (4). HKM, açıklanamayan sol ventrikül hipertrofisi, miyosit düzensizliği ve fibrozis ile karakterizedir. HKM eksik penetrasyon ve değişken ekspresyon ile otozomal dominant bir modelde kalıtılan sarkomer proteinlerini (*MYBPC3* ve *MYH7* gibi) kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır (2). DKM'ye özgü özellikler, sistolik işlev bozukluğuna, iletim sistemi anormalliklerine ve yaşamı tehdit eden aritmilere karşın artan duyarlılığa yol açan sol ventrikül genişlemesi ve fibrotik yer değiştirmeyi içerir (2). Genetik vakaların yaklaşık 1/3'ünde tanımlanabilir ve en yaygın olarak hücre iskeleti proteinlerini etkileyen mutasyonlar bulunur; özellikle, *LMNA* ve *DES*'deki mutasyonlar, aritmojenik bir fenotip ile ilişkilidir (3).

AKM, bir veya her iki ventrikülü içeren miyokardın fibro-yağlı replasmanı ile karakterizedir. AKM, genellikle kardiyak dezmozomları etkileyen genetik bir kusurla birlikte eksik penetrans ve değişken ekspresyon ile otozomal dominant bir kalıtım modeline sahiptir (*PKP2* ve *DSP* en sık dahil olan genlerdir) (3).

Kanalopatiler, belirgin miyokardiyal yapısal anormalliklerin yokluğunda artmış ventriküler aritmi ve AKÖ riski ile ilişkilidir. UQTS tanısı, QTc  $\geq$  480 ms, UQTS risk puanı  $>$  3 (EKG, klinik öykü ve aile öyküsü ile ilgili birkaç ögeyi içeren bir tanı puanı) veya *KCNQ1*'in (UQTS1) veya *KCNH2*'nin (UQTS2) işlev kaybı varyantları veya *SCN5A*'nın (UQTS3) işlev kazancı varyantları gibi UQTS-ilişkili genlerden birinde kesin olarak patojenik bir mutasyon varlığında teşhis edilir (5). KQTS, bir QTc  $\leq$  340 ms veya bir QTc  $\leq$  360 ms ile karakterize edilir ve patojenik bir mutasyon (genellikle *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2* gibi potasyum kanal genlerinin bir işlev kazancı mutasyonu), ailede KQTS veya juvenil AKÖ öyküsü veya yapısal kalp hastalığı yokluğunda kardiyak arrestte hayatta kalma gibi en az bir başka düşündürücü özellik bulunur (2). BrS, spontan veya ilaca bağlı (sodyum kanal blokleri ile) ST yükselmesi  $\geq$  2 mm varlığında, sağ prekordiyal derivasyonda  $\geq$ 1 teşhis edilir ve genellikle *SCN5A*'nın fonksiyon kaybı mutasyonundan kaynaklanır, ancak vakaların sadece 1/3'ünde patojenik bir varyant bulunur (2). KPVT, genellikle egzersizle tetiklenen tipik çift yönlü veya polimorfik ventriküler taşikardilerle karakterizedir ve en yaygın olarak *RYR2* ve *CASQ2* mutasyonlarından kaynaklanır (6). Bu kanalopatilerin yanı sıra, konjenital iletim hastalığının (KİH) ailesel biçimlerinin potansiyel olarak yaşamı tehdit eden aritmik olaylara ve AKÖ'ye yatkınlık oluşturabileceğine dair artan kanıtlar vardır (6). Ailesel KİH, *LMNA* ile ilişkili DKM veya kompleks konjenital kalp hastalıkları (genellikle *Nkx2.5*, *GATA4*, *TBX5* gibi kardiyak gelişimi düzenleyen genlerdeki mutasyonlar nedeniyle) gibi yapısal bir kalp hastalığı bağlamında veya yapısal olarak normal bir kalpte ortaya çıkabilir (izole KİH) ikinci durumda, *SCN5A* ve *TRPM4* varyantları en çok bulunanlardır (2). Bununla birlikte, izole KİH 'li hastalara sıklıkla başka bir test yapılmadan kalp pili verilir; bu nedenle, genetik olarak belirlenmiş KİH 'in gerçek prevalansı ve ilgili gen türleri şu anda tam olarak anlaşılabilir değildir. Ayrıca, ailesel KİH ile ilgili genlerin çoğu, genellikle AKÖ araştırması için genetik panellere dahil edilmez.

Bu derlemede, AAÖ araştırması için moleküler otopsi kullanımına ilişkin bilimsel kanıtları özetlenmektedir ayrıca AKÖ konusunu ele alan yakın zamanda yayınlanan diğer makalelerden farklı olarak özellikle moleküler otopsi için yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin kullanımına odaklanarak, bu bağlamda NGS uygulamasına ilişkin en son verileri hem de

veri işleme ve yorumlamaya ilişkin teknik yönleri raporlamayı amaçladık.

### 1.1 Moleküler Otopsi

“Moleküler otopsi”, bir AAÖ'den sorumlu genetik bir nedeni saptamak için otopside toplanan kan veya dokudan izole edilen DNA'dan çalışılan postmortem genetik test süreçlerini ifade eder (7). Potansiyel olarak patojenik bir mutasyonun tanımlanması, hayatta kalan akrabaların taranmasını sağlar ve gelecekteki klinik yönetimleri için önemli derecede etkili olur (8). Ayrıca, başka türlü bir AAÖ'den muhtemelen sorumlu olan bir patofizyolojik substratın gösterilmesi, adli tıp araştırmaları için paha biçilmez bir unsur temsil eder. Bununla birlikte, genetik dizileme için en gelişmiş teknolojiler kullanıldığında bile moleküler bir otopsi olumsuz veya sonuçsuz olabilir. Aslında, tüm AAÖ vakaları genetik olarak belirlenmiş koşullara atfedilemez ve bilinmeyen öneme sahip genetik varyantlar yaygın olarak bulunur. Tanımlanan gen varyantını ölen kişinin fenotipi ile ilişkilendirmek ve varyantın aile içindeki ayrımını incelemek, kesin bir genotip-fenotip ilişkisi kurmak için önemli olabilir (9).

### 1.2. Sanger Dizileme

NGS teknolojileri, öncelikli olarak, hedeflenen ve önceden bilinen DNA bölgelerini aramak için oligonükleotit primerlerini kullanan Sanger dizilimi ile temsil edilmektedir. Sanger dizileme analizi, hastanın elektroferogramını bir kontrol ile karşılaştırarak gerçekleştirilir. Bu yaklaşımın kullanılması kolaydır ve genetik varyantların tanımlanması için neredeyse tam bir doğruluğa sahiptir (10). 2003 yılında tamamlanan ilk insan genomunun (İnsan Genom Projesi) dizilenmesi için de kullanılan bu yöntem, yaklaşık 30 yıldır genetik araştırmalar için altın standart olmuştur (2). Tarihsel olarak, moleküler otopsi çalışmaları, birkaç kanalopati ile ilişkili geni test etmek için Sanger dizilimine dayanıyordu (2). Basitliğine ve doğruluğuna rağmen, bu yaklaşım numune başına yüksek bir maliyete sahiptir ve bir seferde bir DNA parçasının dizilenmesine izin verir; bu nedenle, düşük verimli bir tekniktir. Ayrıca büyük ölçekli genetik tarama için yetersiz kalabilir. Bu nedenle, bu yaklaşım kaçınılmaz olarak diğer potansiyel hastalığa neden olan genler veya gen değiştiriciler hakkında bir miktar bilgi kaybıyla ilişkilidir ve bunun sonucunda genel olarak düşük bir “tanısal verim” elde edilir. “Mutasyon saptama verimi” olarak da bilinen bu terim, hastalığa neden olan bir varyantın tanımlanma olasılığını belirtir ve bir genetik testin etkinliğinin iyi bir ölçüsünü temsil eder (10).

#### 1.2.1. Ani Kardiyak Ölümde Sanger Dizilimi

1999 yılında Ackerman ve ark.(11) boğulmak üzereyken anoksik ensefalopatiden ölen 19 yaşındaki bir çocukta yeni bir UQTS patojenik mutasyonu (*KCNQ1*) tanımlayarak ilk moleküler otopsiyi gerçekleştirdi. Birkaç yıl sonra Chugh ve ark. (12) 12 AKÖ vakasında

5 UQTS ile ilişkili geni (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1* ve *KCNE2*) test etti ve 2 denekte aynı *KCNH2* yanlış anlamlı mutasyonu tanımladı (%17). Di Paolo ve ark.(13) daha sonra 10 juvenil AKÖ vakasının 2'sinde mutasyon saptama verimi %20 olan UQTS ile ilişkili bir mutasyon bildirdi. UQTS genlerini analiz eden, Skinner ve ark. (14) %15 (33 AAÖ vakasından 5'i) ve Winkel ve ark. (15) %11 (44 AAÖ vakasından 5'i) olarak her iki çalışma düşük bir tanı verimi gösterdi. Tester ve ark. (16) *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *RYR2* genleri için test edilen 173 AAÖ vakası dahil, şimdiye kadar Sanger dizilimini kullanan en büyük moleküler otopsi çalışmasını gerçekleştirdi. *RYR2*'deki mutasyonlar örneklerin %12'sinde ve %15'inde LQTS ile ilişkili genlerde potansiyel olarak patojenik varyantlar bulundu. Özellikle, ailesinde kardiyak olay öyküsü olan AAÖ vakaları, önemli ölçüde daha yüksek mutasyon prevalansı (%37'ye karşı %19) gösterdi ve 50 yaşın altındaki ve ailesinde erken AKÖ öyküsü olan vakalar arasında tanısal sonuç daha da yüksekti (%45) (16). Genel olarak, bu çalışmalar AAÖ'nin önemli bir bölümünün bir kanalopatının neden olduğu ölümcül bir aritmik olaydan kaynaklandığını göstermiştir. Ancak çalışmalar arası mutasyon saptama verimi oldukça değişkendi ve muhtemelen incelenen popülasyon, analiz edilen genlerin DNA kaynak sayısı (kan, parafine gömülü doku) ve varyant patojenitenin atfedilmesine yönelik kriterler açısından önemli bir heterojenliği yansıtıyordu. Bununla birlikte, bu çalışmalardan elde edilen kanıtlar neticesinde, Kalp Ritmi Derneği ve Avrupa Kalp Ritmi Derneği tarafından kardiyomyopatiler ve kanalopatiler için genetik testler hakkında kapsamlı veya hedefli (*RYR2*, *KCNQ1*, *KCNH2*, ve *SCN5A*) ölüm nedenini belirlemek ve özellikle UQTS veya KPVT'den şüphelenildiğinde, potansiyel olarak risk altındaki akrabaların taranmasını kolaylaştırmak için AAÖ vakalarında iyon kanalı genetik testi düşünülebilir (2).

### 1.3. Yeni Nesil Dizileme

Daha çok NGS teknolojileri olarak bilinen büyük ölçüde paralel dizileme teknolojileri, birinci nesil dizilemenin engellerini aşmak için tasarlanmıştır (10). NGS, "kısa okumalar" olarak adlandırılan 50 ila 250 baz çiftinden (bp) oluşan milyonlarca küçük polinükleotit fragmanını eş zamanlı olarak analiz ederek yüksek verimli dizilemeye izin verir. Örnek DNA, 1000 ila 10.000 bp'lik parçalar halinde kesilir ve NGS, parçanın her iki ucundan 50-250 bp okur. Her okuma, parçanın karşı ucundan gelen okumayla "eşleştirilir", daha sonra tüm orijinal DNA dizisini yeniden oluşturmak için "insan referans dizisine" (farklı etnik gruplardan türetilen klinik ve araştırma genom dizilimi için en yaygın olarak benimsenen çerçeveye) yönelik kısa okuma dizilerini sıralamak için hizalama algoritmaları kullanılır. Daha sonra, klinik

anlamlılığın atfedilmesi daha fazla araştırma gerektirse de, ilgili bir varyantın altında kalabilecek okumalar ve referans sekans arasındaki uyumsuzlukları aramak için özel bir yazılım kullanılır. Bu süreç çok hızlı ve uygun maliyetlidir, tüm genomun sadece sınırlı miktarda DNA kullanılarak birkaç gün içinde dizilenmesine olanak tanır (10). NGS teknolojisi, genomun çoğu parçası için doğru ve güvenilir veriler sağlar ve Sanger dizilimine karşı kapsamlı bir şekilde doğrulanmıştır. Illumina/Solexa en çok kullanılan olmak üzere, ticari olarak temin edilebilen 3 NGS platformu (Roche/454, Illumina/Solexa ve ABI/SOLiD) vardır. Bir NGS testi, sınırlı bir gen panelini, tüm ekzomu (TED), tüm genomu (TGD) ve hatta RNA dizilimini hedeflemek için tasarlanabilir (2).

Gen panelleri, on ila binlerce gen arasında değişebilir ve belirli bir durum veya hastalık grubundan şüphelenildiğinde tercih edilen testtir. Genellikle önceden belirli bir fenotiple ilişkilendirilen genler arasından seçilir. Bu yaklaşım, seçilen genler için duyarlılığı, özgüllüğü ve kapsamı en üst düzeye çıkarmayı amaçlar, dolayısıyla genellikle TED veya TGD diziliminden daha yüksek bir tanı verimine sahiptir (17). AAÖ'de olduğu gibi fenotip bilgisi azlığı durumunda, daha geniş gen panelleri tercih edilebilir ve TED dizilimi daha yüksek bir teşhis verimi gösterebilir. Panele hangi genlerin dahil edileceğine ilişkin karar bireysel laboratuvara bırakılmıştır. AKÖ çalışmaları genellikle hem kanalopatiler hem de kardiyomyopatilerle ilişkili genleri içerir (17). TED, tüm genomun %1-2'sini oluşturan, bilinen ~22.000 protein kodlayan genin tümünü inceler. TED, geniş bir ayırıcı tanıya sahip fenotiplerin genetik testi için veya hedeflenen genetik paneller sonuçsuz kaldığında ikinci sıradaki test olarak kullanılır. TED'in tanısal verimi, yüksek oranda seçilmiş kohortlarda %50'ye varan bir mutasyon saptama verimiyle birlikte, test edilen popülasyona ve aile üyelerinin mevcudiyetine bağlıdır. TGD, düzenleyici, intronik ve intergenik bölgeler hakkında bilgi sağlayarak tüm genomun büyük bir bölümünü kapsar (2).

TGD kullanımı için endikasyonlar TED'e benzer. DNA dizilimi TED'den daha tekdüzedir, ancak sağlanan büyük miktarda veri, depolama ve analitik sorunlar nedeniyle uygulanabilirliğini sınırlar. TGD ayrıca TED veya gen panellerinden daha yüksek bir maliyete sahiptir. RNA-seq, hedeflenen RNA transkriptleri veya hatta tüm transkriptom hakkında mikrodizilerden daha üstün bir genel doğrulukla bilgi sağlar (17).

#### 1.3.1. Varyant Çağırma, Filtreleme, Önceliklendirme ve Yorumlama

NGS, klinik yorumlama için daha fazla filtreleme ve önceliklendirme gerektiren çok sayıda varyant sağlar. Farklı dosyalar üreten çok adımlı bir analizde çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılır: FASTQ, üretilen tüm

okumaların temel çağrılarını ve her bir tabanın kalite puanını içerir; BAM (İkili Hizalanmış/Eşlenmiş dosya), referans genom üzerinde okuma hizalaması sağlar; VCF (Varyant Call Format dosyası), her bir varyantın kromozomal konumunu, adını ve referans genomunu içerir (2). “Varyant çağırma”, referans genom ile onun üzerinde hizalanan okumalar arasındaki uyumsuzlukları belirleme sürecidir. Sıralama ve hizalama hatalarından kaynaklanan hatalar olabilir ve belirli istatistiksel araçlar, tespit edilen bir uyumsuzluğun gerçek bir gen varyantını veya teknik bir hatayı temsil etme olasılığına dayalı olarak varyantları “filtrelemek” için ayrılmıştır (2). Varyantlar genellikle, okuma kapsamı (yani bazların belirli bir nükleotid konumuna hizalanması)  $\geq 30$  kat ve okuma yüzdesi (referans dizisinden farklı bazların oranı)  $\geq 20$ 'den oluşan bir kalite puanına göre tanımlanır. Tek nükleotid polimorfizmlerinden kaynaklanan yanlış anlamlı mutasyonların NGS yoluyla saptanması daha kolaydır, oysa DNA insersiyon ve delesyonlarını (indel) bulma olasılığı, daha yüksek hizalama hataları sıklığı nedeniyle indel boyutuyla ters orantılıdır (2). Bu ‘teknik filtreleme’den sonra varyantlar ‘biyolojik filtreleme’den geçmelidir. Gerçekten de, nadir varyantlar, genel popülasyonda mevcut olan ve “arka plan gürültüsü” olarak tanımlanan çok sayıda yanlış anlamlı mutasyon biyolojik ilişkisinden ayırt edilmelidir. Örnek DNA’daki nadir varyantların arka plan gürültüsüne oranına ‘sinyal-gürültü oranı’ denir (18). Varyantlar, önceden tanımlanmış bir gen listesi (örneğin, minör alel frekansı - MAF  $< 0,1$ , nadir varyantlar için) ve/veya insan genetik veri tabanlarındaki belirli bir frekans için filtrelenebilir. Erken genomik çalışmalarda, sağlıklı bir kontrol popülasyonunda bir varyantın olmaması, olası patojenitesini ortaya çıkarmak için yeterli kabul edildi, ancak bir mutasyonun yeniliği artık klinik yorumlama için güvenilir bir kriter olarak kabul edilmemektedir (18). Bununla birlikte, dahil olan genin tipi (örneğin, bir kanalopati veya kardiyomyopati ile ilişkili gen), bir varyantın klinik önemine dair ipuçları sağlayabilir. Biyolojik filtrasyon için bir diğer önemli kriter, mutasyonun tipidir, yani yanlış anlamlıya karşı anlamsızdır. Yanlış anlamlı mutasyonlar, etkilenmemiş bireylerde yaygındır ve genotip-fenotip nedensel bağının değerlendirilmesi daha zordur. Aksine, anlamsız mutasyonların (örneğin, silmeler, eklemeler ve splice-site mutasyonlar) anormal proteinler üretmesi ve ardından klinik bir etkiye sahip olması daha olasıdır. Buna göre, “nonsense” mutasyonlar daha nadirdir ve görünüşte sağlıklı bireylerde bulunma olasılığı daha düşüktür (18). Filtrelemeden sonra, bir VCF dosyasındaki varyantlara öncelik verilmeli, yani bir varyantın işlevsel bir öneme sahip olma olasılığı belirlenmelidir (19). Varyantlara öncelik vermek için çok sayıda yaklaşım ve bu süreci standart hale

getirmek için kılavuzlar yayınlanmıştır. Bir varyantın önceki açıklaması, klinik öneminin yorumlanmasına rehberlik etmek için önemli bir kriterdir. ClinVar veya OMIM gibi veritabanları, daha önce değerlendirilen varyantlar hakkında bilgi toplar. ClinVar, bilimsel literatürde bulunan her varyant için kategorik bir kanıt düzeyi sağlar. Aslında, önceki tüm raporlar kuvvetli değildir ve bilgi genişledikçe mutasyonlar yeniden sınıflandırılabilir. Örneğin, Campuzano ve ark. (20) yakın zamanda, 2010’dan önce kalıtsal aritmojenik sendromlarla teşhis edilen 104 denek ve 17 AKÖ vakasından oluşan bir kohortu yeniden değerlendirdi ve bu koşullarla ilişkili nadir varyantların %70’inden fazlasının sınıflandırmalarını değiştirdiğini buldu. In silico araçları (DANN, Mutation Taster, FATHMM, MutationAssessor, Polyphen2, Sift, PORVEAN) genetik bir mutasyonun protein üzerindeki etkisini tahmin etmek için kullanılabilir. Protein yapısını derinden değiştiren veya bir amino asidin kritik bir alanda tamamen farklı kimyasal özelliklere sahip başka bir amino asit ile yer değiştirmesine neden olan mutasyonların, işlevsel bir değişikliğe neden olma olasılığı daha yüksektir. Özellikle, benzer işleve sahip diğer insan proteinlerinde (paraloglar) veya diğer türlerde (ortologlar) aynı proteinde korunan protein alanlarındaki aminoasidik ikameler genellikle klinik olarak daha önemlidir. GERP++ veya PhyloP gibi özel yazılımlar, DNA dizilerinin intra ve interspesifik korunmasını değerlendirebilir (21). Her zaman elde edilmesi kolay olmasa da, ailelerde fenotip ile genotipin birlikte ayrımı, bir varyantın patojenitesini değerlendirmek için en faydalı yaklaşımlardan biridir. Daha önce açıklanan yaklaşımların çoğu, tek bir mutasyonun dahil olduğu Mendel bozukluklarına uygulanabilir, ancak bazı durumlarda, özellikle AKÖ gibi karmaşık fenotiplerde, çoklu varyantların hastalık ekspresyonuna katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar vardır (21). WebGestalt gibi bazı çevrimiçi araçlar, belirli bir varyant kombinasyonunun belirli bir fenotiple ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceğini değerlendirmek için kullanılabilir. Son olarak, mutasyonların fonksiyonel sonuçları, in vitro hücresel ekspresyon sistemleri veya transgenik hayvan modelleri aracılığıyla tam olarak değerlendirilebilir. Bu fonksiyonel çalışmaların en büyük dezavantajı, sonuçların elde edilmesi için gereken maliyet ve zaman olup, bu da onları genetik bulguların rutin değerlendirilmesi için uygun hale getirmemektedir (21). Sonuç olarak, Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (ACMG) varyantları sınıflandırmak için standart terminolojinin (önemi bilinmeyen varyant (ÖBV) ve patojenik, muhtemel patojenik, muhtemel benign, benign) kullanılmasını tavsiye eder (7). NGS ile ilgili biyoinformatik analizlerin karmaşıklığı, alandaki sürekli ilerlemeler ve belirli bir varyantın



patojenitesinin atfedilmesinin bir bireyin yönetimi üzerinde sahip olabileceği derin etki göz önüne alındığında, genetik verilerin klinik ortama çevrilmesi özel uzmanlık gerektirir.

### 1.3.2. Zorluklar ve Teknik Sorunlar

#### 1.3.2.1 Örnek Toplama

Kan ve taze donmuş dokular, genetik analiz için DNA ekstraksiyonu için tercih edilen kaynaklardır. Gerçekten de, kanalopatiler ve kardiyomyopatiler için genetik testler hakkındaki HRS/EHRA konsensüs belgesi, “sonraki genetik testler için DNA dostu (5–10 mL etilendiamintetraasetik asit içinde tam kan-EDTA-tüp, kan lekisi kartı veya donmuş bir kalp, karaciğer veya dalak numunesi) numunelerin” toplanmasını önermektedir. DNA bütünlüğünü bozmamak için bu numuneler buzdolabında (<4 hafta) veya -20° C ila -80° C (>4 hafta) arasında dondurularak saklanmalıdır (2). Yakın zamanda yayınlanan Asya Pasifik Kalp Ritmi Derneği (APHR)/HRS konsensüs belgesinde, AAÖ’lü merhumların ve ani kalp durması olan hastaların araştırılmasına ilişkin benzer öneriler bulunabilir (22). Gelecekteki yeniden analiz için kan örneğinin saklanması artık AKÖ değerlendirmesinde yaygın bir uygulama olmasına rağmen, geçmiş AKÖ vakaları için her zaman mevcut değildir ve bunların yeniden incelenmesine sınırlamalar getirir. Aksine, genellikle histolojik analiz için hazırlanan formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku (FFPET) örnekleri, eski AKÖ vakaları için bile geniş ölçüde erişilebilir durumdadır ve değerli bir alternatif oluşturabilir. Bununla birlikte, formalin fiksasyonu süreci, ortalama uzunluğu ~ 150 bp olan parçalarda çapraz bağlanma ve bozunma yoluyla DNA’yı değiştirir. 250 bp’den büyük bir okuma uzunluğuna dayanan Sanger dizilimi, bu nedenle FFPET’ten türetilen DNA üzerinde gerçekleştirilmesi zordur. NGS, daha düşük okuma uzunluğu sayesinde bu sınırlamaların üstesinden gelebilir (2). 2017 yılında Baudhuin ve ark. (23) kalıtsal bir kardiyovasküler bozukluğu düşündüren bir klinik fenotipe sahip 4 vakanın genomik değerlendirmesi için FFPET örneklerini ilk kez kullandılar. Aynı yıl, Bagnall ve ark. (24) Jüvenil AKÖ vakalarından alınan FFPET numuneleri üzerinde NGS’nin uygulanabilirliğini gösteren ilk kişilerdi. Yakın tarihli bir çalışma, FFPET ve karşılık gelen formalin olmayan sabit numuneler (RNA-sonradan korunmuş dokular veya kan lekisi kartı) arasındaki 12 AKÖ vakasının NGS analizinin sonuçlarını karşılaştırdı. Sabitlenmemiş numunelerde tanımlanan tüm patojenik varyantlar, olası patojenik varyantlar veya ÖBV, FFPET numunelerinde de değişken bir güven derecesi ile doğrulanmıştır, ancak formalin fiksasyonu 8 günden uzun olduğunda daha fazla yanlış pozitif ve negatif verdi (25). Bu nedenle, genomik çalışmalar için FFPET’ten türetilen DNA kullanımı konusunda dikkatli olunması önerilir.

#### 1.3.2.2. Dizileme ile İlişkili Sorunlar

NGS, genomun tüm alanlarını aynı hassasiyetle karakterize etmez. Seçici dizileme için yakalama yaklaşımları ve dizileme kimyasının kendisi, değişkenlerin yanlış yorumlanmasına neden olabilecek eşit olmayan DNA kapsamına yol açabilir. Örneğin, genomun sitozin ve guanin nükleotidleri açısından zengin bölgelerinin sıralanması daha zordur çünkü DNA zincirleri arasındaki daha yüksek enerjili bağlar onları replikasyon reaksiyonuna daha az maruz bırakır. Kapsama alanının düşük olduğu bölgelerde kesinlik azaldığından, bu bölgelerden yapılan varyant çağruların reddedilme olasılığı daha yüksektir (26). NGS ayrıca, en yaygın olarak eklemeye veya silme alanlarını veya kısa okumalardan daha uzun tekrarlanan dizilere sahip DNA bölgelerini etkileyen hizalama hatalarına eğilimlidir (26). Tüm bu sorunlar potansiyel yanlış negatif sonuçların kaynaklarıdır ve analiz ve sıralamanın hızında ve doğruluğunda sürekli iyileştirmeye rağmen NGS teknolojilerinin mükemmel olmadığına altını çizer.

#### 1.3.2.3 Önemli Bilinmeyen Varyantlar

NGS teknolojileri, tek bir bireyde tespit edilebilen varyantların sayısını önemli ölçüde artırmıştır; bu nedenle, genotip ve fenotip arasında nedensel bir bağlantı kurmak için mutasyonların sınıflandırılması son derece önemlidir. Varyant önceliklendirmesi için çeşitli araçların mevcut olmasına rağmen, bunların çoğu (mutasyonların fonksiyonel değerlendirmesine yönelik büyük ortak ayrıştırma çalışmaları gibi) AAÖ vakalarına rutin olarak uygulanamaz; bu nedenle, gen testinin genişlemesiyle birlikte ÖBV (çoğunlukla yanlış anlamlı) tespitinde bir artış meydana gelir (18). Bu, şu anda NGS moleküler otopsisinin ana dezavantajı olarak kabul edilmektedir, çünkü bu ÖBV ‘ler nedensel ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılamaz ve mağdurun akrabalarının taranması için kullanılamaz. Bununla birlikte, NGS’nin daha yaygın kullanımı ve bunun sonucunda AKÖ ile ilişkili varyantlar üzerine veri birikiminin yanı sıra tek veya kombine mutasyonların etkisinin tahmini için daha karmaşık araçların geliştirilmesi ile yakın gelecekte çok sayıda ÖBV’nin yeniden sınıflandırılması bekleniyor (7,18).

## 2. TARTIŞMA VE SONUÇ

NGS, perspektifi tek genlerin veya küçük panellerin taranmasından büyük çok genli panellerin test edilmesine kadar değiştirerek bir “ekzom moleküler otopsi” imkanı sunar. 2014 yılında Bagnall ve ark.ları (24) ilk kez 28 jüvenil AAÖ vakasında TED uyguladılar ve majör *LQTS* ile ilişkili genler üzerinde 3 nadir varyant tanımlandılar, ancak panelin diğer kanalopati ve kardiyomyopati ile ilişkili genlere genişletilmesi 6 nadir varyantın daha fazla tanımlanmasına yol açtı. Sonraki bir çalışmada, aynı grup 51 AAÖ vakasında gen paneli analizi (69, 98 veya 101 gen dahil) ve diğer

62 AAÖ vakasında TED (59 kalple ilgili gen için filtreleme) gerçekleştirerek 31 vakada klinik olarak ilgili bir kardiyak gende mutasyon (%27) buldu (2). Hata ve ark. (27) normal kalpleri veya tanısız olmayan yapısal anormallikleri olan 25 AAÖ vakasını değerlendirmek için 70 genden oluşan bir panel kullandı. İn silico analizinden sonra “yüksek” patojenik potansiyele sahip olduğu tahmin edilen 5 bilinen varyant ve 10 yeni varyant tanımladılar. Mutasyonlar, 3 kanalopati ile ilişkili gen (*RYR2*, *CACNA1C* ve *ANK2*), 3 HCM veya DCM ile ilişkili gen (*MYH7*, *LDB3* ve *PRKAG2*), 5 ACM ile ilişkili gen (*PKP2*, *JUP*, *DSG2*, *DSP* ve *TMEM43*) ve 2 kardiyak transkripsiyon faktörü geni (*TBX5* ve *GATA4*) içermiştir. İlginç bir şekilde, 25 vakanın 3’ünde kombine heterozigot nadir varyantlar bulundu ve 2 denek 3 veya daha fazla varyant taşıdı (27). Bu veriler, bir vaka raporunda da öne sürüldüğü gibi, bazen çoklu mutasyonların etkileşiminden kaynaklanabilen “tek gen-bir hastalık” paradigmasının tüm AAÖ vakaları için geçerli olmayabileceği fikrini desteklemektedir (28). 59 AAÖ vakası üzerinde yapılan bir çalışma, hem otopsi negatif kalpleri olan hem de herhangi bir spesifik kardiyomiyopati için tanı kriterlerini karşılamayan hafif kardiyak yapısal anormallikleri olan diğer kişileri içermiştir; TED’i takiben kalıtsal kardiyak bozukluklarla ilişkili 135 gen için kısıtlama %29’luk bir tanı verimine sahiptir, 7 proband (%12) çok nadir (MAF < %0.02) veya yeni olası patojenik varyantlar taşımaktadır ve 10 (%17) daha önce taşımaktadır. Yayınlanmış nadir (MAF %0.02-0.5) hastalığa neden olan mutasyonlar; test edilen daha yüksek sayıda gen, probandların 19’ünde (%34) bulunan ÖBV tespitinde bir artışa yol açmıştır (2). Hertz ve ark. (29) ince kardiyak anormallikleri olan 52 AKÖ vakasını taramak için 100 kanalopati ve kardiyomiyopati ile ilgili genden oluşan bir panel kullandı. 15 vakada (%29) “muhtemel fonksiyonel etkileri” olan varyantlar tespit edildi ve bunların 2’sinde (%4) en az bir gende birden fazla varyant vardı. Bu mutasyonlar, kardiyomiyopatiler (%47) veya kanalopatiler (%53) ile ilişkili genlerde benzer sıklıkta tespit edildi. Bu bulgular kardiyomiyopatilerin bazen “diagnostik” bir fenotip gelişmeden önce AKÖ ile ortaya çıkabileceği hipotezini doğrulamaktadır, ancak aynı zamanda kanalopatilerin sadece otopside minimal yapısal değişikliklerin varlığına dayanarak dışlanmaması gerektiğini de göstermektedir. Ripoll-Vera ve ark. (30) 62 AKÖ’nün moleküler otopsi için aritmik ani ölümlerle ilgili çok geniş sayıda gen (194 ila 380) için filtreledi, yaklaşık olarak bir ÖBV bulma pahasına patojenik veya muhtemelen patojenik mutasyonlar için vakaların %34’ünde %31’lik bir genel tespit verimi elde edildi. Dewar ve ark. (31) 5

yaşından küçük 191 AAÖ’de 71 genden oluşan bir panel kullanan bugüne kadarki en büyük çalışmalardan birini yayınladı. 12 çocukta (%6.3) potansiyel olarak patojenik bir mutasyon, 15’inde (%7.9) in silico patojenik tahmine sahip yeni bir varyant ve 36’sında (%18.9) bir ÖBV bulundu. Lahrouchi ve ark. (32) bunun yerine, 1-64 yaşları arasındaki 302 AAÖ vakasında 71 genden oluşan bir panel kullandı ve hatta ince yapısal hastalık kanıtı olan denekler hariç tutuldu. 40 denek (%13) patojenik veya olası patojenik mutasyon taşıırken, %42’si ÖBV taşıyordu. Çoğu mutasyon, UQTS ve KPVT ile ilişkili genleri içeriyordu, ancak kardiyomiyopati ile ilgili genler de temsil edildi. Özellikle, hayatta kalan akrabalarda, moleküler otopsi ve klinik değerlendirme kombinasyonu sayesinde tanı verimi %26’dan %39’a yükseldi (32).

Son zamanlarda, taranan genlerin heterojenliği, analiz edilen vakalar ve varyant önceliklendirme için kullanılan yöntemler nedeniyle her zaman karşılaştırılabilir olmayan değişken mutasyon tespit oranları ile başka postmortem NGS çalışmaları yapılmıştır (2). Genel olarak, Sanger dizilimine dayalı moleküler otopsi ile karşılaştırıldığında, NGS çalışmaları, kardiyomiyopati genlerinin bazı AAÖ vakalarında, özellikle tanısız olmayan kardiyak anormalliklerin varlığında, hatta bunların yokluğunda bile rol oynayabileceğini vurgulamıştır. Bununla birlikte, test edilen genlerin genişlemesi, çoğunlukla, tüm AAÖ vakalarında test edilmesi gereken en yaygın 5 kanalopati ile ilgili genin (*KCNH2*, *KCNJ2*, *KCNQ1*, *RYR2* ve *SCN5A*) hala oynadığı ana rol nedeniyle, AAÖ’nin genel tanı verimini biraz artırmıştır (ortalama olarak %20’den yaklaşık %35’e kadar).

Moleküler otopsi, nihai amacı adli tıp araştırmalarına yardımcı olmak ve mağdurların akrabalarının kademeli genetik taramasını yönlendirmektir. Geleneksel otopsi sonuçsuz olduğunda genetik bir teşhis koymayı amaçlayan adli muayene için temel bir yardımcıdır. Moleküler otopsinin tanısız verimi klasik Sanger dizilimi ile ortalama %20’dir, ancak hedeflenen NGS veya TED ile daha fazla sayıda ÖBV’nin saptanması pahasına %35’e ve daha fazlasına kadar yükselir. İnkâr edilemez avantajlarına rağmen, moleküler otopsinin nispeten düşük mutasyon saptama verimi, şu anda her zaman kapsamlı bir klinik değerlendirme gerektiren AAÖ’nin değerlendirilmesinde tek başına bir araç olmasını engellemektedir. Bununla birlikte, genomik teknolojiler aracılığıyla moleküler otopsi, yeni genotip-fenotip ilişkilerini ortaya çıkarabilecek gelecekteki yeniden değerlendirmeler için veri depolama imkanı sunar ve böylece bu yaklaşımın kapsamlı bir şekilde kullanılmasını destekler.

**Finans:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almamışlardır.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**KAYNAKLAR**

1. Banner J, Basso C, Tolkien Z, Kholova I, Michaud K, Gallaghe PJ. Autopsy examination in sudden cardiac death: a current perspective on behalf of the association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Archiv* 2021;478(4):687-93.
2. Castiglione EV, Modena M, Aimo A, Chiti E, Botto N, Vittorini S, Guidi B, Vergaro G, Barison A, Rossi A, Passino C, Giannoni A, Paolo MD, Emdin M. Molecular autopsy of sudden cardiac death in the genomics. *Diagnostics* 2021;11(8):1378.
3. Vahatalo JH, Holmström LTA, Pylkas K, Skarp S, Porvari K, Pakanen L, Kaikkonen KS, Perkiömaki JS, Kerkela R, Huikuri HV, Myerburg RJ, Junttila MJ. Genetic variants associated with sudden cardiac death in victims with single vessel coronary artery disease and left ventricular hypertrophy with or without fibrosis. *Front Cardiovasc Med* 2022;8:755062.
4. Mazzaccara C, Mirra B, Barretta B, Lombardo B, Scudiero O, Frisso G. Sudden cardiac death in young athletes: Literature review of molecular basis. *Cardiogenetics* 2020;10:8860.
5. Ergül Y, Şahin GT, Kafalı HC, Öztürk E, Özgür S, Haydin S, Güzeltaş A. Clinical and genetic characteristics and course of congenital long QT syndrome in children: A nine-year single-center experience. *Anatol J Cardiol* 2021;25:250-7.
6. Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, Bloma N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekval TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ, ESC Scientific Document Group. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death the task force for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death of the Europea. *Eur Heart J* 2015;36(41):2793-867.
7. Scheiper-Welling S, Tabunscik M, Gross TE, Jeneweine T, Beckmann BM, Niess C, Gradhand E, Wunder C, Schneider PM, Rothschild MA, Verhof MA, Kaufenstein S. Variant interpretation in molecular autopsy: a useful dilemma. *International Journal of Legal Medicine* 2022;136(2):475-82.
8. Brohus M, Arsov T, Wallace DA, Jensen HH, Nyegaard M, Crotti L, Adamski M, Zhang Y, Field MA, Athanasopoulos V, Baro I, Ribeiro de Oliveira-Mendes BB, Redon R, Charpentier F, Raju H, DiSilvestre D, Wei J, Wang R, Rafahi H, Kaspi A, Bahlo M, Dick IE, Chen SRW, Cook MC, Vinuesa CG, Overgaard MT, Schwartz PJ. Infanticide vs. inherited cardiac arrhythmias. *EP Eur* 2021;23:441-50.
9. Grassi S, Vidal MC, Campuzano O, Arena V, Alfonsetti A, Rossi SS, Scarnicci F, Iglesias A, Brugada R, Oliva A. Sudden death without a clear cause after comprehensive investigation: An example of forensic approach to atypical/uncertain findings. *Diagnostics* 2021;11:886.
10. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17(6):333-51.
11. Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ, Edwards WD. Molecular diagnosis of the inherited Long-QT syndrome in a woman who died after near-drowning. *N Engl J Med* 1999; 341(15):1121-5.
12. Chugh SS, Senashova O, Watts A, Tran PT, Zhou Z, Gong Q, Titus JL, Hayflick SJ. Postmortem molecular screening in unexplained sudden death. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(9):1625-9.
13. Di Paolo M, Luchini D, Bloise R, Priori SG. Postmortem Molecular Analysis in Victims of Sudden Unexplained Death. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2004;25(2):182-4.
14. Skinner JR, Crawford J, Smith W, Aitken A, Heaven D, Evans CA, Hayes I, Neas, KR, Stables S, Koelmeyer T, Denmark L, Vuletic J, Maxwell F, White K, Yang T, Roden DM, Leren TP, Shelling A, Love DR. Prospective, population-based Long QT molecular autopsy study of postmortem negative sudden death in 1 to 40 year olds. *Heart Rhythm* 2011;8(3):412-9.
15. Winkel BG, Holst AG, Theilade J, Kristensen IB, Thomsen JL, Ottesen GL, Bundgaard H, Svendsen JH, Haunso S, Tfelt-Hansen J. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. *Eur Heart J* 2011;32(8):983-90.
16. Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Cardiac channel molecular autopsy: Insights from 173 consecutive cases of autopsy-negative sudden unexplained death referred for postmortem genetic testing. *Mayo Clin Proc* 2012;87(6):524-39.
17. Adams DR, Eng CM. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N Engl J Med* 2019;380(2):1353-62.
18. Miles CJ, Behr ER. The role of genetic testing in unexplained sudden death. *Transl Res J Lab Clin Med* 2016;168:59-73.
19. Biesecker LG, Harrison SM, ClinGen sequence variant interpretation working group. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2018;20(12):1687-8.
20. Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Fernandez-Falgueras A, Coll M, Iglesias A, Ferrer-Costa C, Cesar S, Arbelo E, Garcia-Alvarez A, Jorda P, Toro R, Tiron de Liano C, Grassi S, Oliva A, Brugada J, Brugada R. Reanalysis and reclassification of rare genetic variants associated with inherited arrhythmic syndromes. *E BioMedicine* 2020;54:102732.
21. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, ACMG laboratory quality assurance committee. 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. *Genet. Med. Off. J Am Coll Med Genet* 2015; 17(5):405-24.
22. Stiles MK, Wilde AAM, Abrams DJ, Ackerman MJ, Albert CM, Behr ER, Chugh, SS, Cornel MC, Gardner K, Ingles J, James CA, Juang JMJ, Kaab S, Kaufman ES, Krahn AD, Lubitz SA, MacLeod H, Morillo CA, Nademanee K, Probst V, Saarel EV, Sacilotto L, Semsarian C, Sheppard MN, Shimizu W, Skinner JR, Tfelt-Hansen J, Wang DW. 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;37(3):481-534.
23. Baudhuin LM, Leduc C, Train LJ, Avula R, Kluge ML, Kotzer KE, Lin PT, Ackerman MJ, Maleszewski JJ. Technical advances for the clinical genomic evaluation of sudden cardiac death. *Circ Cardiovasc Genet* 2017;10:e001844.
24. Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Berkovic SF, Semsarian C. Exome sequencing-based molecular autopsy of formalin-fixed paraffin-embedded tissue after sudden death. *Genet Med* 2017;19(10):1127-33.

25. Lin Y, Gryazeva T, Wang D, Zhou B, Um SY, Eng LS, Ruitter K, Rojas L, Williams N, Sampson BA, Tang Y. Using postmortem formalin fixed paraffin-embedded tissues for molecular testing of sudden cardiac death: a cautionary tale of utility and limitations. *Forensic Sci Int* 2020;308:110177.
26. Priest, J.R. A Primer to clinical genome sequencing. *Curr Opin Pediatr* 2017;29(5):513-9.
27. Hata Y, Kinoshita K, Mizumak K, Yamaguchi Y, Hirono K, Ichida F, Takasaki A, Mori H, Nishida N. Postmortem genetic analysis of sudden unexplained death syndrome under 50 years of age: A next-generation sequencing study. *Heart Rhythm* 2016;13(7):1544-51.
28. Modena M, Castiglione V, Aretini P, Mazzanti CM, Chiti E, Giannoni A, Emdin M, Di Paolo M. Unveiling a sudden unexplained death case by whole exome sequencing and bioinformatic analysis. *Mol Genet Genomic Med* 2020;8(4):e1182.
29. Hertz CL, Christiansen SL, Ferrero-Miliani L, Dahl M, Weeke PE, Ottesen GL, Frank-Hansen R, Bundgaard H, Morling N. Next-generation sequencing of 100 candidate genes in young victims of suspected sudden cardiac death with structural abnormalities of the heart. *Int J Leg Med* 2016;130(1):91-02.
30. Ripoll-Vera T, Perez Luengo C, Borondo Alcazar JC, Garcia Ruiz AB, Sanchez Del Valle N, Barcelo Martin B, Poncela Garcia JL, Gutierrez Buitrago G, Dasi Martinez C, Canos Villena JC, Moyano Corvillo S, Esgueva Pallares R, Sancho Sancho JR, Guitart Pinedo G, Hernandez Marin E, Garcia Garcia E, Vingut Lopez A, Alvarez Rubio J, Govea Callizo N, Gomez Perez Y, Melia Mesquida C, Heine D, Rosell Andreo J, Socias Crespi L. Sudden cardiac death in persons aged 50 years or younger: diagnostic yield of a regional molecular autopsy program using massive sequencing. *Rev Esp Cardiol Engl Ed* 2021;74(5):402-13.
31. Dewar LJ, Alcaide M, Fornika D, D'Amato L, Shafaatalab S, Stevens CM, Balachandra T, Phillips SM, Sanatani S, Morin RD, Tibbits GF. Investigating the genetic causes of sudden unexpected death in children through targeted next-generation sequencing analysis. *Circ Cardiovasc Genet* 2017;10(4):e001738.
32. Lahrouchi N, Raju H, Lodder EM, Papatheodorou E, Ware JS, Papadakis M, Tadros R, Cole D, Skinner JR, Crawford J, Love DR, Pua CJ, Soh BY, Bhalshankar JD, Govind Risha, Tfelt-Hansen J, Winkel BG, Van Der Werf C, Wijeyeratne YD, Mellor G, Till J, Cohen MC, Tome-Esteban M, Sharma S, Wilde AAM, Cook SA, Bezzina CR, Sheppard MN, Behr ER. Utility of post-mortem genetic testing in cases of sudden arrhythmic death syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69(17):2134-145.