

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Genetické a molekulární příčiny
neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění**

Ing. Ivana Jedličková
2021

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: : Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu,
Laboratoř pro studium vzácných nemocí.

Školitel: prof. Ing. Stanislav Kmoch, CSc

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
1. Úvod	5
2. Cíle práce	5
3. Metodika	6
3.1. Exomové sekvenování	7
3.2. Sekvenování s dlouhým čtením v reálném čase Pacific Biosciences	7
4. Výsledky a komentář k vybraným publikovaným pracem	8
4.1. Studium genetické a molekulární příčiny ANCL	8
4.1.1. Využití exomového sekvenování k identifikaci genetické příčiny ANCL ve spolupráci s mezinárodním konzorciem zvaným The adult NCL gene discovery consortium.	8
4.1.2. Objasnění patomechanismu 30 bp duplikace v genu <i>DNAJC5</i> kauzální pro AD-ANCL.	11
4.2. Stanovení genetické příčiny SMA fenotypu u pacientky s monoalelickou variantou <i>SMNI</i>	13
4.3. Využití DNA-sekvenační technologie s dlouhým čtením Pacific Biosciences pro vyšetření přítomnosti expanze <i>NOTCH2NLC</i> u pacienta s infantilní formou NIID. ...	16
5. Diskuse a závěr	17
6. Použitá literatura	19
7. Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace	24
8. Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace	25

Abstrakt

Metody sekvenování DNA druhé (NGS) a třetí generace (TGS) zásadním způsobem ovlivnily strategii identifikace genetických příčin nemocí. Především použití exomového sekvenování zvýšilo účinnost identifikace kauzálních variant ve studovaných souborech pacientů z jednotek na desítky procent.

Vzácné neurodegenerativní nemoci jsou unikátní svou klinickou i genetickou heterogenitou a širokou diferenciální diagnostikou. NGS a TGS technologie sehrály klíčovou roli v porozumění patomechanismu vzácných neurodegenerativních nemocí. Použití těchto technologií cestou výzkumu je u mnoha pacientů jedinou možností pro stanovení správné diagnózy, poskytnutí genetického poradenství a pro indikaci adekvátní léčby.

Tato dizertační práce se zaměřuje na studium molekulární příčiny vybraných vzácných neurodegenerativních nemocí - adultní neuronální ceroidní lipofuscinózy (ANCL), spinální svalové atrofie (SMA) a neuronální intranukleární inkluzní nemoci (NIID). Studium molekulární příčiny těchto klinických jednotek s využitím moderních metod sekvenování a analýzy DNA vedlo k identifikaci kauzálních variant v souboru ANCL pacientů, vytvoření metodického postupu pro genetické testování SMA pacientů s negativním *SMNI* nálezem a navržení metody pro vyšetření expanze tandemových repetice u NIID.

Abstract

Next-generation (NGS) and third-generation (TGS) sequencing methods have played a key role in strategies of disease genes identification. Especially the exome sequencing increased the efficiency of causal variants identification up to tens of percent in study cohorts.

Rare neurodegenerative diseases are clinically and genetically heterogeneous and show a broad differential diagnostics. NGS and TGS technologies have been crucial in our understanding of the pathomechanism of rare neurodegenerative diseases. Used by research laboratories, NGS and TGS have been essential for many patients to determine a correct diagnosis, provide genetic counselling and reach an adequate treatment.

This thesis focuses on molecular mechanisms of selected rare neurodegenerative diseases, namely adult neuronal ceroid lipofuscinosis (ANCL), spinal muscular atrophy (SMA) and neuronal intranuclear inclusion disease (NIID). Modern DNA sequencing methods led to

identification of causal lesions in ANCL suspect patients. We provide a concept of genetic testing for *SMNI* negative SMA patients and present a method for validation of tandem repeat expansion in NIID.

1. Úvod

Dle evropské klasifikace je nemoc definována jako vzácná, pokud postihuje méně než jednoho člověka na 2000 obyvatel (Moliner & Waligora, 2017; Nguengang Wakap *et al.*, 2020). Mezi vzácné neurodegenerativní nemoci můžeme řadit **specifické neurodegenerativní proteinopatie**, jako je neuronální intranukleární inkluzní nemoc (NIID), **neurometabolické nemoci**, jako jsou neuronální ceroidní lipofuscinózy (NCL), nebo **nervosvalové nemoci** jako jsou spinální svalové atrofie (SMA).

Jejich sjednocujícím prvkem je proces neurodegenerace, který je definován jako postupující zánik struktury a funkce specifických skupin neuronů různých oblastí nervového systému. Zasažená subpopulace neuronů určuje výslednou symptomatologii. (Przedborski *et al.*, 2003; Ambler, 2011).

V této práci se zaměřuji na dětské a dospělé pacienty s vybranými formami neurodegenerací, jelikož **neurodegenerativní nemoci jsou z hlediska správné (DNA)diagnostiky mimořádnou výzvou.**

2. Cíle práce

Hlavním cílem této dizertační práce bylo pokusit se odhalit genetickou příčinu a definovat molekulární mechanismus procesu neurodegenerace u vybraných pacientů s klinicko-patologickým obrazem vzácných neurodegenerativních nemocí ANCL, SMA a iNIID.

Metodicky byly použity DNA sekvenační technologie nové generace zahrnující exomové sekvenování na platformách SOLiD a Illumina, dále sekvenování s dlouhým čtením Pacific Biosciences v kombinaci s širokým spektrem molekulárně-biologických technik individuálně navržených pro každého pacienta a jeho specifickou patologii.

Jednotlivé části této práce mají následující cíle:

1. Identifikace genetické a molekulární příčiny ANCL.
 - 1.1. Využití exomového sekvenování k identifikaci genetické příčiny ANCL ve spolupráci s mezinárodním konzorciem „The adult NCL gene discovery consortium“.

- 1.2. Objasnění patomechanismu nově identifikované 30 bp duplikace v genu *DNAJC5*.
2. Stanovení genetické příčiny SMA fenotypu u pacientky s monoalelickou variantou *SMNI*.
3. Navržení metodiky a použití DNA-sekvenační technologie s dlouhým čtením Pacific Biosciences pro vyšetření přítomnosti expanze *NOTCH2NLC* u iNIID.

3. Metodika

Vývoj vysokokapacitního masivně paralelního sekvenování tzv. sekvenačních metod nové generace nebo také druhé generace (NGS) změnil přístup ve strategii identifikace nových genů podmiňujících vzácné nemoci.

U **monogenních nemocí** dominuje genomové sekvenování se zacílením na protein kódující oblasti souhrnně nazývané exom, tedy **exomové sekvenování** (Choi *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2010). Exom představuje ~1 % lidského genomu; dnes je známo, že 85 % kauzálních variant podmiňujících monogenní nemoci se nachází v těchto oblastech (Choi *et al.*, 2009). V posledních letech je exomové sekvenování používáno také pro hledání **de novo variant, kdy je sekvenováno tzv. trio, tedy proband a rodiče** (Goldmann *et al.*, 2019).

S ohledem na snižující se náklady na NGS sekvenování se stalo dostupnějším také **sekvenování kompletního genomu**, které v současné době čítá přibližně 1000 EUR. Genomové sekvenování umožňuje odhalit kauzální varianty v intronových a intergenových oblastech, poskytuje více uniformní pokrytí a zvyšuje citlivost pro detekci malých strukturních variant (Gilissen *et al.*, 2014; Bahlo *et al.*, 2018).

Efektivitu genomového sekvenování významně zvyšuje jeho kombinace s **RNA sekvenováním**, tedy sekvenováním aktivního transkriptomu jedince. Porovnání aberantních forem transkriptů s identifikovanými lézemi genomového sekvenování výrazně zúží volbu kandidátních variant (Aneichyk *et al.*, 2018).

Významnou **limitací NGS metod je sekvenování fragmentované DNA knihovny**, kdy se délka jednotlivých fragmentů pohybuje kolem 150-300 bp (Ashley, 2016). Tento nedostatek NGS metod inspiroval vývoj dalších sekvenačních technologií, které nejsou založeny na přípravě fragmentované DNA knihovny. Rozšiřují tak spektrum detekovatelných variant a zároveň zvyšují přesnost a tím mohou snižovat dobu stanovení diagnózy vzácných nemocí.

Také strukturní varianty, repetitivní elementy a GC bohaté oblasti nebo sekvence s vysoce homologními elementy v genomu jsou obtížně charakterizovatelné prostřednictvím NGS (Treangen & Salzberg, 2011).

S tímto ohledem byly vyvinuty tzv. **sekvenátory s dlouhým čtením** (Mantere *et al.*, 2019), které jsou schopny sekvenovat jednotlivé molekuly DNA bez fragmentování DNA na krátké úseky. Jsou nazývány sekvenátory třetí generace (TGS). Patří mezi ně sekvenátory PacBio společnosti Pacific Biosciences (English *et al.*, 2012) nebo MinION Oxford Nanopore (Jain *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2021).

TGS dovolí detekovat až desítky kb v jednom kontinuálním čtení s nízkou mapovací chybovostí a umožní tak detekci rozsáhlých strukturních variant (Miao *et al.*, 2018; Sone *et al.*, 2019).

3.1. Exomové sekvenování

Prvním krokem exomového sekvenování je **příprava DNA knihovny**. DNA je fragmentována sonikací nebo enzymatickým štěpením na fragmenty o délce 150-300 bp. Po přečištění jsou na konce fragmentů ligovány adaptory. DNA knihovna je následně **amplifikována pomocí PCR** s použitím primerů komplementárních k adaptorům.

Následuje hybridizace DNA knihovny s oligonukleotidovými sondami specifickými pro exony. V této práci byly použity sekvenační platformy SOLiD a Illumina. V případě Illumina technologií jsou fragmenty DNA následně ligovány prostřednictvím adaptorů na pevný povrch. V případě systému SOLiD se fragmenty ligují na kuličky, na kterých probíhá amplifikace pomocí PCR. U platformy Illumina probíhá tzv. můstková amplifikace, v případě SOLiD tzv. emulzní PCR. U platformy Illumina probíhá sekvenace syntézou pomocí fluorescenčně značených reverzibilních terminátorů, u platformy SOLiD probíhá sekvenační reakce na základě ligace fluorescenčně značených oligonukleotidových sond (Mardis, 2008).

3.2. Sekvenování s dlouhým čtením v reálném čase Pacific Biosciences

V této práci byl použit sekvenátor s dlouhým čtením PacBio společnosti Pacific Biosciences, který využívá technologii sekvenování v reálném čase SMRT (single-molecule real-time sequencing) (Eid *et al.*, 2009). Ve zkratce, nejprve je připravena sekvenační knihovna ligováním vlásečkových adaptorů na oba konce dvouvláknové DNA molekuly. Vzniká tak uzavřená cirkulární DNA („SMRT bell“ struktura). Knihovna je následně nanesena do reakční cely, kde se nachází miniaturní jamky, ve kterých je imobilizována polymeráza. Zde je

kombinován SMRT bell adaptor s komplementárním primerem pro iniciaci replikace. Sekvenování probíhá syntézou na bázi inkorporace fluorescenčně značených nukleotidů, které jsou detekovány v reálném čase. Výhodou je získání cirkulární konsenzus sekvence (CCS), která díky cyklickému sekvenování zvyšuje přesnost čtení (Su *et al.*, 2021).

4. Výsledky a komentář k vybraným publikovaným pracem

4.1. Studium genetické a molekulární příčiny ANCL

4.1.1. Využití exomového sekvenování k identifikaci genetické příčiny ANCL ve spolupráci s mezinárodním konzorciem zvaným The adult NCL gene discovery consortium.

ANCL jsou dědičné degenerativní nemoci mozku. Jsou nejvzácnějšími a nejméně prostudovanými formami neuronálních ceroidních lipofuscinózu (NCL). V genetické NCL databázi zvané „**NCL Resource - A gateway for Batten disease**“ (Emili Gardner, 2021) spravované vědeckou skupinou vedenou Sarou Mole z University College London je aktuálně evidováno přes **50 familiárních a sporadických případů ANCL** z celého světa s definovanou genetickou příčinou.

ANCL pacienti mohou mimikovat řadu dalších neurodegenerativních nemocí. Jejich klinická heterogenita ztěžuje jejich včasnou diagnostiku. Vodítkem pro podezření pro ANCL diagnózu je neuropatologický nález střádání lipopigmentu zvaného **ceroid s jeho charakteristickou autofluorescencí a ultrastrukturou v neuronech**. Finální průkaz pro potvrzení ANCL diagnózy poskytuje genetická analýza a identifikování kauzální varianty v postiženém genu.

Geneticky jsou ANCL heterogenní. Bylo popsáno 6 genů, které ANCL podmiňují. Výhradně adultní formy jsou způsobeny homozygotními nebo složenými heterozygotními variantami v genu **GRN** (CLN11 (Smith *et al.*, 2012)) a **CTSF** (CLN13 (Bras *et al.*, 2016)) s autozomálně recesivní dědičností. Autozomálně dominantní je ANCL forma způsobená variantami v genu **DNAJC5** (CLN4 (Noskova *et al.*, 2011)).

Autozomálně recesivní formy ANCL byly dále asociovány s geny **PPT** (CLN1 (van Diggelen *et al.*, 2001)), **CLN5** (Mancini *et al.*, 2015), **CLN6** (Sharp *et al.*, 1997; Arsov *et al.*, 2011). Zde se ukazuje alelická heterogenita, jelikož poslední zmiňované geny jsou rovněž kauzální pro dětské formy NCL.

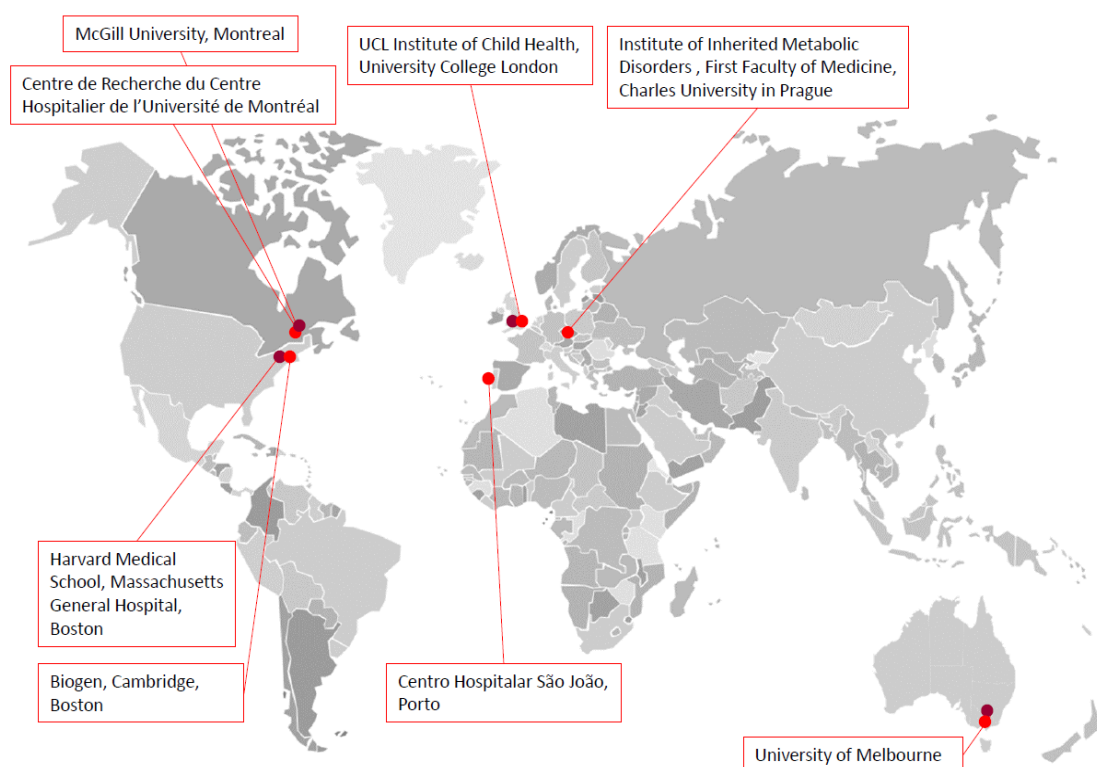
Zajímavé je, že zatímco homozygotní varianty v genu **GRN** vedou k rozvoji ANCL, tytéž heterozygotní varianty v **GRN** jsou příčinou frontotemporální demence (Gijssels *et al.*, 2008).

ANCL jsou klinicky děleny na dvě formy (Berkovic *et al.*, 2016):

Kufsova nemoc typ A, pacienti se manifestují myoklonickou epilepsií. Typ A se vyskytuje s autosomálně recesivní i dominantní dědičností. Autosomálně recesivní forma je podmíněna variantami v genu *CLN6*, dominantní forma variantami v genu *DNAJC5* (CLN4).

Kufsova nemoc typ B, pacienti se prezentují demencí a motorickými příznaky. Typ B je recesivní formou a je podmíněn variantami v genu *CTSF*.

ANCL se projevuje nejčastěji kolem 30. roku života, ale jsou známy také případy s časným nástupem v dospívání, či po 50. roku života. ANCL jsou nazývány Kufsova nemoc podle německého neuropatologa Hugo Friedricha Kufse (1871-1955), který ANCL poprvé popsal v roce 1925 (Kufs, 1925).



Obr. 1 The adult NCL gene discovery consortium. Mezinárodní konsorcium pro ANCL (Kufsovo konsorcium) propojuje vědecké pracovníky oboru genetiky a genomiky, klinické lékaře a neuropatology z celého světa – Velké Británie, Evropy, USA, Kanady a Austrálie.

Kufsovo konsorcium (**Obr. 1**), které vzniklo v roce 2012, bylo založeno s myšlenkou zefektivnění diagnostiky a podpoření výzkumu ANCL, naše pracoviště je součástí konzorcia. První výsledky konzorcia byly publikovány v roce 2016 (Berkovic *et al.*, 2016). Tým klinických neurologů a neuropatologů sestavil panel klinicko-patologických kritérií dle dostupné literatury pro hodnocení ANCL suspektních pacientů. S pomocí exomového

sekvenování byla odhalena alternativní diagnóza v 10 z 16 hodnocených případů. U jednoho pacienta byla potvrzena Kufsova nemoc identifikací variant v genu *CTSF*.

Práce Kufsova konzorcia se dále zaměřila na charakterizaci nových a nevyřešených ANCL suspektních pacientů. *Tato část práce je ve fázi přípravy manuskriptu a výsledky nejsou publikovány a budou představeny podrobněji.*

Pomocí exomového sekvenování s využitím sekvenačních platforem SOLiD a Illumina jsme sekvenovali exom **18 familiárních a sporadických případů (7 s autozomálně dominantní dědičností, 9 sporadických)**. Soubor celkem čítal 31 probandů. **Genetickou příčinu jsme byli schopni objasnit v 5 případech z 18 (tj. 28 %)**. U dalších dvou případů jsme nebyli schopni vyšetřit kandidátní varianty z důvodu nedostupnosti materiálu probanda a/nebo rodinných příslušníků.

Z pěti objasněných případů byly 2 vyřešeny čistě exomovým sekvenováním s přímou prioritizací kandidátních variant (kauzální varianty v genu *C19ORF12*, *TREM2*). Jeden případ byl vyřešen výpočetní analýzou expanzí tandemových repetic z exomových dat pomocí ExpansionHunter softwaru (Dolzhenko *et al.*, 2019) (expanze *ATNI*). Jeden případ byl objasněn kombinací exomu s tradičním Sangerovým sekvenováním a optimalizací přípravy PCR-sekvenovaného produktu (*DNAJC5*). A jeden případ byl objasněn specifickou amplifikací repetitivní oblasti pomocí repeat primed PCR (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011) (RP-PCR, expanze repetice *C9ORF72*).

U dvou pacientů jsme pomocí exomového sekvenování identifikovali kandidátní složené heterozygotní varianty v genu *CYP27A1*, resp. *NPCI*, ale nemohli jsme dále vyšetřit jejich fázi a tedy kauzalitu kvůli nedostupnosti materiálu.

Berkovic SF, Staropoli JF, Carpenter S, et al. (2016): **Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease)**. *Neurology*;87(6):579-84. doi: 10.1212/WNL.0000000000002943. **IF=9.91**

van den Aemele J, Jedlickova I, Pristoupilova A, et al. (2018): **Teenage-onset progressive myoclonic epilepsy due to a familial *C9orf72* repeat expansion**. *Neurology*.;90(8):e658-e663. doi: 10.1212/WNL.0000000000004999. **IF=9.91**

Jedličková I, Cadieux-Dion M, Přistoupilová A, et al. (2020): **Autosomal-dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis caused by duplication in *DNAJC5* initially missed by Sanger and whole-exome sequencing.** Eur J Hum Genet.;28(6):783-789. doi: 10.1038/s41431-019-0567-2. **IF=4.246**

4.1.2. Objasnění patomechanismu 30 bp duplikace v genu *DNAJC5*

kauzální pro AD-ANCL. Gen *DNAJC5* (NG_029805.2) je lokalizovaný na chromozomu 20 a kóduje protein „cysteine string protein α “ (**CSP α**). CSP α je chaperonový protein, který je součástí synaptických váčků a nachází se v neuronální presynaptické oblasti. Je součástí SNARE proteinového komplexu a podílí se na fúzi synaptických váčků s plasmatickou membránou, je tedy esenciální pro neurotransmisi (Tobaben *et al.*, 2001; Fernandez-Chacon *et al.*, 2004).

Varianty v genu *DNAJC5* byly identifikovány v roce 2011 na našem pracovišti (Noskova *et al.*, 2011) jako příčina autosomálně dominantní formy ANCL, NCL4 (OMIM #162350), také označovány jako typ Parry. AD-ANCL nese označení Parry podle rozsáhlé rodiny Parry, která byla popsána v 70. letech 20. století jako první rodina s AD-ANCL (Boehme *et al.*, 1971).

V rámci ANCL konsorcia jsme studovali familiární případ kanadské rodiny s autozomálně dominantní dědičností, která byla klinicky i neuropatologicky suspektní pro ANCL.

S ohledem na známý prevalentní gen jsme zvolili přístup cíleného sekvenování *DNAJC5*. Negativní nález odstartoval necílenou strategii sekvenováním exomu dvou postižených bratrů na platformě Illumina HiSeq 2000. Na základě autozomálně dominantní dědičnosti v rodině jsme sledovali anotované varianty, jejichž frekvence výskytu v heterozygotním stavu v populaci byla menší než 0,5 % na základě ExAC databáze (Karczewski *et al.*, 2020). Jelikož jsme neodhalili kauzální lézi, **snížili jsme pokrytí variant z nejméně deseti na pět čtení a odhalili jsme duplikaci 30 párů bází v genu *DNAJC5*.**

Překvapivé bylo, že tato varianta nebyla viditelná ve standardním nastavení vizualizačního programu Integrative Genomics Viewer (IGV, (Robinson *et al.*, 2011)), který umožňuje zobrazení pokrytí genomové sekvence získanými sekvenačními produkty.

Zásadní pro detekci a vizualizaci varianty bylo použití funkce „**show soft clipped bases**“, zobrazení tzv. měkkých bází, tedy sekvenačních produktů, které plně neodpovídají referenční sekvenci (Hart *et al.*, 2013). **Objevili jsme tak u obou postižených bratrů 30 bp duplikaci v exonu 4 genu *DNAJC5* chr20:g.62562252_62562281dup (hg19);**

NM_025219.2:c.370_399dup (p.(Cys124_Cys133dup)). Následně jsme modifikovali náš původní PCR protokol pro přípravu produktu pro Sangerovo sekvenování a potvrdili jsme přítomnost mutované alely také tradičním Sangerovým sekvenováním.

Tento případ demonstruje úskalí tradičních přístupů genomiky:

- i)** citlivost bioinformatické analýzy ve smyslu nastavení podmínek pro vyvolání anotovaných variant;
- ii)** poddiagnostikování obdobných varianty s citlivostí na amplifikační podmínky s následnou falešnou negativitou při běžném diagnostickém sekvenování v rutinním provozu.

Tato nová 30 bp duplikace v genu *DNAJC5* vede k duplikaci centrálního motivu CSP α , který je tvořen sekvencí „cystein string“ bohatou na aminokyselinu cystein (Cys, C). Cysteinová rezidua CSP α jsou bohatě palmitoylována a jsou zodpovědná za membránové interakce CSP α . (Gundersen *et al.*, 1996; Chamberlain & Burgoyne, 1998).

In silico analýza pomocí programu ProtScale, CSS-Palm ukázala, že duplikace tohoto motivu vede ke zvýšené hydrofobicitě proteinu a zvyšuje jeho palmitoylační potenciál. Takový protein může snáze podléhat agregování.

In vitro funkční charakterizací na úrovni tranzientního buněčného modelu CAD5 imortalizované neuronální buněčné linie jsme ukázali, že nová 30 bp duplikace vede k chybné lokalizaci mutovaného *DNAJC5* p.(Cys124_Cys133dup). Podobný efekt byl popsán u předešlých *DNAJC5* variant (Noskova *et al.*, 2011).

Ve zkratce, tranzientní buněčný model CAD5 exprimující GFP-značený mutovaný a divokou formu (wt) CSP α ukázal, že protein nesoucí duplikaci CSD vykazuje sníženou lokalizaci na plasmatické membráně a je přítomen především v cytoplasmě ve formě difúzních nebo hrubých granulárních inkluzí. Kolokalizuje s markery edoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, wt nikoliv.

Analýza buněčných lyzátů metodou Western blot s použitím chemické depalmitoylace ukázala, že protein nesoucí duplikaci je přítomen výhradně ve formě nepalmitoylované, zatímco další dva mutované proteiny jsou přítomny ve formě palmitoylované i nepalmitoylované. Všechny tři mutantní formy CSP α L115R, L116 Δ a mutant s CSD duplikací C124-C133 tvoří vysokomolekulární agregáty, divoký typ CSP α nikoliv.

Jedličková I, Cadieux-Dion M, Přistoupilová A, et al. (2020): **Autosomal-dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis caused by duplication in *DNAJC5* initially missed by Sanger and whole-exome sequencing.** Eur J Hum Genet.;28(6):783-789. doi: 10.1038/s41431-019-0567-2. **IF=4.246**

4.2. Stanovení genetické příčiny SMA fenotypu u pacientky s monoalelickou variantou *SMN1*

SMA jsou heterogenní skupinou dědičných neurodegenerativních nemocí, které jsou charakterizovány progresivní degenerací alfa motoneuronů předních rohů míšních v páteři a mozковém kmeni (Lefebvre *et al.*, 1995).

Genetické vyšetření pacientů suspektních pro SMA je založeno na stanovení počtu kopií exonu 7 a 8 genů *SMN1* a *SMN2* metodou MLPA (Arkblad *et al.*, 2006; Scarciolla *et al.*, 2006). Tato metoda je zacílena na nejčastější variantu klasických proximálních forem SMA, kterou je homozygotní delece exonu 7 a/nebo 8 genu *SMN1* na chromozomu 5 (5q-SMA). V případě negativního výsledku je dále prováděno Sangerovo sekvenování všech exonů genu *SMN1* pro hledání jiné kauzální genetické varianty. 2%-5% 5q-SMA pacientů jsou složení heterozygoti pro intragenovou variantu *SMN1* a klasickou delecí exonu 7(8) *SMN1*. (Wirth *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 1998).

Počet kopií *SMN2* je stanovován s ohledem na jeho kompenzační funkci v případě bialelického defektu *SMN1*. Kopie *SMN2* mohou dosahovat počtu 0-6 a jejich vyšší počet v mnoha případech vede k mírnějšímu fenotypu (Calucho *et al.*, 2018).

V literatuře jsou reportovány vzácné případy **asymptomatických homozygotů pro *SMN1* delecí**, kteří měli 5 kopií *SMN2*. Takové případy demonstrují, že 5 kopií *SMN2* patrně může kompenzovat kompletní deficit *SMN1* (Prior *et al.*, 2004).

Jako modifikátor SMA fenotypu byla identifikována jednonukleotidová záměna v exonu 7 genu *SMN2*, která vede ke zvýšené expresi plnodélkového *SMN2* transkriptu a mírnějšímu fenotypu (Prior *et al.*, 2009). Dále byly reportovány vzácné případy mužů s homozygotní delecí *SMN1*, kteří byli asymptomatictí. U nich byla detekována zvýšená exprese plastinu 3 (PLS3), který je lokalizován na chromozomu X. Jelikož PLS3 hraje roli v axonogenezi, existuje hypotéza, že může být protektivním modifikátorem SMA (Oprea *et al.*, 2008).

S ohledem na homologní oblast bohatou na retrotransposibilní *Alu* elementy, ve které se *SMN1* gen nachází, může být genetická analýza SMA pacientů poměrně komplikovaná.

Část populace nese dvě kopie *SMN1* na jednom chromozomu a delecí *SMN1* na druhém chromozomu, tato konfigurace je označována jako '2+0' (Verhaart *et al.*, 2017).

Problematicke SMA jsme se začali věnovat prostřednictvím slovenského pracoviště v Košicích, kdy nás kontaktoval klinický genetik s prosbou o konzultaci a spolupráci na geneticky nejasném případě slovenské pacientky s SMA.

Pacientka se prezentovala SMA fenotypem a MLPA analýza u ní stanovila pouze jednu kopii exonu 7 genu *SMN1*, tedy heterozygotní delecí *SMN1*. Jelikož SMA je autozomálně recesivní onemocnění, heterozygotní delece nevysvětlovala fenotyp pacientky. U pacientky byla provedena řada dalších genetických vyšetření s negativním výsledkem (Jedlickova *et al.*, 2020).

S ohledem na vysoce suspektní SMA fenotyp jsme se zaměřili na cílené a komplexní vyšetření *SMN1* genu.

Kombinací analýzy cDNA, kvantitativního PCR (qPCR), rozsáhlého „long-range“ sekvenování a *Alu*-zprostředkovaného PCR *SMN1* a *SMN2* jsme odhalili intragenovou delecí *SMN1* exonů 2a-5 iniciovanou *Alu* elementy.

Pacientka byla tedy složeným heterozygotem pro klasickou delecí exonu 7 zděděnou od matky a unikátní delecí zprostředkovanou *Alu* elementy zděděnou od otce. Kauzalitu *SMN1* jsme podpořili **detekcí zásadně sníženého množství SMN proteinu u pacientky metodou Western blot z leukocytů periferní krve.**

Objasněním genetické příčiny jsme tak umožnili rodině alespoň nepřímou preimplantační diagnostiku prostřednictvím vyloučení delece exonu 7 *SMN1* zděděné od matky.

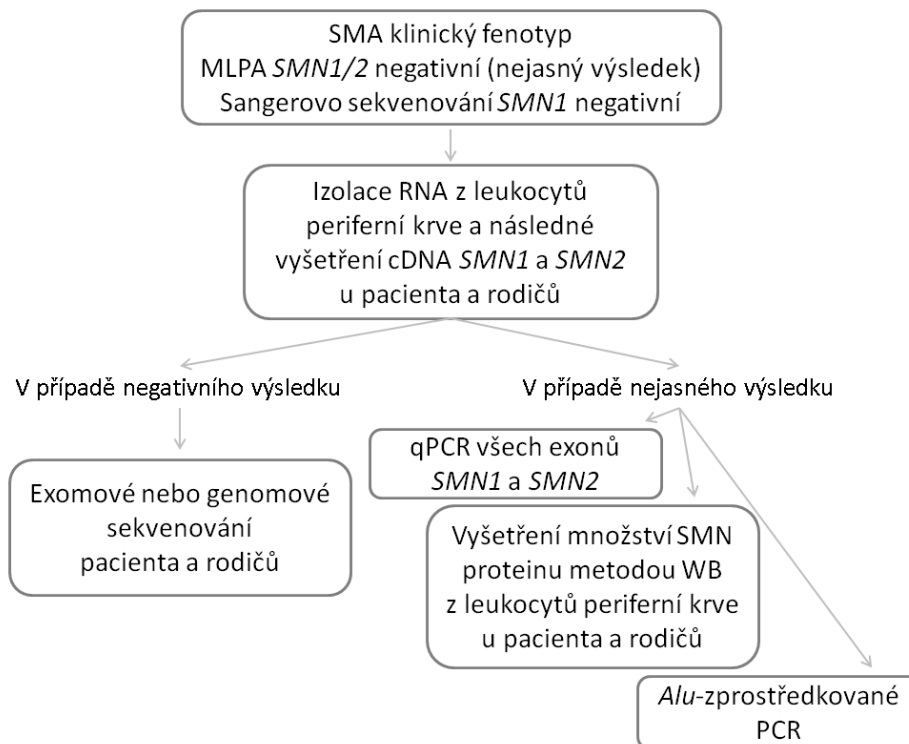
Jelikož je vyšetření homozygotní delece exonu 7 *SMN1* metodou qPCR používáno při novorozeneckém screeningu (NS) SMA, lze očekávat, že pacienti, jako je výše popsaná pacientka, nebudou zachyceni. V takovém případě musíme být připraveni v okamžiku nástupu fenotypu SMA co nejrychleji definovat *SMN1* genetické léze pro včasné zahájení dostupné terapie. Podání terapie je podmíněno identifikací bialelického defektu *SMN1*.

Výsledky NS v Německu (Vill *et al.*, 2021) po dvou letech jeho pilotního programu uvádějí 100 % záchyt SMA pacientů, kterých se podařilo odhalit 40. Výsledky včasného zahájení ASO terapie Nusinersen (Zolgensma v té době nebyla dostupná) jsou ohromující. **Pacienti, u kterých byla léčba zahájena před propuknutím nemoci, nevykazují žádné symptomy**

SMA. U zcela časných forem s nástupem fenotypu hned po narození je dosažení milníků vývoje částečně opožděno, ale žádný z pacientů není odkázán na umělou plicní ventilaci. Podávání terapie u pacientů se 4 a více kopiemi *SMN2* je předmětem debaty, jelikož tito pacienti nemusí SMA vůbec vyvinout. Na druhou stranu výsledky NS v Německu ukazují, že až u 45 % pacientů nesoucích především 4 a více kopií *SMN2* byl počet *SMN2* kopií stanoven nesprávně.

S ohledem na výše diskutovaný případ slovenské pacientky s SMA doporučujeme následující postup molekulárně genetického testování.

U pacientů, kteří jsou klinicky suspektní pro SMA a nebyly u nich detekovány 2 mutované *SMN1* alely rutinní DNA diagnostikou (MLPA, Sangerovo sekvenování *SMN1*), doporučujeme vyšetřit kvalitu cDNA *SMN1* a *SMN2* pacienta a rodičů. **V případě negativního nálezu musí být pacient a rodiče indikováni pro exomové nebo genomové sekvenování.** V případě nejasného nálezu cDNA *SMN1* a *SMN2* (detekce změny kvality transkriptu) doporučujeme vyšetřit počet kopií všech exonů *SMN1/2* pomocí qPCR, množství SMN proteinu metodou WB a případně mapovat genetickou lézi pomocí *Alu*-PCR (Majer & Sikora, 2021) (**Obr. 2**).



Obr. 2 Schéma navrženého postupu pro molekulárně genetickou analýzu u *SMN1* negativních pacientů s SMA. Vždy je nezbytné v případě dostupnosti provádět veškeré genetické testování na triu pacient a rodiče pro zvýšení přesnosti analýz a sledování dědičnosti mutovaných alel v rodině.

Jedličková I, Přistoupilová A, Nosková L, et al. (2020): **Spinal muscular atrophy caused by a novel *Alu*-mediated deletion of exons 2a-5 in *SMN1* undetectable with routine genetic testing.** *Mol Genet Genomic Med.*;8(7):e1238.

doi: 10.1002/mgg3.1238. IF=3.09

4.3. Využití DNA-sekvenační technologie s dlouhým čtením Pacific Biosciences pro vyšetření přítomnosti expanze *NOTCH2NLC* u pacienta s infantilní formou NIID.

Infantilní forma NIID (iNIID) je raritní neuropatologickou diagnózou. Doposud bylo celosvětově v odborné literatuře popsáno pouze 8 pacientů s iNIID (Sikora *et al.*, 2021) a všichni byli diagnostikováni neuropatologicky *post mortem* na základě nálezu neuronálních jaderných inkluzí v centrální nervové soustavě (CNS). **Geneticky je iNIID nedefinována a její diagnostikování během života bez znalosti genetické příčiny je v podstatě nemožné.** Pacienti nevykazují specifickou symptomatologii ani specifické biochemické změny a **vyšetření kožní biopsie je negativní.** Podstatným vodítkem může být progresivní **cerebelární atrofie viditelná na MRI vyšetření, která se projevuje cerebelární ataxií.**

Zabývali jsme se případem pacienta, který se prezentoval od věku dvou let regresí psychomotorického vývoje, a vygradoval do vegetativního stavu a úmrtí ve věku 7 let v důsledku respirační infekce. **U pacienta jsme stanovili *post mortem* neuropatologickou diagnózu iNIID** (Sikora *et al.*, 2021).

S ohledem na neznámou genetickou příčinu této klinické jednotky bylo provedeno **genomové sekvenování** pacienta na platformě Illumina NovaSeq, materiál rodičů nebyl dostupný.

Analýza genomových dat u solitérního případu, které se v současné době věnujeme, je komplikovaná s ohledem na enormně vysoké množství variant neznámého významu. Naše snahy kontaktovat autory historických publikací o iNIID pacientech a vytvořit kohortu iNIID prozatím nebyly úspěšné.

V roce 2019 byly publikovány práce, které identifikovaly expanzi GGC repetice v *NOTCH2NLC* jako genetickou příčinu asijské formy adultní NIID (aNIID). Autoři použili genomového sekvenování s dlouhým čtením v kombinaci s vazebnou analýzou (Ishiura *et al.*, 2019; Sone *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019).

S tímto ohledem jsme navrhli metodu pro vyšetření *NOTCH2NLC* expanze u iNIID pacienta na našem pracovišti. Zaměřili jsme se na specifickou amplifikaci *NOTCH2NLC* genu, který se nachází na chromozomu 1 spolu s dalšími vysoce homologními geny *NOTCH2NLA*, *NOTCH2NLB*, *NOTCH2NLR*, *NOTCH2*.

Použili jsme technologii sekvenování s dlouhým čtením Pacific Biosciences. Tento přístup nám umožnil elegantně vyšetřit přítomnost a stanovit přesnou délku repetice bez nutnosti použití repeat primed PCR metody, která se obvykle k vyšetření expanzí TR používá (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011).

Přítomnost expanze *NOTCH2NLC* jsme tímto přístupem vyloučili a demonstrujeme tak genetickou heterogenitu NIID.

Jedlickova I, Pristoupilova A, Hulkova H, et al. (2020): ***NOTCH2NLC* CGG Repeats Are Not Expanded and Skin Biopsy Was Negative in an Infantile Patient With Neuronal Intranuclear Inclusion Disease.** J Neuropathol Exp Neurol.;79(10):1065-1071. doi: 10.1093/jnen/nlaa070. IF= 2.923

Sikora J, Jedlickova I, Pristoupilova A, et al. (2021): **Genetic heterogeneity of neuronal intranuclear inclusion disease: What about the infantile variant?** Ann Clin Transl Neurol.;8(4):994-1001. doi: 10.1002/acn3.51332. IF=3.66

5. Diskuse a závěr

Tato práce vedla ke genetické a molekulární charakterizaci řady pacientů s neurodegenerativním fenotypem. Přispěla k rozšíření alelického spektra klinických jednotek AD-ANCL a 5q-SMA. V rámci této práce byly navrženy metodické postupy pro molekulárně genetické testování *SMN1* negativních pacientů s SMA a pro vyšetření expanze TR pomocí sekvenační technologie s dlouhým čtením u NIID.

Systematická klinická, neuropatologická a genetická charakterizace ANCL pacientů v rámci Kufsova konzorcia vedla k odhalení řady alternativních diagnóz. **Pomocí exomového sekvenování a dalších molekulárně genetických technik jsme byli schopni definovat genetickou příčinu ve 28 % ANCL případů (FTD/*C9ORF72*, DRPLA/*ATN1*, NBIA/*C19ORF12*, *TREM2*, AD-ANCL/*DNAJC5*).** Naše výsledky demonstrují klinickou a genetickou heterogenitu adultních forem neurodegenerací obecně a ukazují, že **identifikace genetické příčiny je klíčové pro stanovení správné diagnózy.**

Pacienti, kteří v našem souboru nebyli geneticky definováni, mohou být nositeli kauzálních variant, které exomové sekvenování nepokrývá. Jmenujme **hluboké intronové varianty, rozsáhlé strukturních varianty nebo zcela nové expanze TR** (Burdick *et al.*, 2020). Tito pacienti mohou být dále indikováni ke genomovému sekvenování. Genomové sekvenování s dlouhým čtením bylo recentně úspěšně aplikováno pro studium genetické příčiny řady neurodegenerací s expanzemi TR (Su *et al.*, 2021).

Tato práce dále vedla k **identifikaci nové unikátní duplikace v genu *DNAJC5***. Funkční studie na úrovni tranzientního buněčného modelu demonstrovaly kauzalitu varianty pro **chybnou intracelulární lokalizaci a sníženou palmitoylaci mutovaného CSP α a pro tvorbu vysokomolekulárních agregátů CSP α** . Nasari *et al.* ukázal v recentní studii, že cysteinová doména (ve které se nachází také námi identifikovaná duplikace) u mutovaných forem CSP α , ztrácí schopnost palmitoylace a vede k oligomerizaci CSP α . Ta je překvapivě zprostředkována vazbou Fe-S klastrů (Nasari *et al.*, 2020). Mutovaný CSP α interaguje s divokým typem CSP α a ztrácí svou funkci jako chaperon pro formování SNARE komplexu v presynaptické oblasti. Nasari demonstroval, že patologická oligomerizace mutovaného proteinu CSP α a defekt SNARE komplexu mohou být na úrovni buněčných modelů zmírněny aplikací chelátorů železa.

Tato dizertační práce dále přispěla k **rozšíření fenotypového spektra *C9ORF72* expanze kauzální pro ALS/FTD**. Expanzi jsme identifikovali u pacientky prezentující se progresivní myoklonickou epilepsií (PME) s rapidně postupující neurodegenerací a komplexním neuropsychiatrickým fenotypem v rodině. Naše práce je prvním reportem asociace fenotypu PME a genetické léze expanze TR *C9ORF72*.

V rámci problematiky SMA jsme se věnovali genetické charakterizaci pacientky s monoalelickou mutací *SMN1*. Tento případ zásadním způsobem demonstruje význam individualizované molekulárně genetické analýzy u pacientů se vzácnými nemocemi.

U pacientky jsme identifikovali **unikátní delecí exonů 2a-5 *SMN1* zprostředkovanou *Alu* elementy**. Doposud byly *Alu* zprostředkované delecce *SMN1* popsány jen ve dvou případech. Jednalo se o delecii v rozsahu intronů 4 až 6 (Wirth *et al.*, 1999) a homozygotní delecii exonů 1 až 6 *SMN1* (Thauvin-Robinet *et al.*, 2012). Varianty se nachází mimo oblast testovanou rutinní DNA diagnostikou a NS SMA. Takoví pacienti tedy nebudou zachyceni. V případě

nástupu symptomů bude zásadní včasná aplikace dnes již dostupné léčby, která je podmíněna identifikací defektu obou alel *SMN1*. Na základě naší zkušenosti jsme vytvořili **metodický postup pro efektivní molekulárně genetickou analýzu geneticky neobjasněných SMA případů**.

Pro vyšetření recentně publikované expanze TR v genu *NOTCH2NLC* u pacienta s iNIID jsme se rozhodli použít sekvenování s dlouhým čtením Pacific Biosciences. Výhodou této metody je možnost stanovení přesného počtu expandovaných repetit a jejich architektury i u rozsáhlých expandovaných alel a v GC bohatých oblastech (Rhoads & Au, 2015). Vyloučením expanze u iNIID pacienta **jsme podpořili genetickou heterogenitu NIID** a dále jsme tematicky rozšířili **aplikaci elegantního postupu pro vyšetření expanze TR na našem pracovišti**.

6. Použitá literatura

- Ambler, Z. (2011) Degenerativní choroby. In Houdek, L. (ed) *Základy neurologie*. Galén, pp. 233.
- Aneichyk, T., Hendriks, W.T., Yadav, R., Shin, D., Gao, D., Vaine, C.A., Collins, R.L., Domingo, A., Currall, B., Stortchevoi, A., Multhaupt-Buell, T., Penney, E.B., Cruz, L., Dhakal, J., Brand, H., Hanscom, C., Antolik, C., Dy, M., Ragavendran, A., Underwood, J., Cantsilieris, S., Munson, K.M., Eichler, E.E., Acuna, P., Go, C., Jamora, R.D.G., Rosales, R.L., Church, D.M., Williams, S.R., Garcia, S., Klein, C., Muller, U., Wilhelmsen, K.C., Timmers, H.T.M., Sapir, Y., Wainger, B.J., Henderson, D., Ito, N., Weisenfeld, N., Jaffe, D., Sharma, N., Breakefield, X.O., Ozelius, L.J., Bragg, D.C. & Talkowski, M.E. (2018) Dissecting the Causal Mechanism of X-Linked Dystonia-Parkinsonism by Integrating Genome and Transcriptome Assembly. *Cell*, **172**, 897-909 e821.
- Arkblad, E.L., Darin, N., Berg, K., Kimber, E., Brandberg, G., Lindberg, C., Holmberg, E., Tulinius, M. & Nordling, M. (2006) Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*, **16**, 830-838.
- Arsov, T., Smith, K.R., Damiano, J., Franceschetti, S., Canafoglia, L., Bromhead, C.J., Andermann, E., Vears, D.F., Cossette, P., Rajagopalan, S., McDougall, A., Sofia, V., Farrell, M., Aguglia, U., Zini, A., Meletti, S., Morbin, M., Mullen, S., Andermann, F., Mole, S.E., Bahlo, M. & Berkovic, S.F. (2011) Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in *CLN6*. *Am J Hum Genet*, **88**, 566-573.
- Ashley, E.A. (2016) Towards precision medicine. *Nat Rev Genet*, **17**, 507-522.
- Bahlo, M., Bennett, M.F., Degorski, P., Tankard, R.M., Delatycki, M.B. & Lockhart, P.J. (2018) Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. *F1000Res*, **7**.
- Berkovic, S.F., Staropoli, J.F., Carpenter, S., Oliver, K.L., Kmoch, S., Anderson, G.W., Damiano, J.A., Hildebrand, M.S., Sims, K.B., Cotman, S.L., Bahlo, M., Smith, K.R., Cadieux-Dion, M., Cossette, P., Jedlickova, I., Pristoupilova, A., Mole, S.E. &

- Consortium, A.G.D. (2016) Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease). *Neurology*, **87**, 579-584.
- Boehme, D.H., Cottrell, J.C., Leonberg, S.C. & Zeman, W. (1971) A dominant form of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain*, **94**, 745-760.
- Bras, J., Djaldetti, R., Alves, A.M., Mead, S., Darwent, L., Lleo, A., Molinuevo, J.L., Blesa, R., Singleton, A., Hardy, J., Clarimon, J. & Guerreiro, R. (2016) Exome sequencing in a consanguineous family clinically diagnosed with early-onset Alzheimer's disease identifies a homozygous CTSF mutation. *Neurobiol Aging*, **46**, 236 e231-236.
- Burdick, K.J., Cogan, J.D., Rives, L.C., Robertson, A.K., Koziura, M.E., Brokamp, E., Duncan, L., Hannig, V., Pfothner, J., Vanzo, R., Paul, M.S., Bican, A., Morgan, T., Duis, J., Newman, J.H., Hamid, R., Phillips, J.A., 3rd & Undiagnosed Diseases, N. (2020) Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A*, **182**, 1400-1406.
- Calucho, M., Bernal, S., Alias, L., March, F., Vencesla, A., Rodriguez-Alvarez, F.J., Aller, E., Fernandez, R.M., Borrego, S., Milian, J.M., Hernandez-Chico, C., Cusco, I., Fuentes-Prior, P. & Tizzano, E.F. (2018) Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscular Disord*, **28**, 208-215.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.Y., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R. & Rademakers, R. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, **72**, 245-256.
- Dolzhenko, E., Deshpande, V., Schlesinger, F., Krusche, P., Petrovski, R., Chen, S., Emig-Agius, D., Gross, A., Narzisi, G., Bowman, B., Scheffler, K., van Vugt, J., French, C., Sanchis-Juan, A., Ibanez, K., Tucci, A., Lajoie, B.R., Veldink, J.H., Raymond, F.L., Taft, R.J., Bentley, D.R. & Eberle, M.A. (2019) ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics*, **35**, 4754-4756.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korf, J. & Turner, S. (2009) Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, **323**, 133-138.
- Emili Gardner, S.M. (2021) NCL Resource - A gateway for Batten disease.
- English, A.C., Richards, S., Han, Y., Wang, M., Vee, V., Qu, J., Qin, X., Muzny, D.M., Reid, J.G., Worley, K.C. & Gibbs, R.A. (2012) Mind the gap: upgrading genomes with Pacific Biosciences RS long-read sequencing technology. *PLoS One*, **7**, e47768.
- Fernandez-Chacon, R., Wolfel, M., Nishimune, H., Tabares, L., Schmitz, F., Castellano-Munoz, M., Rosenmund, C., Montesinos, M.L., Sanes, J.R., Schneggenburger, R. & Sudhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron*, **42**, 237-251.

- Gijselinck, I., Van Broeckhoven, C. & Cruts, M. (2008) Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Hum Mutat*, **29**, 1373-1386.
- Gilissen, C., Hehir-Kwa, J.Y., Thung, D.T., van de Vorst, M., van Bon, B.W., Willemsen, M.H., Kwint, M., Janssen, I.M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Tearle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H.G., de Vries, B.B., Kleefstra, T., Brunner, H.G., Vissers, L.E. & Veltman, J.A. (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, **511**, 344-347.
- Goldmann, J.M., Veltman, J.A. & Gilissen, C. (2019) De Novo Mutations Reflect Development and Aging of the Human Germline. *Trends Genet*, **35**, 828-839.
- Gundersen, C.B., Umbach, J.A. & Mastrogiacomo, A. (1996) Cysteine-string proteins: a cycle of acylation and deacylation? *Life Sci*, **58**, 2037-2040.
- Hart, S.N., Sarangi, V., Moore, R., Baheti, S., Bhavsar, J.D., Couch, F.J. & Kocher, J.P. (2013) SoftSearch: integration of multiple sequence features to identify breakpoints of structural variations. *PLoS One*, **8**, e83356.
- Chamberlain, L.H. & Burgoyne, R.D. (1998) The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting. *Biochem J*, **335**, 205-209.
- Choi, M., Scholl, U.I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I.R., Zumbo, P., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Sanjad, S., Nelson-Williams, C., Farhi, A., Mane, S. & Lifton, R.P. (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 19096-19101.
- Ishiura, H., Shibata, S., Yoshimura, J., Suzuki, Y., Qu, W., Doi, K., Almansour, M.A., Kikuchi, J.K., Taira, M., Mitsui, J., Takahashi, Y., Ichikawa, Y., Mano, T., Iwata, A., Harigaya, Y., Matsukawa, M.K., Matsukawa, T., Tanaka, M., Shirota, Y., Ohtomo, R., Kowa, H., Date, H., Mitsue, A., Hatsuta, H., Morimoto, S., Murayama, S., Shiio, Y., Saito, Y., Mitsutake, A., Kawai, M., Sasaki, T., Sugiyama, Y., Hamada, M., Ohtomo, G., Terao, Y., Nakazato, Y., Takeda, A., Sakiyama, Y., Umeda-Kameyama, Y., Shinmi, J., Ogata, K., Kohno, Y., Lim, S.Y., Tan, A.H., Shimizu, J., Goto, J., Nishino, I., Toda, T., Morishita, S. & Tsuji, S. (2019) Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet*, **51**, 1222-1232.
- Jain, M., Olsen, H.E., Paten, B. & Akeson, M. (2016) The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*, **17**, 239.
- Jedlickova, I., Pristoupilova, A., Noskova, L., Majer, F., Stranecky, V., Hartmannova, H., Hodanova, K., Treslova, H., Hyblova, M., Solar, P., Minarik, G., Giertlova, M. & Kmoch, S. (2020) Spinal muscular atrophy caused by a novel Alu-mediated deletion of exons 2a-5 in SMN1 undetectable with routine genetic testing. *Mol Genet Genomic Med*, **8**, e1238.
- Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G., Cummings, B.B., Alfoldi, J., Wang, Q., Collins, R.L., Laricchia, K.M., Ganna, A., Birnbaum, D.P., Gauthier, L.D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N.A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E.M., Seaby, E.G., Kosmicki, J.A., Walters, R.K., Tashman, K., Farjoun, Y., Banks, E., Poterba, T., Wang, A., Seed, C., Whiffin, N., Chong, J.X., Samocha, K.E., Pierce-Hoffman, E., Zappala, Z., O'Donnell-Luria, A.H., Minikel, E.V., Weisburd, B., Lek, M., Ware, J.S., Vittal, C., Armean, I.M., Bergelson, L., Cibulskis, K., Connolly, K.M., Covarrubias, M., Donnelly, S., Ferriera, S., Gabriel, S., Gentry, J., Gupta, N., Jeandet, T., Kaplan, D., Llanwarne, C., Munshi, R., Novod, S., Petrillo, N., Roazen, D., Ruano-Rubio, V., Saltzman, A., Schleicher, M., Soto, J., Tibbetts, K., Tolonen, C., Wade, G., Talkowski, M.E., Genome Aggregation Database, C., Neale, B.M., Daly, M.J. &

- MacArthur, D.G. (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, **581**, 434-443.
- Kufs, H.F. (1925) Über eine Spätform der amaurotischen Idiotie und ihre heredofamiliären Grundlagen. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.*, 169–188.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. & et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155-165.
- Majer, F. & Sikora, J. (2021) Easy and fast PCR-based protocol allows characterization of breakpoints resulting from Alu/Alu-mediated genomic rearrangements. *Mol Genet Genomic Med*, e1830.
- Mancini, C., Nassani, S., Guo, Y., Chen, Y., Giorgio, E., Brussino, A., Di Gregorio, E., Cavalieri, S., Lo Buono, N., Funaro, A., Pizio, N.R., Nmezi, B., Kytala, A., Santorelli, F.M., Padiath, Q.S., Hakonarson, H., Zhang, H. & Brusco, A. (2015) Adult-onset autosomal recessive ataxia associated with neuronal ceroid lipofuscinosis type 5 gene (CLN5) mutations. *J Neurol*, **262**, 173-178.
- Mantere, T., Kersten, S. & Hoischen, A. (2019) Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet*, **10**, 426.
- Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **9**, 387-402.
- Miao, H., Zhou, J., Yang, Q., Liang, F., Wang, D., Ma, N., Gao, B., Du, J., Lin, G., Wang, K. & Zhang, Q. (2018) Long-read sequencing identified a causal structural variant in an exome-negative case and enabled preimplantation genetic diagnosis. *Hereditas*, **155**, 32.
- Moliner, A.M. & Waligora, J. (2017) The European Union Policy in the Field of Rare Diseases. *Adv Exp Med Biol*, **1031**, 561-587.
- Naseri, N.N., Ergel, B., Kharel, P., Na, Y., Huang, Q., Huang, R., Dolzhanskaya, N., Burre, J., Velinov, M.T. & Sharma, M. (2020) Aggregation of mutant cysteine string protein-alpha via Fe-S cluster binding is mitigated by iron chelators. *Nat Struct Mol Biol*, **27**, 192-201.
- Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A., Shendure, J. & Bamshad, M.J. (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*, **42**, 30-35.
- Ng, S.B., Turner, E.H., Robertson, P.D., Flygare, S.D., Bigham, A.W., Lee, C., Shaffer, T., Wong, M., Bhattacharjee, A., Eichler, E.E., Bamshad, M., Nickerson, D.A. & Shendure, J. (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, **461**, 272-276.
- Nguengang Wakap, S., Lambert, D.M., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y. & Rath, A. (2020) Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet*, **28**, 165-173.
- Noskova, L., Stranecky, V., Hartmannova, H., Pristoupilova, A., Baresova, V., Ivanek, R., Hulkova, H., Jahnova, H., van der Zee, J., Staropoli, J.F., Sims, K.B., Tyynela, J., Van Broeckhoven, C., Nijssen, P.C., Mole, S.E., Elleder, M. & Kmoch, S. (2011) Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet*, **89**, 241-252.
- Oprea, G.E., Kroeber, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Mueller, S., Krawczak, M., Bassell, G.J., Beattie, C.E. & Wirth, B. (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, **320**, 524-527.
- Parsons, D.W., McAndrew, P.E., Iannaccone, S.T., Mendell, J.R., Burghes, A.H. & Prior, T.W. (1998) Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a

- founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *Am J Hum Genet*, **63**, 1712-1723.
- Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, S.J., Burghes, A.H. & Kissel, J.T. (2009) A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am J Hum Genet*, **85**, 408-413.
- Prior, T.W., Swoboda, K.J., Scott, H.D. & Hejmanowski, A.Q. (2004) Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet A*, **130A**, 307-310.
- Przedborski, S., Vila, M. & Jackson-Lewis, V. (2003) Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*, **111**, 3-10.
- Rhoads, A. & Au, K.F. (2015) PacBio Sequencing and Its Applications. *Genom Proteom Bioinf*, **13**, 278-289.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G. & Mesirov, J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*, **29**, 24-26.
- Scarciolla, O., Stuppia, L., De Angelis, M.V., Murru, S., Palka, C., Giuliani, R., Pace, M., Di Muzio, A., Torrente, I., Morella, A., Grammatico, P., Giacanelli, M., Rosatelli, M.C., Uncini, A. & Dallapiccola, B. (2006) Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics*, **7**, 269-276.
- Sharp, J.D., Wheeler, R.B., Lake, B.D., Savukoski, M., Jarvela, I.E., Peltonen, L., Gardiner, R.M. & Williams, R.E. (1997) Loci for classical and a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis map to chromosomes 11p15 and 15q21-23. *Hum Mol Genet*, **6**, 591-595.
- Sikora, J., Jedlickova, I., Pristoupilova, A., Stranecky, V. & Honzik, T. (2021) Genetic heterogeneity of neuronal intranuclear inclusion disease: What about the infantile variant? *Ann Clin Transl Neur*, **8**, 994-1001.
- Smith, K.R., Damiano, J., Franceschetti, S., Carpenter, S., Canafoglia, L., Morbin, M., Rossi, G., Pareyson, D., Mole, S.E., Staropoli, J.F., Sims, K.B., Lewis, J., Lin, W.L., Dickson, D.W., Dahl, H.H., Bahlo, M. & Berkovic, S.F. (2012) Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am J Hum Genet*, **90**, 1102-1107.
- Sone, J., Mitsuhashi, S., Fujita, A., Mizuguchi, T., Hamanaka, K., Mori, K., Koike, H., Hashiguchi, A., Takashima, H., Sugiyama, H., Kohno, Y., Takiyama, Y., Maeda, K., Doi, H., Koyano, S., Takeuchi, H., Kawamoto, M., Kohara, N., Ando, T., Ieda, T., Kita, Y., Kokubun, N., Tsuboi, Y., Katoh, K., Kino, Y., Katsuno, M., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Tanaka, F., Suzuki, I.K., Frith, M.C., Matsumoto, N. & Sobue, G. (2019) Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet*, **51**, 1215-1221.
- Su, Y., Fan, L.Y., Shi, C.H., Wang, T., Zheng, H.M., Luo, H.Y., Zhang, S., Hu, Z.W., Fan, Y., Dong, Y.L., Yang, J., Mao, C.Y. & Xu, Y.M. (2021) Deciphering Neurodegenerative Diseases Using Long-Read Sequencing. *Neurology*, **97**, 423-433.
- Thauvin-Robinet, C., Drunat, S., Saugier Veber, P., Chantereau, D., Cossee, M., Cassini, C., Soichot, P., Masurel-Paulet, A., De Monleon, J.V., Sagot, P., Huet, F., Antin, M., Calmels, N., Faivre, L., Gerard, B. & reseau francais de genetique, m. (2012) Homozygous SMN1 exons 1-6 deletion: pitfalls in genetic counseling and general recommendations for spinal muscular atrophy molecular diagnosis. *Am J Med Genet A*, **158A**, 1735-1741.
- Tian, Y., Wang, J.L., Huang, W., Zeng, S., Jiao, B., Liu, Z., Chen, Z., Li, Y., Wang, Y., Min, H.X., Wang, X.J., You, Y., Zhang, R.X., Chen, X.Y., Yi, F., Zhou, Y.F., Long, H.Y., Zhou, C.J., Hou, X., Wang, J.P., Xie, B., Liang, F., Yang, Z.Y., Sun, Q.Y., Allen,

- E.G., Shafik, A.M., Kong, H.E., Guo, J.F., Yan, X.X., Hu, Z.M., Xia, K., Jiang, H., Xu, H.W., Duan, R.H., Jin, P., Tang, B.S. & Shen, L. (2019) Expansion of Human-Specific GGC Repeat in Neuronal Intranuclear Inclusion Disease-Related Disorders. *Am J Hum Genet*, **105**, 166-176.
- Tobaben, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T.C., Rettig, J. & Stahl, B. (2001) A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron*, **31**, 987-999.
- Treangen, T.J. & Salzberg, S.L. (2011) Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet*, **13**, 36-46.
- van Diggelen, O.P., Thobois, S., Tilikete, C., Zabet, M.T., Keulemans, J.L., van Bunderen, P.A., Taschner, P.E., Losekoot, M. & Voznyi, Y.V. (2001) Adult neuronal ceroid lipofuscinosis with palmitoyl-protein thioesterase deficiency: first adult-onset patients of a childhood disease. *Ann Neurol*, **50**, 269-272.
- Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Wilson, I.J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C.C., Cook, S.F. & Lochmuller, H. (2017) Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis*, **12**, 124.
- Vill, K., Schwartz, O., Blaschek, A., Glaser, D., Nennstiel, U., Wirth, B., Burggraf, S., Roschinger, W., Becker, M., Czibere, L., Durner, J., Eggermann, K., Olgemoller, B., Harms, E., Schara, U., Kolbel, H. & Muller-Felber, W. (2021) Newborn screening for spinal muscular atrophy in Germany: clinical results after 2 years. *Orphanet J Rare Dis*, **16**, 153.
- Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Wienker, T. & Zerres, K. (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*, **64**, 1340-1356.
- Wirth, B., Schmidt, T., Hahnen, E., Rudnik-Schoneborn, S., Krawczak, M., Muller-Myhsok, B., Schonling, J. & Zerres, K. (1997) De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet*, **61**, 1102-1111.

7. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Berkovic SF, Staropoli JF, Carpenter S, Oliver KL, Kmoch S, Anderson GW, Damiano JA, Hildebrand MS, Sims KB, Cotman SL, Bahlo M, Smith KR, Cadieux-Dion M, Cossette P, Jedličková I, Přistoupilová A, Mole SE; ANCL Gene Discovery Consortium (2016): **Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease)**. *Neurology*;87(6):579-84. doi: 10.1212/WNL.0000000000002943. **IF=9.91**

van den Aemele J, Jedlickova I, Přistoupilova A, Sieben A, Van Mossevelde S, Ceuterick-de Groote C, Hůlková H, Matej R, Meurs A, Van Broeckhoven C, Berkovic SF, Santens P, Kmoch S, Dermaut B (2018): **Teenage-onset progressive myoclonic epilepsy due to a familial *C9orf72* repeat expansion**. *Neurology*.;90(8):e658-e663.

doi: 10.1212/WNL.0000000000004999. **IF=9.91**

Jedličková I, Cadieux-Dion M, Přistoupilová A, Stránecký V, Hartmannová H, Hodaňová K, Barešová V, Hůlková H, Sikora J, Nosková L, Mušálková D, Vyleťal P, Sovová J, Cossette P, Andermann E, Andermann F, Kmoch S; Adult NCL Gene Discovery Consortium (2020): **Autosomal-dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis caused by duplication in *DNAJC5* initially missed by Sanger and whole-exome sequencing.** Eur J Hum Genet.;28(6):783-789. doi: 10.1038/s41431-019-0567-2. **IF=4.246**

Jedličková I, Přistoupilová A, Nosková L, Majer F, Stránecký V, Hartmannová H, Hodaňová K, Trešlová H, Hýblová M, Solár P, Minárik G, Giertlová M, Kmoch S. (2020): **Spinal muscular atrophy caused by a novel *Alu*-mediated deletion of exons 2a-5 in *SMN1* undetectable with routine genetic testing.** Mol Genet Genomic Med.;8(7):e1238. doi: 10.1002/mgg3.1238. **IF=3.09**

Jedlickova I, Pristoupilova A, Hulkova H, Vrbacka A, Stranecky V, Hrubá E, Jesina P, Honzik T, Hrdlicka I, Fremuth J, Pivovarcikova K, Bitar I, Matej R, Kmoch S, Sikora J. (2020): ***NOTCH2NLC* CGG Repeats Are Not Expanded and Skin Biopsy Was Negative in an Infantile Patient With Neuronal Intranuclear Inclusion Disease.** J Neuropathol Exp Neurol.;79(10):1065-1071. doi: 10.1093/jnen/nlaa070. **IF= 2.923**

Sikora J, Jedlickova I, Pristoupilova A, Stranecky V, Honzik T. (2021): **Genetic heterogeneity of neuronal intranuclear inclusion disease: What about the infantile variant?** Ann Clin Transl Neurol.;8(4):994-1001. doi: 10.1002/acn3.51332. **IF=3.66**

8. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Živná M, Kidd K, Zaidan M, Vyleťal P, Barešová V, Hodaňová K, Sovová J, Hartmannová H, Votruba M, Trešlová H, Jedličková I, Sikora J, Hůlková H, Robins V, Hnízda A, Živný J, Papagregoriou G, Mesnard L, Beck BB, Wenzel A, Tory K, Häeffner K, Wolf MTF, Bleyer ME, Sayer JA, Ong ACM, Balogh L, Jakubowska A, Łaszkiewicz A, Clissold R, Shaw-Smith C, Munshi R, Haws RM, Izzi C, Capelli I, Santostefano M, Graziano C, Scolari F, Sussman A, Trachtman H, Decramer S, Matignon M, Grimbert P, Shoemaker LR, Stavrou C, Abdelwahed M, Belghith N, Sinclair M, Claes K, Kopel T, Moe S, Deltas C, Knebelmann B, Rampoldi L, Kmoch S, Bleyer AJ (2020): **An international cohort study of autosomal**

dominant tubulointerstitial kidney disease due to REN mutations identifies distinct clinical subtypes. *Kidney Int.*;98(6):1589-1604. doi: 10.1016/j.kint.2020.06.041. **IF= 10.612**

Veveřa J, Zarrei M, Hartmannová H, Jedličková I, Mušálková D, Přistoupilová A, Oliveriusová P, Trešlová H, Nosková L, Hodaňová K, Stránecký V, Jiříčka V, Preiss M, Příhodová K, Šaligová J, Wei J, Woodbury-Smith M, Bleyer AJ, Scherer SW, Knoch S (2019): **Rare copy number variation in extremely impulsively violent males.** *Genes Brain Behav.*;18(6):e12536. doi: 10.1111/gbb.12536. **IF= 3.449**

Hartmannová H, Piherová L, Tauchmannová K, Kidd K, Acott PD, Crocker JF, Oussedik Y, Mallet M, Hodaňová K, Stránecký V, Přistoupilová A, Barešová V, Jedličková I, Živná M, Sovová J, Hůlková H, Robins V, Vrbacký M, Pecina P, Kaplanová V, Houštěk J, Mráček T, Thibeault Y, Bleyer AJ, Knoch S (2016): **Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor NDUFAF6.** *Hum Mol Genet.*;25(18):4062-4079. doi: 10.1093/hmg/ddw245. **IF= 5.100**

Bolar NA, Golzio C, Živná M, Hayot G, Van Hemelrijk C, Schepers D, Vandeweyer G, Hoischen A, Huyghe JR, Raes A, Matthys E, Sys E, Azou M, Gubler MC, Praet M, Van Camp G, McFadden K, Padiaditakis I, Přistoupilová A, Hodaňová K, Vyleťal P, Hartmannová H, Stránecký V, Hůlková H, Barešová V, Jedličková I, Sovová J, Hnízda A, Kidd K, Bleyer AJ, Spong RS, Vande Walle J, Mortier G, Brunner H, Van Laer L, Knoch S, Katsanis N, Loeys BL (2016): **Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia.** *Am J Hum Genet.* 2016 Jul 7;99(1):174-87. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.05.028. **IF= 10.502**