

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Ing. Ivana Jedličková

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

**Genetic and molecular basis
of neurodegenerative and neuropsychiatric diseases**

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: **prof. Ing. Stanislav Kmoch, CSc.**

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26.11.2021

Ivana Jedličková

Podpis

Identifikační záznam:

Jedličková, Ivana. *Genetické a molekulární příčiny neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění. [Genetic and molecular basis of neurodegenerative and neuropsychiatric diseases]*. Praha, 2021. 63 s., 7 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, Laboratoř pro studium vzácných nemocí. Vedoucí závěrečné práce Kmoch, Stanislav.

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 zcela 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 *SMN1* nálezem a navržení metody pro vyšetření expanze tandemových repetitiv u NIID.

Klíčová slova: adultní neuronální ceroidní lipofuscinóza, spinální svalová atrofie, neuronální intranukleární inkluzní nemoc, sekvenování nové generace, *DNAJC5*

Abstract

Next-generation (NGS) and third-generation (TGS) sequencing methods have played a key role in strategies of gene identification over the past twelve years. 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. NGS and TGS, used by research laboratories, 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 *SMN1* negative SMA patients and present a method for validation of tandem repeat expansion in NIID.

Key words: adult neuronal ceroid lipofuscinosis, spinal muscular atrophy, neuronal intranuclear inclusion disease, next-generation sequencing methods, *DNAJC5*

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli panu profesoru Kmochovi za možnost prožít doktorské studium v jeho špičkovém a velice silném vědeckém týmu. Mohla jsem se tak podílet na unikátních výzkumných projektech s širokým tematickým i metodickým rozsahem, čehož si vážím. Děkuji panu profesoru Kmochovi také za umožnění účasti na kvalitních vědeckých konferencích a odborných kurzech, které mě nesmírně obohatily.

Mé velké poděkování patří také všem skvělým zkušeným kolegům z Laboratoře pro studium vzácných nemocí, kteří mě v laboratoři vše naučili a vždy se mnou měli trpělivost. Děkuji za jejich nekonečnou ochotu při konzultování laboratorních metod a postupů a také za veselou atmosféru, kterou vytváří.

Za konzultaci mé dizertační práce nebo technickou pomoc při psaní děkuji kolegům Lence Noskové, Aničce Přistoupilové, Lence Piherové a Petru Vyleťalovi.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Obor neuropsychiatrie	2
1.2. Stručná historie neurogenetiky, technologický vývoj a objevy nových genů	3
1.3. Vzácné neurodegenerativní nemoci.....	7
1.4. Molekulární mechanismy neurodegenerace	9
1.5. Neuronální ceroidní lipofuscinózy	11
1.6. Spinální svalové atrofie	15
1.7. Neuronální intranukleární inkluzní nemoc	20
2. Hypotézy a cíle dizertační práce	24
3. Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce	25
4. Výsledky a komentáře k vybraným publikovaným pracem.....	27
4.1. Studium genetické a molekulární příčiny adultních forem NCL	27
4.1.1. Využití exomového sekvenování k identifikaci genetické příčiny ANCL ve spolupráci s mezinárodním konsorciem zvaným The adult NCL gene discovery consortium.....	27
4.1.2. Objasnění patomechanismu 30 bp duplikace v genu <i>DNAJC5</i> kauzální pro AD-ANCL.....	31
4.2. Stanovení genetické příčiny SMA fenotypu u pacientky s monoalelickou variantou <i>SMN1</i>	33
4.2.1. Novorozenecký screening (NS) SMA a jeho úskalí na příkladu naší pacientky ...	35
4.3. Využití DNA-sekvenační technologie s dlouhým čtením Pacific Biosciences pro vyšetření přítomnosti expanze <i>NOTCH2NLC</i> u pacienta s infantilní formou NIID.	37
5. Souhrn výsledků.....	39
6. Diskuse, význam dosažených výsledků	40
7. Seznam publikací, které nejsou součástí disertace	42
8. Použitá literatura	43
9. Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace	61

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova nemoc
AD-ANCL	autosomálně dominantní adultní neuronální ceroidní lipofuscinóza
ALS	amyotrofická laterální skleróza
<i>Alu</i>	retrotranspozonový element nazvaný dle restrikčního místa AluI
ANCL	adultní neuronální ceroidní lipofuscinóza
ANPA	Americká neuropsychiatrická asociace (American Neuropsychiatric Association)
ASO	antisense oligonukleotidy
bp	pár bází (base pair)
CADASIL	Autozomálně dominantní cerebrální arteriopatie se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	centrální nervová soustava
CSD	cysteinová doména (cysteine string domain)
Cys, C	cystein
DMP	dědičné metabolické poruchy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
EOAD	Alzheimerova nemoc s časným nástupem (early-onset Alzheimer's disease)
EOPD	Parkinsonova nemoc s časným nástupem (early-onset Parkinson's disease)
ERT	enzymová substituční terapie (enzyme replacement therapy)
EUR	Euro
FDA	Americká léková agentura (The Food and Drug Administration)
FTD	frontotemporální demence
GFP	zelený fluorescenční protein (Green fluorescent protein)

GRODs	granulární osmiofilní depozita
hnRNP	heterogenní nukleární ribonukleoprotein
IGV	Software Integrative Genomics Viewer
ISS	intronový sestřihový zeslabovač (intronic splicing silencer)
kbp	tisíc páru bází (kilobase)
MLPA	metoda multiplex ligation-dependent probe amplification
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NCL	neuronální ceroidní lipofuscinóza
NGS	sekvenování druhé/nové generace (next-generation sequencing)
NIH	Americký Národní institut zdraví (National Institutes of Health)
NIID	neuronální intranukleární inkluzní nemoc (neuronal intranuclear inclusion disease)
OMIM	databáze Online Mendelian Inheritance in Man
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PD	Parkinsonova nemoc
pH	záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku (potential of hydrogen)
pre-mRNA	primární transkript, prekurzorová ribonukleová kyselina
qPCR	kvantitativní PCR (quantitative PCR)
RAN-translace	nekanonická translace, translace bez iniciačního AUG kodonu iniciovaná repeticemi (repeat associated non-AUG initiated translation)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíková částice (reactive oxygen species)
RURD	Laboratoř pro studium vzácných nemocí (Research Unit for Rare Diseases)
SMA	spinální svalová atrofie (spinal muscular atrophy)

SNARE	proteinový komplex (soluble NSF protein attachment proteins receptor)
snRNP	malý jaderný ribonukleoprotein (small nuclear ribonucleoprotein)
TGS	sekvenování třetí generace (third-generation sequencing)
TR	tandemová repetice
VNTR	polymorfismus v počtu tandemových repetit (variable number of tandem repeat polymorphism)

1. Úvod

Tato dizertační práce se zabývá studiem genetické a molekulární příčiny vybraných forem vzácných neurodegenerativních nemocí s využitím moderních metod sekvenování a analýzy DNA.

Teoretická část této práce stručně představí obory neuropsychiatrii a neurogenetiku, definuje vzácné neurodegenerativní nemoci a ukáže význam jejich studia. Představí vývoj DNA sekvenačních technologií na vybraných příkladech objevů genů podmiňujících neurodegenerativní nemoci. Součástí je přehled molekulárních mechanismů neurodegenerace se zacílením na klinické jednotky neuronální ceroidní lipofuscinózu (NCL), spinální svalovou atrofii (SMA) a neuronální intranukleární inkluzní nemoc (NIID).

Laboratoř pro studium vzácných nemocí („Research Unit for Rare Diseases“, RURD), kde tato práce vznikla, se dlouhodobě věnuje vývoji a aplikacím moderních metod sekvenování a analýzy DNA. Naším posláním je porozumět patomechanismu studovaných vzácných nemocí skrze odhalení jejich genetické příčiny.

Identifikování genetické příčiny je v mnoha případech klíčové pro stanovení správné diagnózy vzhledem k vysoké heterogenitě vzácných nemocí a umožňuje poskytnutí **genetického poradenství v rodinách pacientů**. Získané poznatky jsou dále použity pro **zpřesnění a urychlení diagnostiky studovaných klinických jednotek**.

Včasné odhalení genetické příčiny řady patologií bývá nezbytné pro zařazení pacienta do vhodné klinické studie nebo přímo **podmiňuje úspěšnost a samotnou aplikaci léčby**. V neposlední řadě, díky porozumění patomechanismu vzácných nemocí na molekulární úrovni může být **iniciován vývoj kauzální léčby**.

Prostřednictvím studia genetiky a genomiky vzácných nemocí stále důkladněji a v širších souvislostech **rozumíme architekturu patogenních variant lidského genomu**. Získané poznatky, dynamicky se vyvíjející technologie a metodiky používané pro výzkum vzácných nemocí mohou být dále využity pro **studium molekulární podstaty populačně častých nemocí**.

Cesta výzkumu umožňuje použití výše uvedených technologií a otevírá mnohem širší možnosti, jak se pacientům se vzácnými nemocemi věnovat. U řady pacientů je nezbytné

doplnit DNA sekvenační výsledky dalšími molekulárně biologickými metodami či funkčními studii na úrovni buněčných modelů pro potvrzení kauzality identifikovaných variant. **V mnoha případech rozvíjíme pro pacienty metodicky nové téma v závislosti na jejich patologii.**

Ve své dizertační práci demonstruji přínos moderních metod sekvenování a analýzy DNA pro správnou a včasnou diagnostiku vzácných nemocí. Ukazují význam výzkumu vzácných nemocí, jehož efektivita je založena na **individualizovaném metodickém přístupu, na úzké spolupráci vědeckých pracovníků s motivovanými klinickými lékaři a na vstřícnosti pacientů a jejich rodin.** Zaměřuji se na dětské a dospělé pacienty s vybranými formami neurodegenerací, jelikož **neurodegenerativní nemoci jsou z hlediska správné (DNA)diagnostiky mimořádnou výzvou.**

Výsledky, které jsou součástí této práce, vedly k identifikaci kauzálních variant v souboru pacientů s adultní formou NCL, vytvoření metodického postupu pro genetické testování SMA pacientů s negativním *SMNI* nálezem a navržení metody pro vyšetření expanze tandemových repetice u NIID. Zároveň tato práce ukazuje úskalí molekulárně-genetického testování a neuropatologické diagnostiky na příkladech ANCL, SMA a NIID pacientů.

1.1. Obor neuropsychiatrie

Neuropsychiatrie je obor medicíny, který studuje komplexní vztahy mezi lidským chováním a mozkovými funkcemi (Koliatsos et al. 2020). Zabývá se poruchami centrální nervové soustavy, které se manifestují **psychiatrickými** (deprese, mánie, změny kognitivních funkcí, demence, halucinace), **psychologickými** (smutek, ztráta zájmu o sebe a své okolí, pocit nedostatku energie pro vykonávání běžných každodenních činností) a **neurologickými symptomy** (záchvaty, nedobrovolná vokalizace, motorická slabost, smyslové poruchy a poruchy řeči) (Arzy and Danziger 2014).

Mezi **diagnostické kategorie neuropsychiatrie** patří neurodegenerativní nemoci, organické duševní poruchy (vaskulární, nádorové nebo zánětlivé poškození tkáně, infekce, intoxikace), deprese, úzkostné poruchy, schizofrenie, funkční poruchy hybnosti, návykové nemoci, poruchy příjmu potravy, epilepsie nebo spánek a jeho poruchy (Tereza Uhrová 2020).

V USA byla v roce 1988 založena Americká neuropsychiatrická asociace (ANPA), která sdružila americké lékaře s duální certifikací pro obory neurologie a psychiatrie (Fogel and Schiffer 1989). Na žádost ANPA v roce 2004 byla udělena akreditace novému lékařskému oboru Behaviorální neurologie a neuropsychiatrie (Behavioral Neurology and Neuropsychiatry (BNNP), který tak oficiálně propojil a zastřešil obory neurologie a psychiatrie (Coffey 1999).

V České republice je neuropsychiatrie nekodifikovaným lékařským oborem. Neurologie a psychiatrie zůstávají jako lékařské obory odděleny, jejich interdisciplinární překryv je však rozsáhlý. S tímto ohledem bylo v ČR založeno v roce 2011 **Neuropsychiatrické fórum**, jehož hlavním cílem je rozvíjet neuropsychiatrii s jejím komplexním pohledem na výzkum mozku a jeho onemocnění (Tereza Uhrová 2020).

Současný koncept neuropsychiatrie vychází z předpokladu, že psychické i neurologické poruchy vznikají v důsledku změn struktury, funkce a konektivity nervového systému (Lee et al. 2017b).

Moderní neuropsychiatrie je založena na poznatcích neurogenetiky a na využití neurozobrazovacích metod a poskytuje propojení mezi obory psychiatrie, neurologie a neuropsychologie (Lyketsos et al. 2007).

1.2. Stručná historie neurogenetiky, technologický vývoj a objevy nových genů

Neurogenetika je vědním oborem, který se zabývá studiem **genetických zákonitostí** podmiňujících **vývoj nervového systému**, jeho **biologické funkce** a **rozvoj neuropatologií** (Silva et al. 2021). O rozvoj neurogenetiky se významně zasloužil v 60. letech 20. století americký molekulární biolog **Seymour Benzer** (1921-2007), který se věnoval studiu **genetiky chování** na modelu octomilky. Benzerův výzkum poprvé v historii ukázal, že **fenotypové znaky mohou být řízeny variantami v jednotlivých genech**. V případě octomilky se jednalo o schopnost fototaxe, učení a denní biorytmus (Konopka and Benzer 1971).

Milníkem neurogenetiky se stal rok 1983, kdy byl **mapován lokus genu pro Huntingtonovu chorobu** (Gusella et al. 1983) pomocí poměrně univerzální strategie pozičního klonování a vazebné analýzy s využitím délkových polymorfismů restrikčních fragmentů (Botstein et al. 1980).

Tato strategie nevyžadovala znalost biochemické funkce a sekvence kódovaného proteinu, jako tomu bylo u funkčního klonování (Leder et al. 1978). Stala se tak vůdčím přístupem objevu nových genů pro další desetiletí.

V roce 1987 byla publikována **první genetická mapa lidského genomu** (Donis-Keller et al. 1987). Její znalost významně zjednodušila orientaci v lidském genomu, což vedlo v 90. letech k vlně objevů nových genů a identifikaci kauzálních variant, mezi kterými hrály neurodegenerace významné místo (Hsiao et al. 1989; Goate et al. 1991; Orr et al. 1993; Lefebvre et al. 1995; Levy-Lahad et al. 1995; Sherrington et al. 1995).

Výjimečnou roli sehrál Projekt lidského genomu, „Human Genome Project“ (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001), který probíhal v letech 1990-2003. Akceleroval vývoj sekvenačních a výpočetních technologií a vznik integrovaných genomových databází jako **Ensembl** (Hubbard et al. 2002) nebo **UCSC Genome browser** (Kent et al. 2002). Primárním cílem bylo osekvenovat celou jadernou DNA, tedy znát její kompletní nukleotidovou sekvenci a vytvořit kompletní fyzickou mapu lidského genomu. Projekt lidského genomu měl však celou řadu přesahů (Hood and Rowen 2013) a vytvořil tak infrastrukturu pro efektivní identifikaci nových genů a kauzálních variant.

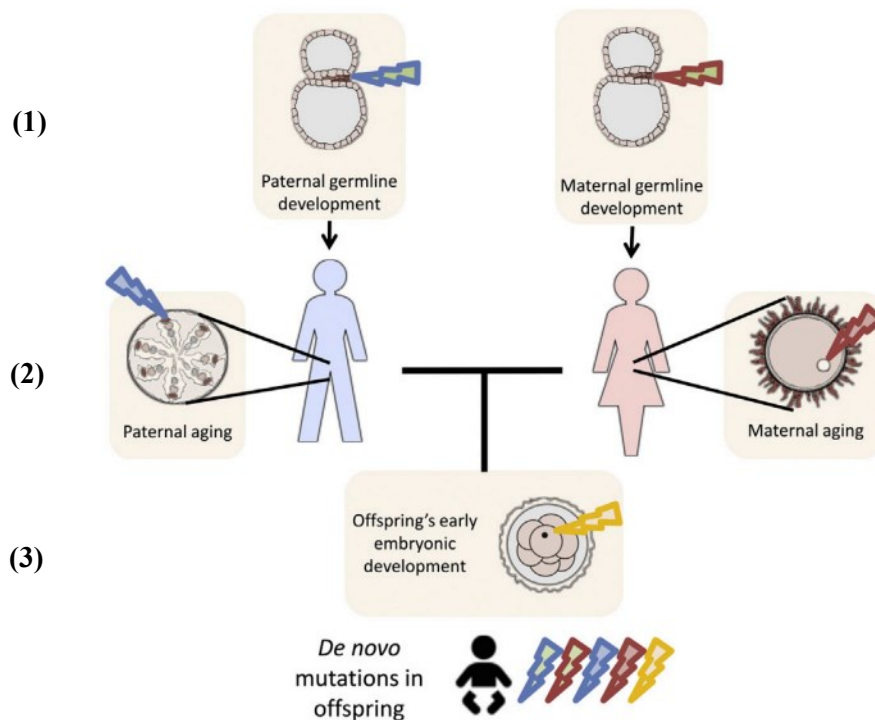
Úspěšné sekvenování lidského genomu spolu s projekty **HapMap** (International HapMap 2003) a **1000 Genomů** (Genomes Project et al. 2010) umožnilo charakterizovat genetickou variabilitu mezi jednotlivci v populaci. Metodologické pokroky, zahrnující expresní (Schena et al. 1995), genotypovací čipy (Fan et al. 2000) a vysokokapacitní sekvenování DNA, umožnily generovat rozsáhlá genetická data ve významně zredukovaném čase.

Vývoj vysokokapacitního masivně paralelního sekvenování, tzv. sekvenačních metod nové generace nebo také druhé generace (**next-generation sequencing methods, NGS**), změnil přístup ve strategii identifikace nových genů podmiňujících vzácné nemoci.

U monogenních nemocí dominovalo 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). Exomové sekvenování, v počátcích v kombinaci s vazebnou analýzou, vytvořilo účinnou strategii, která významně zredukovala počet sekvenovaných genů v kandidátních oblastech a byla cenově dostupnější (Wang et al. 2010; Johnson et al. 2010; Zimprich et al. 2011; Vilarino-Guell et al. 2011; Chartier-Harlin et al. 2011; Noskova et al. 2011; Guerreiro et al. 2012).

V posledních letech je exomové sekvenování používáno také pro hledání *de novo variant*.

De novo varianty mohou vznikat několika mechanismy na různých úrovních u rodičů a potomka (**Obr.1**). (1) Nejranější *de novo* varianty vznikají v průběhu embryonálního vývoje jednoho z rodičů v jeho zárodečných buňkách. (2) Dále se v průběhu života rodičů uplatňuje tzv. **germinální mozaicismus**, kdy vznikají *de novo* varianty stárnutím oocytů matky nebo při mitóze spermatogonií otce. (3) U potomka vznikají *de novo* varianty postzygoticky v průběhu embryogeneze (Goldmann et al. 2019). Ani jeden z rodičů potomka tedy ve své genomové DNA somatických (tělních) buněk *de novo* variantu nenesou. Sekvenováno je tzv. *trio*, tedy proband a zdraví rodiče.



Obr.1 Schematické znázornění úrovní vzniku *de novo* variant. *De novo* varianty vznikají (1) v zárodečných pohlavních buňkách u jednoho z rodičů v průběhu jejich embryogeneze, kdy všechny pohlavní buňky takového rodiče pak nesou tuto variantu. (2) Dále se uplatňuje tzv. germinální mozaicismus, kdy *de novo* varianty vznikají u otce ve spermatogoniálních buňkách při spermatogoniální mitóze vedoucí ke vzniku spermií nebo u matky v průběhu stárnutí oocytů. Při germinálním mozaicismu nesou *de novo* variantu jen takové spermatocyty a oocyt, ve kterých ke vzniku *de novo* varianty došlo. (3) *De novo* varianty mohou vzniknout také jako postzygotické změny v časně fázi embryonálního vývoje vyvíjejícího se embrya. Takové *de novo* varianty jsou přítomny jako somatické a/nebo germinální změny podle časového vývoje embrya a zárodečného listu, kdy a kde k jejich vzniku došlo. Upraveno dle Goldmann et al., 2019.

De novo varianty mohou vznikat jako jednonukleotidové záměny nebo rozsáhlé delece (>50 kbp), duplikace nebo genomická přeskupení. Vznik *de novo* variant je významným

mechanismem rozvoje neurovývojových nemocí, které mohou zahrnovat kombinaci autismu, poruch intelektu, opožděného vývoje, či epilepsii (Wilfert et al. 2017).

S ohledem na snižující se náklady na NGS sekvenování se stalo dostupnějším také sekvenování kompletního genomu, které v současné době stojí přibližně 1000 EUR za sekvenovaný genom a dále náklady za uschování sekvenačních dat.

Genomové sekvenování umožňuje odhalit kauzální varianty v intronových a intergenových oblastech, poskytuje více uniformní pokrytí a zvyšuje citlivost pro detekci malých strukturních variant (Bahlo et al. 2018; Gilissen et al. 2014). Jako jeden z prvních příkladů aplikace genomového sekvenování uvedme odhalení **složených heterozygotních variant v *SH3TC2*** u pacienta s Charcot-Marie-Toothovou nemocí (Lupski et al. 2010) nebo příklad recentně identifikované **hluboké intronové varianty v *SPG7*** (Verdura et al. 2020).

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. Příkladem je identifikace **SINE-VNTR-*Alu* exonové retrotranspozice v genu *TAF1* kauzální pro endemickou formu X-vázané dystonie-parkinsonismu** (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** a rozšiřují spektrum detekovatelných variant. **Také strukturní varianty, repetitivní elementy a GC bohaté oblasti nebo sekvence s vysoce homologními elementy** v genomu jsou obtížně charakterizovatelné prostřednictvím NGS (Treangen and Salzberg 2011).

S tímto ohledem byly vyvinuty tzv. sekvenátory s dlouhým čtením (Mantere et al. 2019), které jsou schopny sekvenovat jednotlivé molekuly DNA bez nutnosti fragmentování DNA na krátké úseky. Jsou nazývány **sekvenátory třetí generace (third-generation sequencing methods, TGS)**. Patří mezi ně sekvenátory Sequel společnosti Pacific Biosciences (English et al. 2012) nebo sekvenátory MinION, PromethION společnosti 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.

Jako příklad jejich úspěšného použití uveďme odhalení strukturní varianty 1,7 kbp delece v oblasti bohaté na *Alu* elementy v genu *G6PC* pomocí nanoporového genomového sekvenování s dlouhým čtením u pacienta s glykogenózou typu 1a. Exomové sekvenování u pacienta odhalilo pouze jednu mutovanou alelu *G6PC*. Díky odhalení obou mutovaných alel mohla být rodině nabídnuta a úspěšně provedena preimplantační diagnostika (Miao et al. 2018). Dalším příkladem aplikace sekvenování s dlouhým čtením bylo odhalení expanze repetic v nekódující oblasti genu *NOTCH2NLC* kauzální pro asijskou formu adultní neuronální intranukleární inkluzní nemoci (Ishiura et al. 2019; Sone et al. 2019; Tian et al. 2019), které bude podrobněji věnována samotná kapitola.

1.3. Vzácné neurodegenerativní nemoci

Dle evropské klasifikace je nemoc definována jako vzácná, pokud postihuje méně než jednoho člověka na 2000 obyvatel (Moliner and Waligora 2017; Nguengang Wakap et al. 2020). V roce 2020 čítala Orphanet databáze (Weinreich et al. 2008) 6172 vzácných nemocí a jejich kumulativní výskyt byl odhadován na 3.5–5.9 % populace. Dle Národního ústavu zdraví (NIH) a Orphanet je více než 70 % vzácných nemocí genetického původu a přibližně 70 % geneticky podmíněných nemocí se manifestuje v dětském věku (Nguengang Wakap et al. 2020).

Mezi vzácné neurodegenerativní nemoci můžeme řadit **specifické neurodegenerativní proteinopatie**, jako je Huntingtonova nemoc, amyotrofická laterální skleróza nebo prionové nemoci; **neurometabolické nemoci**, jako jsou lysosomální stárádové nemoci, mitochondriální nemoci nebo poruchy metabolismu aminokyselin; **nervosvalové nemoci**, jako jsou spinální svalové atrofie; a dále **primární nádory mozku a míchy** nebo **primární cerebrovaskulární nemoci** (CADASIL-Autozomálně dominantní cerebrální arteriopatie se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií).

Jejich sjednocujícím prvkem je proces neurodegenerace, který je definován jako postupující zánik struktury a funkce specifických skupin neuronů různých oblastí nervového systému. Může postihovat mozkovou kůru, bazální ganglia, mozkový kmen, mozeček, míchu, či periferní nervy. Zasažená subpopulace neuronů a anatomický region určují klinický obraz. (Przedborski et al. 2003; Ambler 2011).

Výsledná symptomatologie zahrnuje **psychiatrické projevy**, tj. změny kognitivních funkcí (poruchy paměti, ztrátu schopnosti koncentrace, ztrátu schopnosti učit se a chápat informace),

demenci, depresi, halucinace; a **neurologické projevy**, jako jsou epileptické záchvaty, poruchy řeči, poruchy koordinace pohybů, či svalová slabost.

Kumulativní výskyt vzácných neurodegenerativních nemocí je obtížně stanovitelný s ohledem na vzácnost diagnóz, jejich klinickou i genetickou heterogenitu, manifestaci v jakémkoliv věku, obtížně dostupný materiál mozkové tkáně pro potvrzení neuropatologické diagnózy a významné poddiagnostikování mnoha klinických jednotek (Faviez et al. 2020).

Jako model použijme významný soubor vzácných nemocí, kterým jsou **dědičné metabolické poruchy (DMP)**. Podle údajů **IEM base databáze** (Lee et al. 2018) **čítají ke dni 26.11.2021 1616 klinických jednotek** a vyskytují se s kumulativní incidencí 1 na 800 až 1 na 2500 živě narozených dětí (Applegarth et al. 2000; Sanderson et al. 2006). Dle aktuální porodnosti se v České republice ročně narodí až 130 dětí s DMP. 85 % dědičných poruch metabolismu vykazuje převážně neurologické projevy (Saudubray and Garcia-Cazorla 2018).

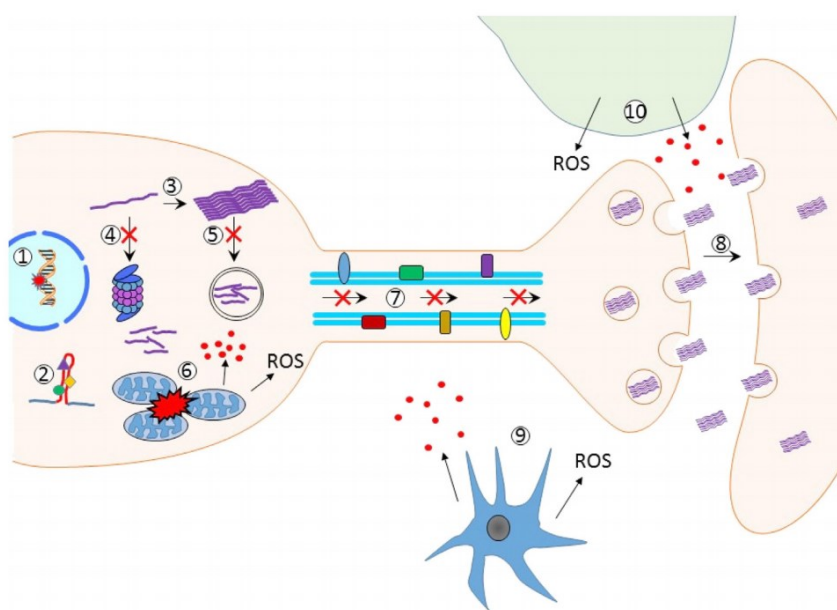
Definici vzácné nemoci neodpovídají nejčastější specifické proteinopatie Alzheimerova nemoc (AD) a Parkinsonova nemoc (PD). AD postihuje 6 % populace ve věku 60 let (Mayeux and Stern 2012); výskyt PD je přibližně 1 na 1000 jedinců (Tereza Bartoníková 2020). Důležité je však zmínit, že časně familiární formy AD s manifestací před 65. rokem (Bekris et al. 2010) i PD s manifestací před 50. rokem (Camerucci et al. 2021) vyskytující se s monogenní dědičností dle frekvence v populaci definici vzácných nemocí splňují.

Zavedení NGS sehrálo zásadní roli v porozumění molekulárním mechanismům a zvýšení efektivity stanovení správné diagnózy vzácných (neurodegenerativních) nemocí (Boycott et al. 2013).

Díky dokonalé znalosti molekulárního mechanismu vzácných monogenních nemocí bylo možné iniciovat vývoj kauzální léčby. V současné době je Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) povoleno 8 genových terapií, například Zolgensma cílící spinální svalovou atrofií, Luxura k léčbě dystrofie rohovky, Zynteglo k léčbě beta thalasemie. A dalších 13 genových terapií, většina cílících na vzácné nemoci, jsou ve 3. fázi klinických studií (American Gene Technologies, 2021).

1.4. Molekulární mechanismy neurodegenerace

V procesu neurodegenerace se uplatňuje celá řada molekulárních mechanismů (**Obr. 2**), které jsou specifické pro konkrétní genetické léze podmiňující jednotlivé klinické jednotky. Zahrnují chybné sbalování proteinů a jejich agregaci v důsledku defektní proteostasy (Lindberg et al. 2015), chybnou degradaci a recyklaci proteinů (Fecto et al. 2014), mitochondriální dysfunkci a poškozený energetický metabolismus (Monzio Compagnoni et al. 2020), narušený axonální transport (Guo et al. 2020), neuroinflamaci (Palpagama et al. 2019) a RNA-zprostředkovanou toxicitu (Swinnen et al. 2020), excitotoxicitu (patologicky zvýšené hladiny neurotransmiterů) (Olloquequi et al. 2018), či akumulaci kovů (Chen et al. 2016).



Obr. 2 Molekulární a buněčné mechanismy neurodegenerace. Příčinou monogenních nemocí je genetická léze (1), která vede k produkci mutovaného proteinu se ztrátou nebo změnou funkce, případně vyvolá jeho nadprodukcii nebo deficit. V případě expanzí repetitivních sekvencí (2) dochází k expresi mutantních nefunkčních mRNA, které tvoří vlásenky, agregáty a další struktury, které vyčerpávají RNA-vazebné proteiny a mění metabolismus mRNA. Patologické proteiny se mohou chybně sbalovat (3) a agregovat do toxických neodbouratelných forem. Nejsou adekvátně odbourávány ubiquitin-proteasomovým systémem (4) nebo autofagií (5). (6) Mitochondriální dysfunkce a neadekvátní mitofagie může vést k produkci apoptotických signálů, formaci ROS a chybnému energetickému metabolismu. (7) Axonální transport může být blokován agregáty proteinů nebo mutantními transportními proteiny. (8) Díky synaptické transmisí mohou být patogenní proteiny a s nimi asociované patologie rozšívány do okolních neuronů. (9) Aktivované mikroglie nebo (10) astrocyty uvolňují neurotoxické signály a podílí se na produkci ROS. ROS=reaktivní kyslíkové částice. Upraveno dle: (Wolfe 2018).

Patofyziologickou podstatou specifických proteinopatií je hromadění patologicky pozměněných nebo nadprodukovaných proteinů (Tab. I). Tyto proteinové agregáty se

stávají pro neuron toxické a spouští kaskádu dějů (autofagii a apoptózu), které vedou k zániku postižených neuronů.

Histopatologická klasifikace proteinopatií je založena na povaze a lokalizaci depozitních proteinů v nervovém systému. Diagnóza se klinicky určuje na úrovni možné (possible) a pravděpodobné (probable). Potvrzená **diagnóza** (definite) je **pouze neuropatologická** (Z. Rohan 2015). Tyto patologie nejsou hermeticky izolovanými kategoriemi, ale tvoří kontinuum a souběžný výskyt různých proteinových agregátů není vzácný (Moussaud et al. 2014). Předpokládá se, že až 10 % specifických proteinopatií má familiární výskyt (Robert Rusina 2019).

Tab. I Primární geny a molekulární patologie familiárních forem nejčastějších specifických proteinopatií (Wolfe 2018).

Forma neurodegenerace	Mutovaný gen	Proteinová deposita
Alzheimerova nemoc	<i>APP, PSEN1, PSEN2</i>	Amyloid β , tau
Frontotemporální demence	<i>MAPT, GRN, C9ORF72</i>	Tau, TDP-43
Amyotrofická laterální skleróza	<i>TDP-43, C9ORF72</i>	TDP-43
Parkinsonova nemoc	<i>SNCA, LRRK2</i>	α -Synuklein
Huntingtonova nemoc	<i>HTT</i>	Huntingtin
Prionové nemoci	<i>PRNP</i>	Prionový protein

Neurometabolické nemoci jsou DPM, které se prezentují neuropsychiatrickými symptomy v důsledku poškození centrální nervové soustavy (CNS).

Patofyziologickou podstatou neurometabolických nemocí jsou léze v genech kódujících **enzymy** (např. deficit palmitoylproteinthioesterasy u CLN2, OMIM #204500), **kofaktory** (defekt tetrahydrobiopterinu u fenylketonurie, OMIM #261640), **transmembránové proteiny** (příkladem je defekt transportu cholesterolu a genetických lézí *NPCI* u Nieman-Pickovy nemoci C1, OMIM #257220), či **chaperonové proteiny** (defekt synaptického chaperonu CSP α u Kufsovy nemoci, OMIM #162350).

Ztráta nebo změna jejich funkce vede k akumulaci nebo deficitu esenciálních metabolitů. Může dojít k tvorbě zcela nových metabolitů, či obtížně odbouratelných modifikovaných proteinů za vzniku střeďavých onemocnění. Dochází také k intoxikacím, jako je stav hyperamonemie v případě defektů močovinného cyklu (Gropman et al. 2013).

Neurometabolické nemoci mohou vedle CNS postihovat také další orgány podle tkáňové specifické exprese mutovaného proteinu, nároků dané tkáně na specifický protein, a citlivosti tkáně na toxické produkty metabolismu.

Mezi nejčastější neurometabolické nemoci v dětském věku patří leukoencefalopatie, neuronální ceroidní lipofuscinózy, mitochondriální nemoci, mukopolysacharidosy, gangliosidosy, či peroxisomální nemoci. (Verity et al. 2010)

Řada neurometabolických nemocí se prezentuje v dospívání nebo dospělosti neuropsychiatrickým fenotypem. Jako příklad uvedme porfyrie, homocystinurii, Wilsonovu nemoc, adrenoleukodystrofii, či některé lysosomální střeďavé nemoci (Sedel et al. 2007). Tyto případy jsou velice špatně diagnostikovatelné, což vede k podhodnocení jejich výskytu.

V uplatňování molekulárních mechanismů patologií CNS hraje významnou roli **zranitelnost neuronů**, které jsou postmitotickými buňkami. Neurony jsou plně diferencovány a dále se nedělí (Aranda-Anzaldo and Dent 2017). Proces neurogeneze, tedy formování funkčních zralých neuronů z neurálních kmenových buněk, je nejaktivnější v době embryogeneze. Je fascinující, že z počáteční neurální trubice o velikosti 3 mm přibývá v průběhu embryogeneze průměrně 250 000 neuronů za minutu, aby při narození bylo dosaženo 100 miliard neuronů. (Ackerman 1992). Neurogeneze pokračuje také v dospělém mozku ve dvou specifických oblastech (Kumar et al. 2019) v hippokampu a subventrikulární zóně postranních komor předního mozku (Boldrini et al. 2018; Kumar et al. 2019; Moreno-Jimenez et al. 2019). Neurogeneze je přítomna také v dalších částech mozku, ale ve velmi omezené míře (Ernst et al. 2014).

Axony neuronů překonávají značné vzdálenosti, aby se propojily s dalšími neurony. Například motorické neurony mohou dosahovat délky jednoho metru a více. Axony i dendrity používají transportní systémy, které dopravují biomolekuly a organely do vzdálených synapsí. Dysfunkce těchto systémů může vést k zániku synapsí a tedy i celých neuronů (Morfini et al. 2009).

S ohledem na nosné publikace této práce se následující text bude věnovat molekulárním mechanismům neurodegenerace u neuronálních ceroidních lipofuscinóz, spinální svalové atrofie a neuronální intranukleární inkluzní nemoci.

1.5. Neuronální ceroidní lipofuscinózy

Neuronální ceroidní lipofuscinózy (NCL) jsou heterogenní skupinou progresivních neurometabolických nemocí, které se vyskytují v dětském i dospělém věku. Jejich **sjednocujícím neuropatologickým prvkem je střeďání lipopigmentu zvaného ceroid**

v neuronech a dalších buněčných typech, které vede k progresivní neurodegeneraci a předčasné smrti (Haltia 2006; Anderson et al. 2013).

Ceroid je autofluorescentní, elektrondenzní a vysoce hydrofobní materiál podobný lipofuscinu, lipopigmentu stárnutí. Skládá se z lipidů a hydrofobních proteinů. Dominantním proteinem je podjednotka c mitochondriální ATP-synthasy a/nebo saposiny A a D. Ceroid má charakteristický histochemický profil a na rozdíl od lipofuscinu vytváří typické ultrastruktury (tvar otisku prstu, kurvilineární, rektilineární profil a tzv. GRODs = „granular osmiophilic deposits“) (Haltia 2006; Anderson et al. 2013).

U dětských forem NCL bývá průvodním znakem progresivní zrakové postižení v důsledku degenerace sítnice, epileptické záchvaty a postupující zhoršení kognitivních i motorických funkcí. U dospělých pacientů zpravidla není zrakové postižení přítomno a choroba se manifestuje postupující demencí, epileptickými záchvaty a zhoršením motorických funkcí (Mole and Cotman 2015).

NCL jsou jednou z nejčastějších geneticky podmíněných příčin neurodegenerací u dětí (Moore et al. 2008). Vyskytují se po celém světě s rozptylem incidence 1 na 67 000 v Itálii a Německu až 1 na 14 000 ve skandinávských zemích (Haltia and Goebel 2013). V Newfoundlandu byla stanovena jedna z nejvyšších incidencí NCL na světě - 1 na 7353 živých narozených dětí (Moore et al. 2008).

Historicky byly NCL klasifikovány dle období nástupu nemoci na formy kongenitální (CNCL), infantilní (INCL), pozdně-infantilní (LINCL), juvenilní (JNCL) a adultní (ANCL) (Haltia and Goebel 2013).

Geneticky jsou NCL dobře charakterizovány. Dnes je známo 13 genů podmiňujících NCL. S tímto ohledem byla v roce 2012 zavedena nová klasifikace NCL forem na základě postiženého genu, CLN1-CLN14 (forma CLN9 byla z klasifikace vyjmuta) (Williams and Mole 2012; Mole and Cotman 2015).

Každá ze třinácti NCL forem má svá fenotypová specifika a manifestuje se v jiném věkovém období. Kombinace zrakového postižení s regresí kognitivních a motorických funkcí u dětí v jakémkoliv věku je významným vodítkem pro podezření na NCL diagnózu.

Diagnostika ANCL je komplikovaná s ohledem na širokou diferenciální diagnostiku neurodegenerativních nemocí s nástupem v dospělosti (Berkovic et al. 2016).

Problematic ANCL je věnován teoretický úvod v kapitole 4.1. Studium genetické a molekulární příčiny ANCL.

Geny podmiňující NCL kódují proteiny, které lze rozdělit do 4 skupin dle intracelulární lokalizace (Mukherjee et al. 2019):

- I. lysosomální rozpustné (*PPT1/CLN1*, *TPPI/CLN2*, *CLN5/CLN5*, *CTSD/CLN10*, *CTSF/CLN12*) a membránové proteiny (*CLN3/CLN3*, *MFSD8/CLN7*, *ATP13A2/CLN12*),
- II. membránové proteiny endoplasmatického retikula (*CLN6/CLN6*, *CLN8/CLN8*),
- III. proteiny asociované s plasmatickou membránou (*DNAJC5/CLN4*, *KCTD7/CLN14*),
- IV. extracelulárně sekretovaný protein (*GRN/CLN11*).

Funkce jednotlivých NCL proteinů a patomechanismus NCL forem jsou objasněny jen velmi omezeně. Funkčně charakterizované jsou především lysosomální proteasy **tripeptidylpeptidasa** (*TPPI/CLN2* (Sleat et al. 1997)), **kathepsin D** (*CTSD/CLN10* (Siintola et al. 2006)) a **kathepsin F** (*CTSF/CLN13* (Bras et al. 2016)), lysosomální depalmitoylační enzym **palmitoylproteinthioesterasa** (*PPT1/CLN1* (Vesa et al. 1995)) a presynaptický chaperonový protein **CSP α** (*DNAJC5/CLN4* (Noskova et al. 2011)). **CSP α** se podílí na formování SNARE komplexu, na exocytose neurotransmiterů a recyklaci synaptických váček (Burgoyne and Morgan 2015).

V současné době je známo, že lysosomální membránový protein **CLN3** (The International Batten Disease Consortium, 1995) se podílí na koordinaci efektivní interakce podjednotek sortilinového receptoru. Sortilin je v CLN3 deficitních buňkách degradován lysosomem (Cotman and Lefrancois 2021). Funkcí sortilinu je regulace přepravy proteinů mezi trans Golgi a endosomy. Varianty v *SORL1* jsou příčinou Alzheimerovy nemoci s časným nástupem (Hung et al. 2021).

CLN5 (Savukoski et al. 1998) je rozpustný lysosomální protein, jehož deficit vede k defektu anterográdního pohybu lysosomů v axonech (Basak et al. 2021). Rovněž se předpokládá interakce proteinu CLN5 s CLN3 a společná koordinace stavby sortilinu (Yasa et al. 2021).

Další membránový lysosomální protein **MFSD8** (CLN7, (Siintola et al. 2007)) je dle deficitního MFSD8 modelu octomilky nezbytný pro vývoj synapsí a je lokalizován do post synaptické oblasti do synaptických váček (Connolly et al. 2019).

Předpokládá se, že dva membránové proteiny endoplasmatického retikula **CLN6** (Wheeler et al. 2002) a **CLN8** (Lonka et al. 2000) tvoří komplex, který umožňuje transport lysosomálních rozpustných proteinů do Golgi (Bajaj et al. 2020).

Gen **ATP13A2** (CLN12, (Bras et al. 2012)) kóduje neuroprotektivní ATPasu, která zprostředkovává selektivní import polyaminů z lysosomu do cytosolu. Je to polyaminový transportér v endo-lysosomálním systému (Sim et al. 2021).

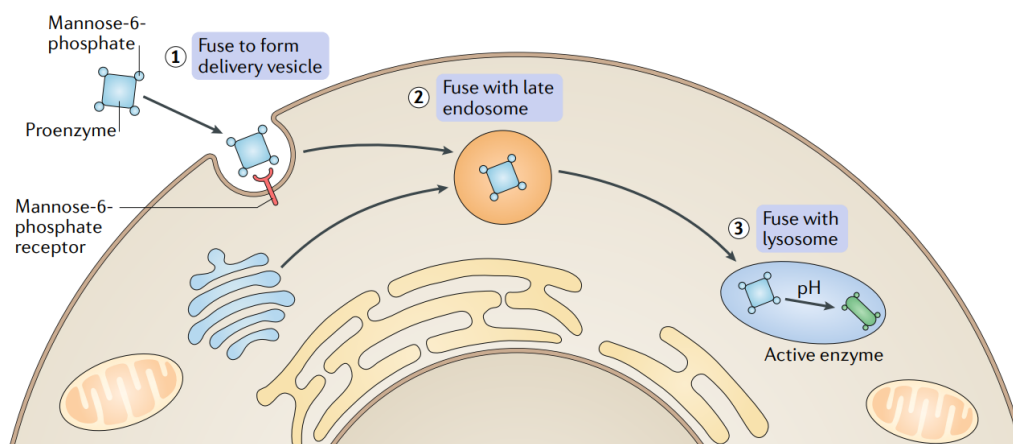
Granulin (CLN13, (Smith et al. 2012)) je extracelulárně sekretovaný protein, který je ze své proaktivní formy progranulin štěpen v lysosomech hydrolyticky pomocí kathepsinu L (Lee et al. 2017a). Předpokládá se, že může fungovat jako růstový faktor (He and Bateman 2003). GRN deficitní myši model vykazuje defekt axonálního růstu a větvení (Gass et al. 2012). Granulin reguluje aktivitu dalšího NCL proteinu, lysosomální proteasy kathepsin D (Zhou et al. 2017).

Funkce **KCTD7** (CLN14, (Staropoli et al. 2012)) proteinu není objasněna. Ukazuje se, že část proteinů rodiny KCTD tvoří podjednotky cullin 3 ubikvitin-ligasových komplexů, které jsou součástí ubikvitin-proteasomového systému (Pinkas et al. 2017). KCTD7 je nezbytný pro fungování bazální autofagie (Metz et al. 2018).

V roce 2017 byla FDA uvedena na trh historicky první enzymová substituční terapie (ERT) pro léčbu NCL, typ CLN2, **cerliponasa alfa** (Markham 2017) (**Obr. 3**) s komerčním názvem **Brineura** („BRightens the future of patients with this severely debilitating and life threatening NEURological disease“) společnosti BioMarin Pharmaceutical Inc. Brineura musí být pacientům aplikována jednou za dva týdny po dobu 48 týdnů intraventrikulárně (Kim et al. 2021).

NCL formy (*PPT1/CLN1*, *TPP1/CLN2*, *CLN5/CLN5*, *CTSD/CLN10*, *CTSF/CLN12*) způsobené variantami v genech kódujících lysosomální rozpustné enzymy, jsou vhodné pro použití strategie ERT s následným jevem „cross correction“, který částečně distribuuje funkční enzym do CNS (Rastall and Amalfitano 2015).

Ve fázi klinických zkoušek 1/2 je **genová terapie pro pozdně infantilní formu vLINCL6 (scAVV9.CB.CLN6)**, která započala v roce 2016, zahrnuje 13 účastníků s variantami v genu *CLN6* a její ukončení je plánováno na listopad 2021. V současné době by měla být rovněž zahájena klinická studie pro **genovou terapii CLN1, která byla schválena** již v roce 2019. Informace o probíhajících klinických studiích jsou dostupné v databázi ClinicalTrials.gov (Zarin et al. 2011).



Obr. 3 Mechanismus enzymové substituční terapie Cerliponasou alfa pro CLN2. Cerliponasa alfa je rekombinantní proenzym obsahující postranlační modifikaci manosa-6-fofátem. Po intrathékální administraci je mozkomíšním mokem dopravena k cílovým neuronům. **(1)** Váže se na manosa-6-fosfátový receptor na povrchu neuronů a procesem endocytosy je vpravena do neuronů. **(2)** Endocytovaný obsah fúzuje s endozomem, následně s lysosomem **(3)**, kde je proenzym v důsledku kyselého pH autokatalyticky aktivován do podoby funkčního enzymu a nahradí hydrolytickou funkci nefunkční TPP1. Upraveno: (Johnson et al. 2019).

1.6. Spinální svalové atrofie

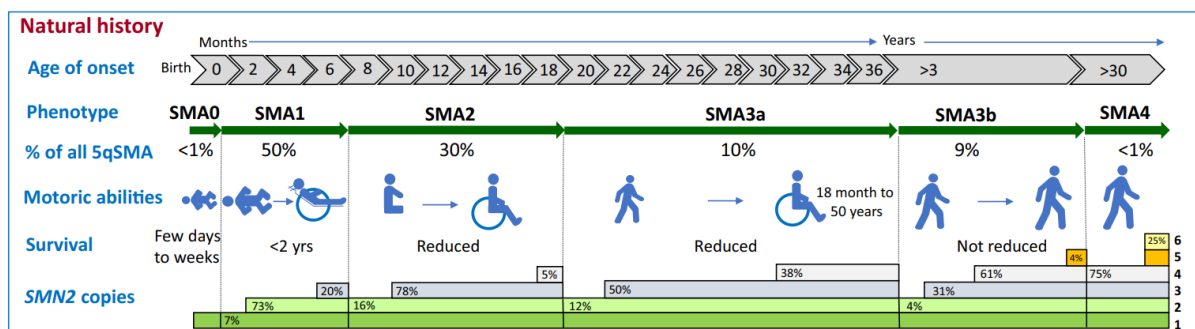
Spinální svalové atrofie (SMA) jsou heterogenní skupinou dědičných neurodegenerativních nemocí, které jsou charakterizovány progresivní degenerací alfa motoneuronů předních rohů míšních v páteři a mozgovém kmeni (Lefebvre et al. 1995).

Alfa motoneurony inervují kosterní svaly a řídí jejich pohyb. Jejich degenerace vede ke svalové atrofii, která se projevuje progresivní svalovou slabostí. U závažnějších forem může v důsledku generalizované svalové slabosti dojít k dechové nedostatečnosti s nutností použití umělé plicní ventilace.

SMA je nejčastější formou fatálního dědičného onemocnění u dětí s incidencí 1 na 8000 a frekvencí přenašečů v populaci 1 na 40 - 60 (Vill et al. 2021). V České republice se tak ročně narodí 10 dětí s SMA.

SMA je fenotypově heterogenní a vyskytuje se v pěti formách, které se odlišují věkem nástupu nemoci, závažností a progresí průběhu nemoci (**Obr. 4**).

Geneticky se podařilo SMA charakterizovat v 90. letech, kdy byl v roce 1990 mapován lokus genu SMA (Melki et al. 1990). Nalezený lokus překvapivě asocioval se všemi klasickými proximálními formami SMA. V roce 1995 byla stejnou skupinou identifikován gen *SMN1* na chromozomu 5 podmiňující klasické proximální formy SMA (**5q-SMA**) (Lefebvre et al. 1995).

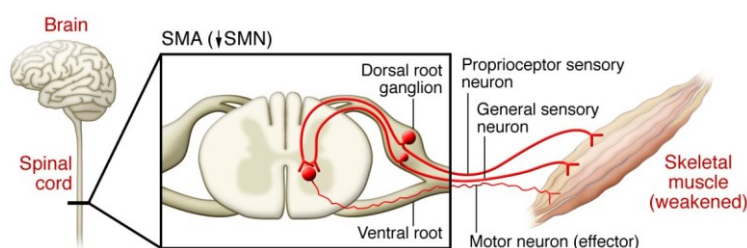


Obr. 4 Schematické znázornění pěti SMA forem 0-4. Formy SMA jsou klasifikovány na základě věku nástupu nemoci a dosažených pohybových schopností. Počet *SMN2* kopií asociovaný s každou SMA formou je uveden. Upraveno: (Wirth 2021).

Klinickou heterogenitu SMA částečně vysvětlila identifikace homologního genu *SMN2* (Lefebvre et al. 1995). *SMN2* vznikl v průběhu evoluce inverzní duplikací rozsáhlé oblasti na chromozomu 5 a od genu *SMN1* se odlišuje pouze v pěti nukleotidech (Lorson et al. 1999).

Rozdíl jediné nukleotidu v exonu 7 *SMN2* má za následek částečný vznik aberantního transkriptu *SMN17* a následného nestabilního proteinu SMN. Část funkčního transkriptu je však zachována (10-20 %) (Lauria et al. 2020). *SMN2* tak produkuje v nižší míře funkční SMN protein. Geny *SMN1* a *SMN2* tedy kódují identický funkční protein SMN, který je v případě *SMN2* exprimován v nižší míře.

Tento jev se významně uplatňuje v klinické heterogenitě SMA, jelikož počet kopií *SMN2* je v populaci variabilní (0 až 6 kopií) a u 5q-SMA pacientů tak kopie *SMN2* zastupují defektní gen *SMN1*. Vyšší počet kopií *SMN2* ve většině případů koreluje s mírnější formou SMA.



Obr. 5 5q-SMA je způsobena deficitem SMN proteinu v důsledku bialelických lézí genu *SMN1*. Primárním cílem deficitu SMN proteinu jsou selektivně degenerované motoneurony předních rohů míšních páteře a mozku kmene, což vede k atrofii kosterních svalů. Upraveno: (Swoboda 2011).

Protein SMN („survival of motor neuron“) (Obr. 5) hraje významnou roli v biogenezi RNA a účastní se řady RNA-asociovaných mechanismů. Lokalizován v jádře se podílí na sestavení malých jaderných ribonukleoproteinů (snRNP) a následném vzniku

spliceosomu, který je zodpovědný za sestřih pre-mRNA (Liu and Dreyfuss 1996; Liu et al. 1997).

SMN protein se nachází také v axonech, kde **reguluje axonální transport řady mRNA svou interakcí s cytoskeletálními proteiny** (Fallini et al. 2011).

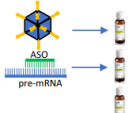
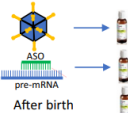
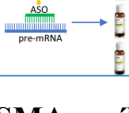
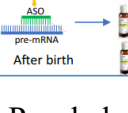
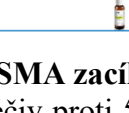
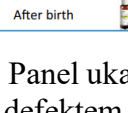
Rovněž bylo ukázáno, že SMN **asociuje s polysomy (polyribosomy) a účastní se tak translace (Bernabo et al. 2017)**. Tuto skutečnost rozvinuli v recentní studii Lauria et al. Ukázali, že SMN funguje jako **tkáňově specifický regulátor translace** specifické skupiny mRNA, které hrají významnou roli v patogenezi SMA. Ribozomy asociující se SMN nazývají „SMN-primed ribosomes“ (Lauria et al. 2020). Tento mechanismus poprvé naznačuje důvod specifické neurodegenerace alfa motoneuronů v případě jinak obecně exprimovaného SMN proteinu.

V současné době jsou na trhu tři léčiva (Obr. 6) pro 5q-SMA pacienty, která jsou povolena FDA a Evropskou lékovou agenturou (EMA). Úspěch jejich vývoje spočíval v unikátním propojení (1) znalosti jasně definované genetické příčiny, kterou je bialelický defekt *SMN1*, (2) existence homologního genu *SMN2*, který je schopen kompenzovat deficit *SMN1* a (3) přístupnost postižených motoneuronů skrze intrathékální administraci léčiva.

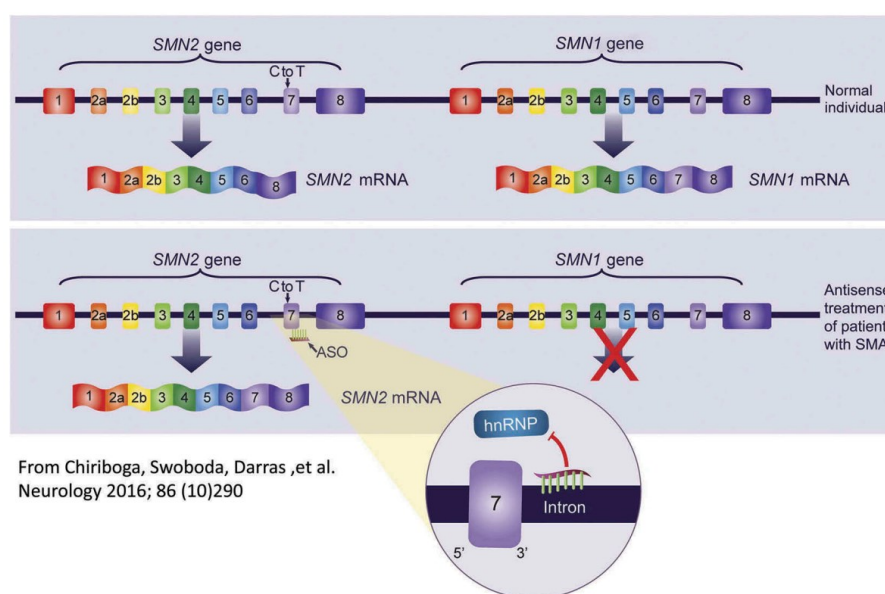
V roce 2016 bylo na trh uvedeno léčivo **Nusinersen** (obchodní název **Spinraza**, výrobce Biogen). Nusinersen funguje na bázi anti sense oligonukleotidů (ASO) (Chiriboga et al. 2016), které cílí do „down stream“ oblasti exonu 7 genu *SMN2*, brání vazbě sestřihových faktorů a umožňují produkci plnodélkového transkriptu *SMN2* a funkčního SMN proteinu (**Obr. 7**).

V roce 2019 byla na trh uvedena **genová terapie onasemnogen abeparvovek** s obchodním názvem **Zolgensma** (výrobce Novartis), která prostřednictvím neintegrujícího se virového vektoru vnáší do organismu kopie genu *SMN1*, které vedou k expresi funkčního SMN proteinu. Zolgensma se aplikuje pouze v jediné dávce intravenózně (Hoy 2019).

V roce 2020 bylo schváleno léčivo **risdiplam** (obchodní název **Evrisdi**, výrobce Roche and PTC Therapeutics), nízkomolekulární látka, která, stejně jako Nusinersen, ovlivňuje sestřih *SMN2* mechanismem, který není zcela objasněný. Risdiplam zvyšuje produkci plnodélkového SMN proteinu (Baranello et al. 2021).

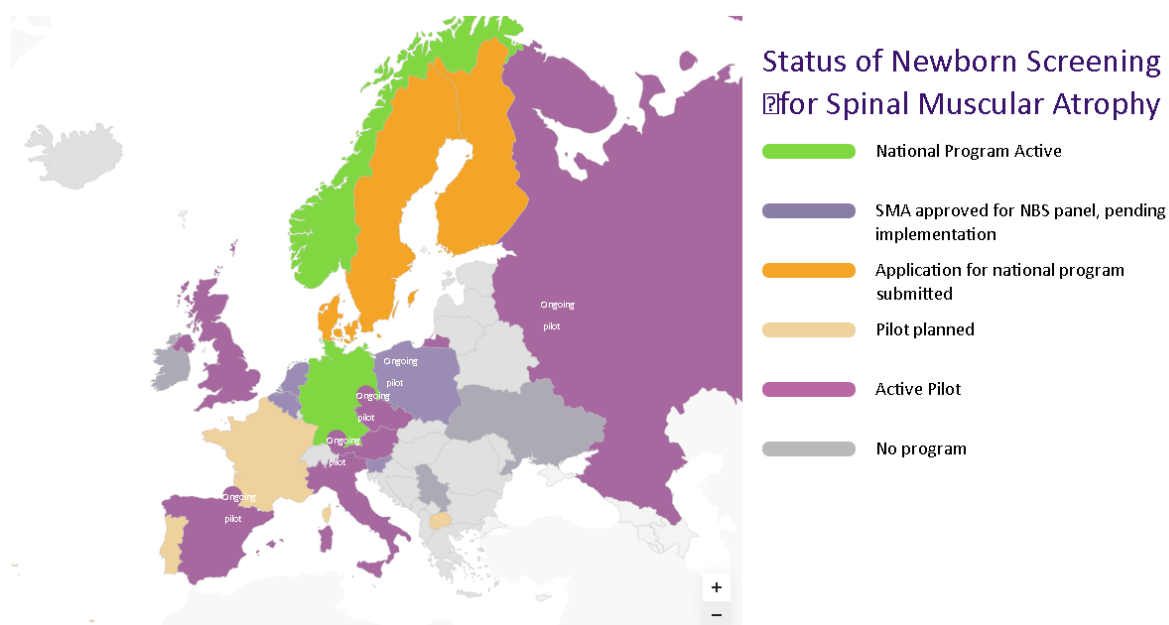
Therapy	Therapy	Type	Administration	SMA type	SMN2 copies	Age	Weight (kg)	Dosing	
CNS only	Spinraza	ASO	Intrathecal	All	All	No limitation		5x 1 st year; 3x/year lifetime	
	Zolgensma	Gene therapy	Intravenous	All	≤3 in EU	<2 years in US	13.5 US; 21 EU	1x	
Systemic	Evrysdi	Small molecule	Oral	All	All	> 2 months		Daily, lifetime	
Symptomatic therapy					Presymptomatic neonatal therapy				
		→	≤3 SMN2, ≤ 6 months			→	≤3 SMN2		
		→	≤3 SMN2, ≥ 6 months			→	4 SMN2		
		→	≥4 SMN2			→	≥5 SMN2		

Obr. 6 Terapie SMA zacílené na deficit SMN proteinu. Panel ukazuje hlavní charakteristiky tří dostupných léčiv proti 5q-SMA se *SMN1* genetickým defektem. Uvedena jsou doporučení pro jejich aplikaci v případě symptomatických a asymptomatických pacientů Upraveno: (Wirth 2021).



Obr. 7 Mechanismus působení léčiva Nusinersen. Nusinersen je ASO léčivo navrženo tak, aby cílilo na hnRNP-A1/A2-závislý sestříhový „zeslabovač“ („silencer“) ISS-N1, na pre-mRNA *SMN2*. Nusinersen vytěšňuje hnRNP-proteiny z místa ISS-N1 v intronu 7 *SMN* a usnadňuje správný sestříh *SMN2* transkriptu (zvyšuje vznik transkriptu s exonem 7). To má za následek zvýšenou produkci plnodélkového SMN proteinu. ASO = antisense oligonukleotidy; hnRNP = heterogenní nukleární ribonukleoprotein; ISS = intronový sestříhový zeslabovač („intronic splicing silencer“). Upraveno: (Chiriboga et al. 2016).

Významným krokem ve strategii léčby se stalo **zařazení SMA do programu novorozeneckého screeningu (NS, Obr. 8)** (Vill et al. 2021). V České republice bude **dvouletý pilotní program zahájen počátkem roku 2022**. Dobrovolné genetické testování novorozenců ze suché kapky krve je prováděno metodou kvantitativního PCR exonu 7 genu *SMN1*. V případě přítomnosti delece obou alel *SMN1* budou vyšetřeny počty kopií *SMN2* metodou MLPA („multiplex ligation-dependent probe amplification“). Počet kopií *SMN2* je vodítkem pro strategii léčby SMA pacientů (Czibere et al. 2020; Dangouloff et al. 2021).



Obr. 8 Novorozenecký screening (NS) SMA v EU. Programy NS SMA jsou zaváděny v řadě zemí od roku 2018. Mezi prvními byly státy Austrálie, Belgie, Kanada, Německo, Itálie, Japonsko, Taiwan, USA. V současné době probíhají pilotní programy v řadě evropských zemí. Upraveno dle Dangouloff et al., 2021.

Bialelický defekt *SMN1* tvoří 95 % SMA případů (5q-SMA) (Dangouloff et al. 2021). Non-5q-SMA jsou klinicky i geneticky heterogenní skupinu onemocnění spodního motoneuronu, které nejsou způsobeny variantami v genu *SMN1*. Zahrnují formy s **autozomálně dominantní, recesivní i X-vázanou dědičností a manifestací v dětském i dospělém věku.**

Dnes je známo 17 genů (Peeters et al. 2014; Pinto et al. 2021), které jsou asociovány s proximálními non-5q-SMA, jsou klinickými fenokopii SMA a vykazují alelickou heterogenitu (Axente et al. 2021).

Alelická heterogenita vyjadřuje vznik různých fenotypů na základě variant v identickém genu. Například varianty v genu *DYNC1H1* jsou příčinou autosomálně dominantních dětských forem spinální svalové atrofie s postižením dolních končetin, typ 1 (OMIM 158600), Charcot-Marie-Toothovy nemoci axonální, typ 20 (OMIM 614228) a mentální retardace typ 13 (OMIM 614563). Gen *DYNC1H1* kóduje základní podjednotku dyneinového komplexu, který se podílí na axonálním transportu makromolekul, organel a transportních váčků (Hoang et al. 2017). Genetickou příčinu non-5q-SMA bylo možné identifikovat v průběhu posledních let především díky aplikacím NGS metod (Peeters et al. 2014; Pinto et al. 2021).

Patofyziologické mechanismy, které se u non-5q-SMA uplatňují, jsou velice pestré a budou představeny jednotlivými zástupci.

Zahrnují **(1) defekt biogeneze RNA a poruchy transkripce** (*TRIP4*, (Knierim et al. 2016)), **(2) tvorbu proteinových agregátů, chybné sbalování proteinů a jejich degradaci** (Groen and Gillingwater 2015) (*UBA1*, (Ramser et al. 2008)), **(3) defekt axonálního transportu a dynamiky cytoskeletu** (Harms et al. 2010) (*DYNC1H1*, (Hoang et al. 2017)), **(4) primární defekt iontových kanálů** (Lanciotti et al. 2012) (*TRPV4*, (Deng et al. 2010)), **(5) defekt neuronálního mitochondriálního energetického metabolismu a mitochondriální struktury** (Genin et al. 2016) (*CHCHD10*, (Penttila et al. 2012)).

1.7. Neuronální intranukleární inkluzní nemoc

Neuronální intranukleární inkluzní nemoc (Neuronal intranuclear inclusion disease, NIID) je progresivní neurodegenerativní nemocí, která je charakterizována přítomností eosinofilních intranukleárních inkluzí v neuronech a dalších buněčných typech (Haltia et al. 1984). Klinicky jsou NIID heterogenní a jsou klasifikovány na formu infantilní (iNIID), juvenilní (jNIID) a adultní (aNIID). Formy se od sebe liší věkem nástupu nemoci, neurologickými symptomy a nálezem na MRI (Sone et al. 2019; Sikora et al. 2021).

Nejlépe charakterizovány jsou aNIID. Díky přítomnosti inkluzí mimo CNS jsou diagnostikovatelné během života pacienta na základě kožní biopsie. aNIID zahrnují širokou symptomatologii: progresivní zhoršení kognitivních funkcí, třes, ataxii, periferní neuropatii, autonomní dysfunkce nebo svalovou slabost (Kimber et al. 1998; Zannolli et al. 2002; Sone et al. 2005).

Dětských pacientů s iNIID bylo v odborné literatuře doposud popsáno pouze 8 (Sikora et al. 2021) s ohledem na vzácnost nemoci a obtížné stanovení iNIID diagnózy během života. iNIID diagnóza byla ve všech případech určena neuropatologicky *post mortem*. Dle doposud reportovaných případů a na základě pacienta, kterým jsme se zabývali na našem pracovišti, je zřejmé, že na rozdíl od aNIID, **iNIID pacienti mají charakteristické inkluze přítomny výhradně v CNS a není tedy možné pro diagnostikování iNIID použít kožní biopsii.**

Dokumentovaní iNIID pacienti se prezentovali progresivní regresí psychomotorického vývoje, která se začala manifestovat před čtvrtým rokem, dále cerebelární ataxií v důsledku cerebelární atrofie a předčasnou smrtí do věku devíti let (Sikora et al. 2021).

V roce 2019 byla přístupem genomového sekvenování s dlouhým čtením identifikována expanze tandemových repetitivních (TR) GGC v nekódující oblasti genu *NOTCH2NLC* jako kauzální varianta pro asijskou formu aNIID (Ishiura et al. 2019; Sone et al. 2019).

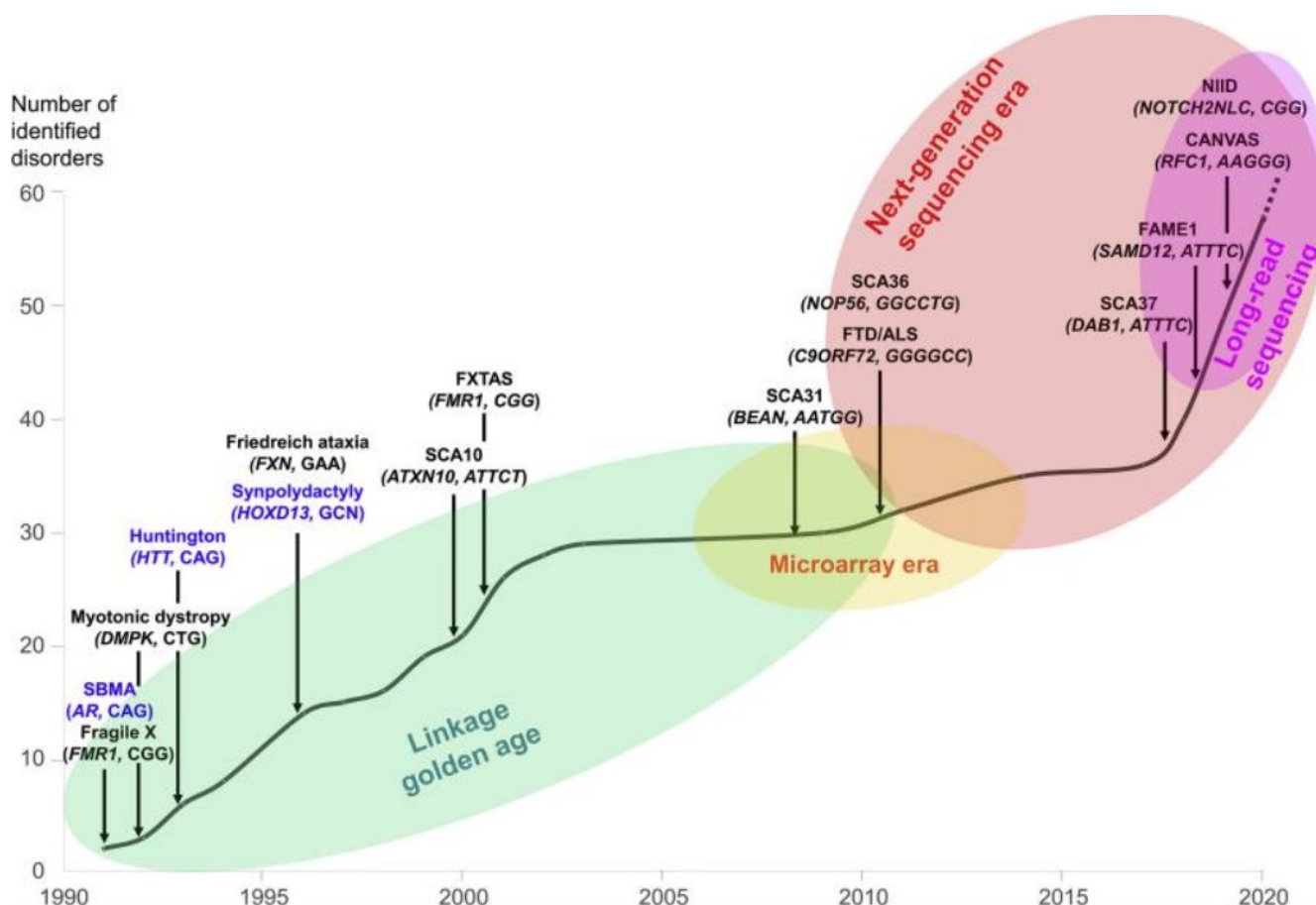
Tato léze však nebyla nalezena v kohortě evropských pacientů s esenciálním tremorem (Yau et al. 2020), jedním z průvodních znaků aNIID, což nasvědčuje genetické heterogenitě NIID. Fenotypové spektrum *NOTCH2NLC* expanze se vzápětí rozšířilo (Fan et al. 2021) o další syndromy a dnes čítá poměrně širokou skupinu neuropsychiatrických diagnóz.

Za poslední dva roky od léta 2019, kdy byla prvně expanze *NOTCH2NLC* popsána, bylo publikováno 70 odborných prací, které se věnují identifikaci *NOTCH2NLC* expanze především u pacientů asijského původu. Jedná se o klinické soubory adultních pacientů s esenciálním tremorem, Alzheimerovou nemocí, FTD, PD, multisystémovou atrofií, adultní leukoencefalopatií, ALS (Jiao et al. 2020; Ehrlich and Ellerby 2021). aNIID pacienti mají expanzi v rozsahu více než 60 GGC repetitivních, zdraví jedinci mají méně než 40 repetitivních (Ishiura et al. 2019; Tian et al. 2019).

Dětské formy NIID zůstávají geneticky nedefinovány. Hlavní příčinou je především v podstatě nemožnost rozpoznat iNIID během života bez molekulárně-genetické diagnostiky.

Patomechanismus *NOTCH2NLC* expanze demonstroval v letošním roce Boivin et al., který ukázal, že GGC repetice jsou lokalizovány v „upstream“ oblasti *NOTCH2NLC* genu s vlastním čtecím rámcem (uORF), který je odlišný od ORF *NOTCH2NLC*. Jeho výsledkem je produkce nového proteinu uN2CpolyG s expandovaným polyglycinem a N-terminální částí původního *NOTCH2NLC* proteinu (Boivin et al. 2021).

Technologie genomového sekvenování s dlouhým čtením významně zefektivnily identifikaci genů klinických jednotek podmíněných expanzí TR (**Obr. 9**). Nestabilita expanzí repetitivních během meiózy a přenos expandované alely na další generaci jsou dobře dokumentovány (Nolin et al. 2019; Joosten et al. 2020). Popsána byla také zkrácení, tedy kontrakce TR, která jsou vzácnější (Nolin et al. 2019). **V současné době je známo více než 50 klinických jednotek, které jsou způsobeny expanzemi TR, především neuropsychiatrické a neurovývojové nemoci** (Depienne and Mandel 2021).



Obr. 9 Časový a technologický vývoj objevů genů podmiňujících onemocnění s expanzí TR. Jako první byly v roce 1991 identifikovány expanze repetice CGG v genu *FMR1* u fragilního syndromu X a CAG v genu *AR* u X-vázané spinální bulbární svalové atrofie. Upraveno dle Depienne and Mandel, 2021.

Předpokládá se, že TR vznikly v průběhu evoluce z jiných repetitivních oblastí, kterými jsou retrotranspozony tvořící 45 % lidského genomu (Grandi and An 2013). TR se nacházejí především v nekódujících oblastech. Expanze GC bohatých repetice v 5'UTR nepřekládaných oblastech mohou vést k hypermethylovači a umlčení expandované alely (Lacroix et al. 2019). TR expanze přítomny v kódujících oblastech mohou být hotspotem pro posunové varianty (Mattioli et al. 2020).

Patomechanismus expanzí TR spočívá v epigenetickém umlčování genů, RNA toxicitě, chybném sbalování a agregaci proteinů a RAN translaci („Repeat associated non-AUG initiated translation“).

Expanze GC-bohatých repetice v promotorech nebo 5' nepřekládaných oblastech mohou vést k **hypermethylovači CpG ostrůvků**, což zabrání genové expresi a vede k deficitu expandované alely. Příkladem jsou expanze *FMR1* u fragilního syndromu X (Kremer et al. 1991; Bell et al. 1991).

RNA toxicita je způsobena vyčerpáním RNA vazebných proteinů, transkripčních faktorů. Expandované RNA mohou vytvářet sekundární struktury, které vyvazují a vyčerpávají RNA vazebné proteiny. Vznikají RNA jaderné inkluze, které vedou k chybnému sestřihu dalších pre-mRNA vyčerpáním sestřihových faktorů. Příkladem je expanze *DMPK* u myotonické dystrofie (Mahadevan et al. 1992; Kanadia et al. 2003).

Expanze v kódujících oblastech (*HTT, ATNI, AR*) vedou k produkci chybně sbalovaných a agregujících proteinů. Příkladem jsou polyglutaminové expanze u řady neurodegenerativních nemocí (HD, OMIM #143100; DRPLA, OMIM #125370 nebo SBMA, OMIM #313200).

RAN translace („Repeat associated non-AUG initiated translation“) je nekanonický proces translace. RAN translace je iniciována v důsledku expanze TR bez přítomnosti iniciačního AUG kodonu (Zu et al. 2011). Vznikají toxické agregující polypeptidy ve všech třech čtecích rámcích a obou směrech vlákna RNA, které vyčerpávají buňku a vytváří RNA inkluze. Mechanismus se uplatňuje u DM2 (Zu et al. 2017), FXTAS (Glineburg et al. 2018), HD (Banez-Coronel et al. 2015), *C9ORF72*-FTD/ALS (Ash et al. 2013), SCA8 (Zu et al. 2011) a SCA31 (Ishiguro et al. 2021).

2. Hypotézy a cíle dizertační 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 adultní neuronální ceroidní lipofuscinózy (ANCL), spinální svalové atrofie (SMA) a infantilní formy neuronální intranukleární inkluzní nemoci (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 adultní formy NCL (ANCL)

- 1.1. Využití exomového sekvenování k identifikaci genetické příčiny ANCL ve spolupráci s mezinárodním konsorciem „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 mutací *SMN1*.

3. Navržení metodiky a použití DNA-sekvenační technologie s dlouhým čtením Pacific Biosciences pro vyšetření přítomnosti expanze *NOTCH2NLC* u iNIID.

3. Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce

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, Přistoupilova 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**

4. Výsledky a komentáře k vybraným publikovaným pracem

4.1. Studium genetické a molekulární příčiny adultních forem NCL

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

Adultní formy NCL (ANCL) jsou dědičné degenerativní nemoci mozku. Jsou nejvzácnějšími a nejméně prostudovanými formami mezi NCL. V genetické NCL databázi zvané „**NCL Resource - A gateway for Batten disease**“ (Gardner and Mole, 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 strádání lipopigmentu zvaného ceroid s jeho charakteristickou 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** (Arsov et al. 2011; Sharp et al. 1997). Zde se ukazuje alelická heterogenita, jelikož poslední tři zmiňované geny jsou rovněž kauzální pro dětské formy NCL.

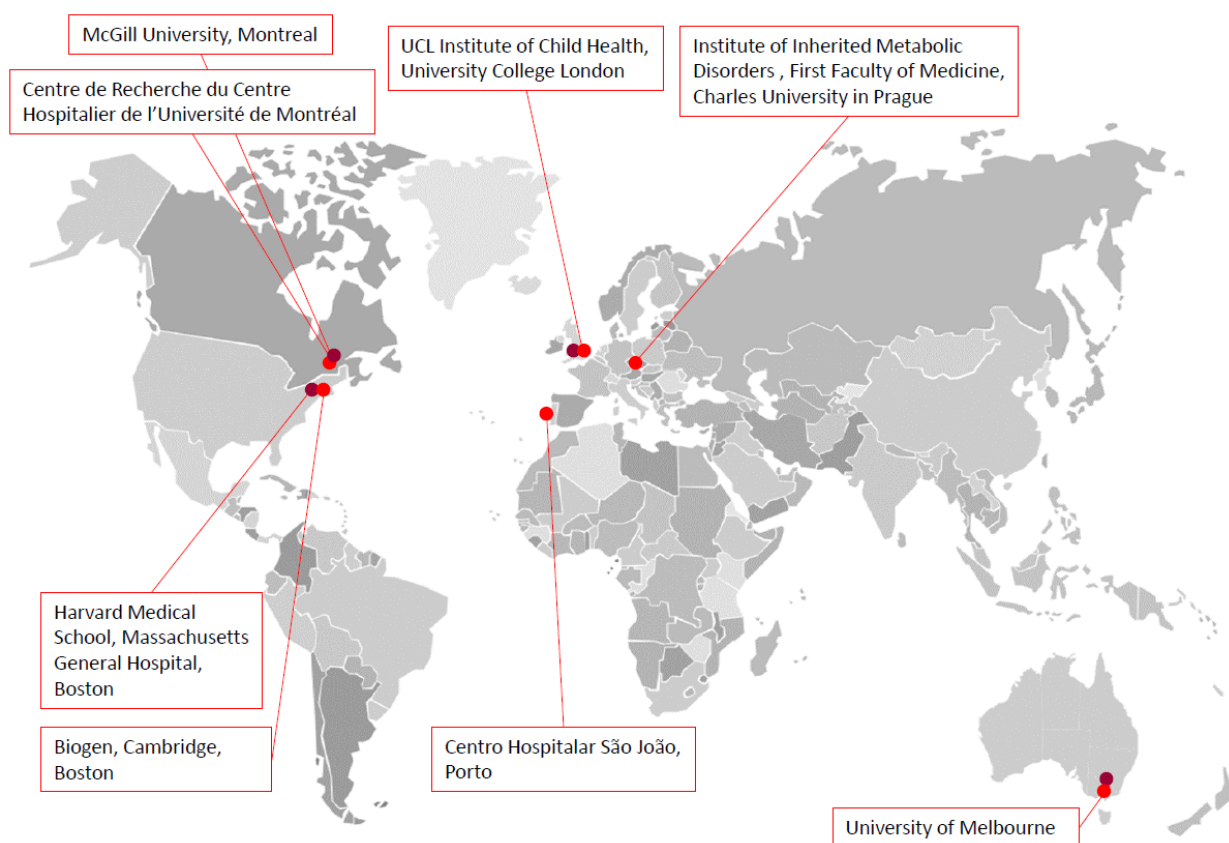
Zajímavé je, že zatímco homozygotní varianty v genu **GRN** vedou k rozvoji ANCL, tytéž heterozygotní varianty v **GRN** jsou příčinou frontotemporální demence (Gijssels et al. 2008).

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

Kufsova nemoc typ A, pacienti se prezentují myoklonickou epilepsií. Typ A se vyskytuje s autosomálně recesivní i dominantní dědičností. Autosomálně recesivní forma je podmíněna variantami v genu *CLN6*, autosomálně 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. 10 The adult NCL gene discovery consortium. Mezinárodní konzorcium 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. 10), 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 exomové sekvenování byla odhalena alternativní diagnóza v 10 z 16 hodnocených případů. U jednoho pacienta byla potvrzena Kufsova nemoc identifikací variant v genu *CTSF*.

Alternativní diagnózy zahrnovaly **Huntingtonovu nemoc, familiární formu Alzheimerovy nemoci s časným nástupem, Niemann-Pickovu nemoc, neuroserpinopatii, prionové onemocnění, neurodegeneraci spojenou s akumulací železa (2 případy), cerebrální lymfom, spastickou ataxii Charlevoix-Sagueany a Leighův syndrom.**

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 objasnit kauzalitu kandidátních variant z důvodu nedostupnosti materiálu probanda a/nebo rodinných příslušníků.

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

Tab. II Přehled pěti ANCL suspektních případů s definovanou genetickou lézí. U čtyř případů jsme stanovili alternativní diagnózu, jeden ANCL případ byl potvrzen identifikací nové 30 bp duplikace v genu *DNAJC5*. Metodicky jsme použili exomového sekvenování v kombinaci s dalšími molekulárně genetickými a výpočetními technikami.

ID	Prezentující symptomy	Kauzální gen	Strategie identifikace kauzální varianty	Finální diagnóza
KC9	Demence ve 37 letech, mírné cerebelární symptomy, epileptické záchvaty	<i>TREM2</i>	Exom	TREM2- asociovaná neurodegenerace
KC15	Nástup nemoci v 18 letech, parkinsonismus a myoklonus, psychóza, pacient odkázán na invalidní vozík. Bez verbální komunikace v 38 letech.	<i>C19ORF12</i>	Exom	NBIA
KC16	Demence, epilepsie	<i>C9ORF72</i>	RP-PCR	progresivní myoklonická epilepsie+FTD (van den Aemele et al. 2018)
KC46	Generalizované tonicko-klonické záchvaty, ataxie, změny v chování, demence; postižená matka a syn, oba zesnuli.	<i>ATNI</i>	Exom Expansion Hunter výpočetní analýza expanzí TR	Dentato-rubro- pallido- ludsiánská atrofie
KC50	Dva synové se prezentovali záchvaty, ztrátou paměti, odkázání na invalidní vozík ve věku 31 a 34 let.	<i>DNAJC5</i>	Exom Sangerovo sekvenování	ANCL, CLN4 (Jedlickova et al. 2020a)

Autorův příspěvek: Podílela jsem se na přípravě vzorků pro exomové sekvenování, izolaci DNA z parafinových bločků bioptických tkání, na interpretaci bioinformatických dat a prioritizaci kandidátních variant zahrnujících *in silico* analýzy funkčního dopadu identifikovaných variant. Dále na ověřování kandidátních variant pomocí Sangerova sekvenování, na koordinaci spolupráce konzorcia prostřednictvím telekonferencí a účasti na mezinárodních konferencích. Podílela jsem se na přípravě a psaní publikací van den Aemele J et al., 2018 a Jedličková et al., 2020.

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, Pristoupilová 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 lokalizován 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 forma 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 autosomálně 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 bp 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). Jejich zobrazením jsme potvrdili u obou postižených bratrů přítomnost **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 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) (**Obr. 11**). Cysteinová rezidua CSP α jsou bohatě palmitoylovaná a jsou zodpovědná za membránové interakce CSP α (Gundersen et al. 1996; Chamberlain and Burgoyne 1998).

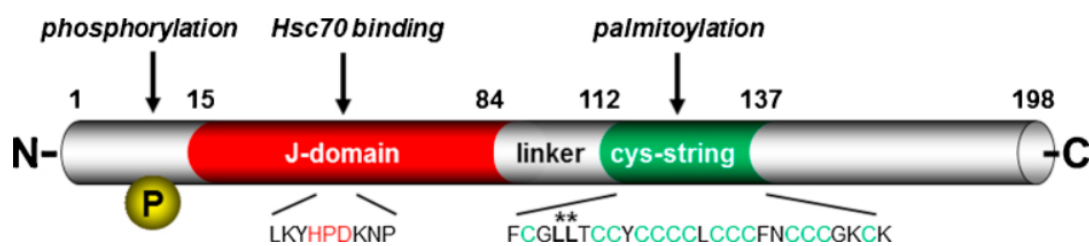
***In silico* analýza** pomocí programu ProtScale, CSS-Palm, ukázala, že duplikace tohoto motivu vede ke zvýšené hydrofobicitě proteinu a zvyšuje jeho palmitoylační potenciál. Takový protein může snáze podléhat agregování.

***In vitro* funkční charakterizaci na úrovni tranzientního buněčného model CAD5** myších neuronálních buněk jsme ukázali, že nová 30 bp duplikace vede k chybné lokalizaci mutovaného *DNAJC5* p.(Cys124_Cys133dup). Podobný efekt byl popsán u předešlých *DNAJC5* varianty (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. Dále 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 L115R, L116Δ a mutant s CSD duplikací p.(Cys124_Cys133dup) tvoří vysokomolekulární agregáty, divoký typ CSPα nikoliv.



Obr. 11 Schéma struktury funkčních domén proteinu CSPα. Schéma znázorňuje fosforylovaný serin na pozici S10 a HPD motiv J-domény zodpovědný za interakci CSPα s proteinem teplotního šoku Hsp70. Cysteinová doména (CSD) obsahuje 13 cysteinů (zeleně). Tři doposud identifikované AD-ANCL kauzální varianty se nachází v této oblasti: L115R, L116Δ (***) a duplikace C124-C133 (červeně podtrženo), která vede ke vzniku sekvence C124LCCCFNCCCCLCCCFNCCCGK145. Upraveno: (Burgoyne and Morgan 2015).

Autorův příspěvek: Podílela jsem se na přípravě plasmidových konstruktů, tranzientního buněčného modelu a jeho následné charakterizaci, na přípravě buněčných lyzátů s následnou palmitoylační studií; na psaní a přípravě publikace.

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*

Genetické vyšetření pacientů suspektních pro SMA je založeno na stanovení počtu kopií exonu 7 a 8 genů *SMN1* a *SMN2* metodou MLPA (Scarciolla et al. 2006; Arkblad 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*. (Parsons et al. 1998; Wirth et al. 1997).

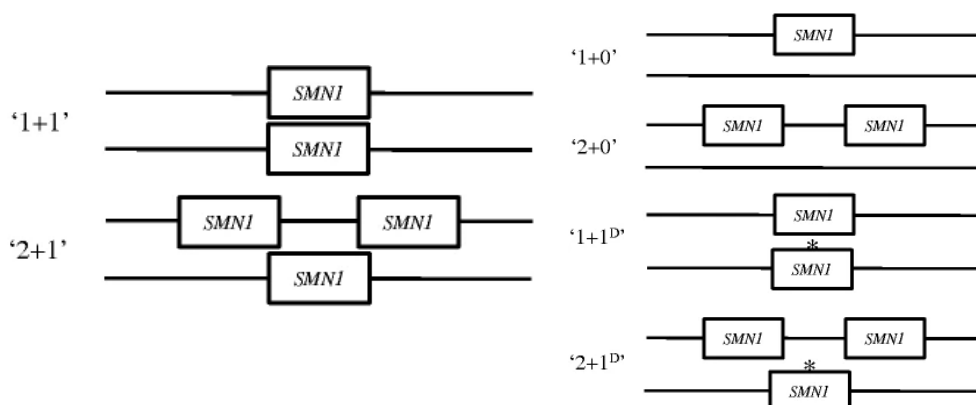
Počet kopií *SMN2* je stanovován s ohledem na jeho kompenzační funkci v případě bíalelického defektu *SMN1*. Kopie *SMN2* mohou dosahovat počtu 0-6 a jejich vyšší počet v mnoha případech vede k mírnějšímu fenotypu (Calucho et al. 2018).

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

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 axonogenesi, 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' (Obr. 12) (Verhaart et al. 2017).



Obr. 12 Schéma variability architektury kopií alel *SMN1* v populaci. Levý panel znázorňuje dokumentované genotypy dle počtu kopií *SMN1* na jednotlivých alelách v populaci,

kteřá nepředstavuje přenašeče 5q-SMA. Pravý panel naznačuje variabilitu možného maskovaného přenašečství delece nebo bodové mutace (*) jedné alely *SMN1* (Verhaart et al. 2017).

Problematice 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 deleci *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. 2020b).

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 deleci *SMN1* exonů 2a-5 iniciovanou *Alu* elementy.

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

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

4.2.1. Novorozenecký screening (NS) SMA a jeho úskalí na příkladu naší pacientky

Jelikož je vyšetření homozygotní delece exonu 7 *SMN1* metodou qPCR používáno při NS SMA, lze očekávat, že pacienti, jako je výše popsána 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 bíalelického 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 symptomů, 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.

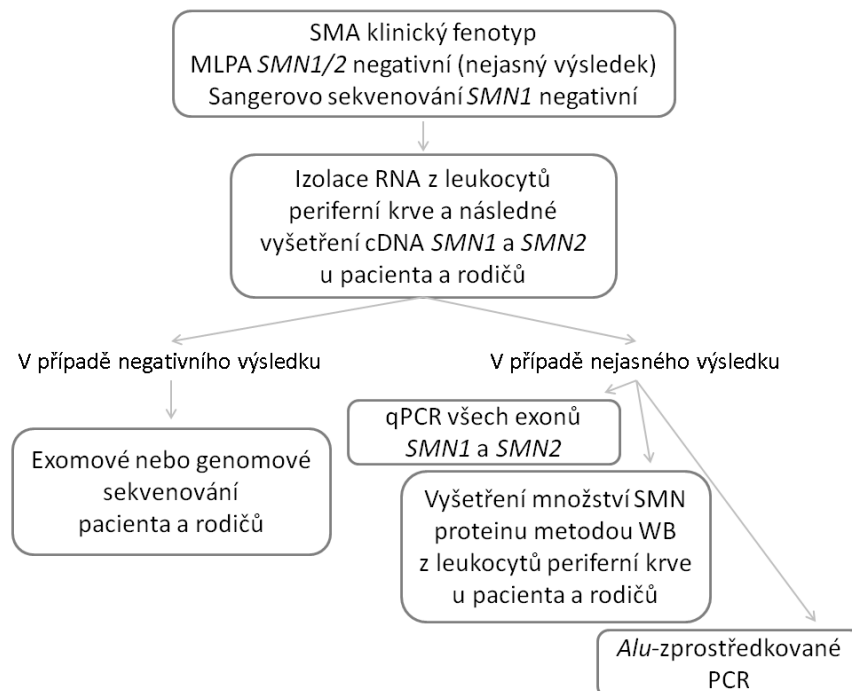
Podávání terapie u pacientů se 4 a více kopiemi *SMN2* je předmětem debaty, jelikož tito pacienti nemusí SMA vůbec vyvinout, na druhou stranu výsledky NS v Německu ukazují, že až u 45 % pacientů nesoucích především 4 a více kopií *SMN2* byl počet *SMN2* kopií stanoven nesprávně.

S ohledem na výše diskutovaný případ pacientky s identifikovanou unikátní delecí *SMN1* 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 k exomovému nebo genomovému 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 v leukocytech periferní krve metodou WB a případně mapovat genetickou lézi pomocí *Alu*-PCR (Majer and Sikora 2021) (**Obr. 13**).



Obr. 13 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.

Autorův příspěvek: Podílela jsem se na izolaci DNA a RNA z leukocytů periferní krve, na přípravě proteinových lyzátů, metodicky na qPCR, WB, analýze cDNA. Dále jsem se podílela na koordinaci studie a na přípravě a psaní publikace.

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 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 sedm 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 jsme provedli **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. 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.

Autorův příspěvek: Podílela jsem se na přípravě vzorků pro sekvenování, na návržení metody pro specifickou amplifikaci *NOTCH2NLC*, na organizaci studie a na přípravě a psaní publikací.

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. Souhrn výsledků

Tato dizertační práce prezentuje využití moderních metod sekvenování a analýzy DNA pro studium molekulární podstaty vzácných neurodegenerativních nemocí. Souhrnnými výsledky dizertační práce s ohledem na její cíle jsou:

- I. Identifikace genetické a molekulární příčiny adultních forem NCL (ANCL):
 - a. Identifikace kauzálních variant u 28 % pacientů zařazených do mezinárodního konzorcia pro ANCL s využitím exomového sekvenování a dalších molekulárně genetických metod. **Příloha 1a, 1b, 1c**
 - b. Identifikace nové varianty v genu *DNAJC5* podmiňující ANCL; objasnění jejího molekulárního mechanismu v podobě chybné lokalizace a snížené palmitoylace mutovaného proteinu CSP α na úrovni tranzientního buněčného modelu, demonstrování tvorby vysokomolekulárních agregátů mutovaného CSP α . **Příloha 1c**

- II. Identifikace nové varianty v genu *SMNI* vedoucí k SMA, rozšíření alelického spektra variant podmiňujících SMA, navržení metodického postupu genetické analýzy u *SMNI* negativních pacientů. **Příloha 2a**

- III. Vyloučení přítomnosti expanze *NOTCH2NLC* pomocí sekvenování s dlouhým čtením u pacienta s iNIID, rozšíření genetické heterogenity NIID. **Příloha 3a, 3b**

6. Diskuse, význam dosažených výsledků

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 konsorcia vedla k odhalení řady alternativních diagnóz. **Pomocí exomového sekvenování a dalších molekulárně genetických technik jsme byli schopni definovat genetickou příčinu ve 28 % 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 strukturní 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 variantou *SMNI*. Tento případ zásadním způsobem demonstruje význam individualizované molekulárně genetické analýzy u pacientů se vzácnými nemocemi.

U pacientky jsme identifikovali **unikátní delecí exonů 2a-5 *SMNI* zprostředkovanou *Alu* elementy**. Doposud byly *Alu* zprostředkované delece *SMNI* 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 *SMNI* (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 *SMNI*. 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 repetic a jejich architektury i u rozsáhlých expandovaných alel a v GC bohatých oblastech (Rhoads and 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**.

7. Seznam publikací, které nejsou součástí 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, Kmoch 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, Houšťek J, Mráček T, Thibeault Y, Bleyer AJ, Kmoch 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, Kmoch 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**

8. Použitá literatura

- Ackerman, S. The Development and Shaping of the Brain. In *Discovering the Brain*. Washington (DC): National Academies Press. 1992, ISBN 0309045290.
- Ambler, Z. Degenerativní choroby. In *Základy neurologie*. Praha: Galén. 2011, s.233. ISBN 978-80-7262-707-3.
- Anderson, G. W., H. H. Goebel, and A. Simonati. 2013. Human pathology in NCL. *Biochim Biophys Acta* 1832 (11):1807-1826.
- Aneichyk, T., W. T. Hendriks, R. Yadav, D. Shin, D. Gao, C. A. Vaine, R. L. Collins, A. Domingo, B. Currall, A. Stortchevoi, T. Multhaupt-Buell, E. B. Penney, L. Cruz, J. Dhakal, H. Brand, C. Hanscom, C. Antolik, M. Dy, A. Ragavendran, J. Underwood, S. Cantsilieris, K. M. Munson, E. E. Eichler, P. Acuna, C. Go, R. D. G. Jamora, R. L. Rosales, D. M. Church, S. R. Williams, S. Garcia, C. Klein, U. Muller, K. C. Wilhelmssen, H. T. M. Timmers, Y. Sapir, B. J. Wainger, D. Henderson, N. Ito, N. Weisenfeld, D. Jaffe, N. Sharma, X. O. Breakefield, L. J. Ozelius, D. C. Bragg, and M. E. Talkowski. 2018. Dissecting the Causal Mechanism of X-Linked Dystonia-Parkinsonism by Integrating Genome and Transcriptome Assembly. *Cell* 172 (5):897-909 e821.
- Applegarth, D. A., J. R. Toone, and R. B. Lowry. 2000. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* 105 (1):e10.
- Aranda-Anzaldo, A., and M. A. R. Dent. 2017. Why Cortical Neurons Cannot Divide, and Why Do They Usually Die in the Attempt? *Journal of Neuroscience Research* 95 (4):921-929.
- Arkblad, E. L., N. Darin, K. Berg, E. Kimber, G. Brandberg, C. Lindberg, E. Holmberg, M. Tulinius, and M. Nordling. 2006. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 16 (12):830-838.
- Arsov, T., K. R. Smith, J. Damiano, S. Franceschetti, L. Canafoglia, C. J. Bromhead, E. Andermann, D. F. Vears, P. Cossette, S. Rajagopalan, A. McDougall, V. Sofia, M. Farrell, U. Aguglia, A. Zini, S. Meletti, M. Morbin, S. Mullen, F. Andermann, S. E. Mole, M. Bahlo, and S. F. Berkovic. 2011. Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6. *Am J Hum Genet* 88 (5):566-573.
- Arzy, S., and S. Danziger. 2014. The science of neuropsychiatry: past, present, and future. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 26 (4):392-395.
- Ash, P. E., K. F. Bieniek, T. F. Gendron, T. Caulfield, W. L. Lin, M. DeJesus-Hernandez, M. M. van Blitterswijk, K. Jansen-West, J. W. Paul, 3rd, R. Rademakers, K. B. Boylan, D. W. Dickson, and L. Petrucelli. 2013. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77 (4):639-646.
- Ashley, E. A. 2016. Towards precision medicine. *Nat Rev Genet* 17 (9):507-522.
- Axente, M., E. S. Shelby, A. Mirea, C. Sporea, M. Badina, L. Padure, and D. A. Ion. 2021. Clinical features and genetics in non-5q spinal muscular atrophy caused by acid ceramidase deficiency. *J Med Life* 14 (3):424-428.
- Bahlo, M., M. F. Bennett, P. Degorski, R. M. Tankard, M. B. Delatycki, and P. J. Lockhart. 2018. Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. *F1000Res* 7.
- Bajaj, L., J. Sharma, A. di Ronza, P. C. Zhang, A. Eblimit, R. Pal, D. Roman, J. R. Collette, C. Booth, K. T. Chang, R. N. Sifers, S. Y. Jung, J. M. Weimer, R. Chen, R. W. Schekman, and M. Sardiello. 2020. A CLN6-CLN8 complex recruits lysosomal

- enzymes at the ER for Golgi transfer. *Journal of Clinical Investigation* 130 (8):4118-4132.
- Banez-Coronel, M., F. Ayhan, A. D. Tarabochia, T. Zu, B. A. Perez, S. K. Tusi, O. Pletnikova, D. R. Borchelt, C. A. Ross, R. L. Margolis, A. T. Yachnis, J. C. Troncoso, and L. P. Ranum. 2015. RAN Translation in Huntington Disease. *Neuron* 88 (4):667-677.
- Baranello, G., B. T. Darras, J. W. Day, N. Deconinck, A. Klein, R. Masson, E. Mercuri, K. Rose, M. El-Khairi, M. Gerber, K. Gorni, O. Khwaja, H. Kletzl, R. S. Scalco, T. Seabrook, P. Fontoura, L. Servais, and F. W. Group. 2021. Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 384 (10):915-923.
- Basak, I., R. A. Hansen, M. E. Ward, and S. M. Hughes. 2021. Deficiency of the Lysosomal Protein CLN5 Alters Lysosomal Function and Movement. *Biomolecules* 11 (10).
- Bekris, L. M., C. E. Yu, T. D. Bird, and D. W. Tsuang. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23 (4):213-227.
- Bell, M. V., M. C. Hirst, Y. Nakahori, R. N. MacKinnon, A. Roche, T. J. Flint, P. A. Jacobs, N. Tommerup, L. Tranebjaerg, U. Froster-Iskenius, and et al. 1991. Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 64 (4):861-866.
- Berkovic, S. F., J. F. Staropoli, S. Carpenter, K. L. Oliver, S. Kmoch, G. W. Anderson, J. A. Damiano, M. S. Hildebrand, K. B. Sims, S. L. Cotman, M. Bahlo, K. R. Smith, M. Cadieux-Dion, P. Cossette, I. Jedlickova, A. Pristoupilova, S. E. Mole, and A. G. D. Consortium. 2016. Diagnosis and misdiagnosis of adult neuronal ceroid lipofuscinosis (Kufs disease). *Neurology* 87 (6):579-584.
- Bernabo, P., T. Tebaldi, E. J. N. Groen, F. M. Lane, E. Perenthaler, F. Mattedi, H. J. Newbery, H. Zhou, P. Zuccotti, V. Potrich, H. K. Shorrock, F. Muntoni, A. Quattrone, T. H. Gillingwater, and G. Viero. 2017. In Vivo Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. *Cell Rep* 21 (4):953-965.
- Boehme, D. H., J. C. Cottrell, S. C. Leonberg, and W. Zeman. 1971. A dominant form of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* 94 (4):745-760.
- Boivin, M., J. W. Deng, V. Pfister, E. Grandgirard, M. Oulad-Abdelghani, B. Morlet, F. Ruffenach, L. Negroni, H. Jacob, F. Riet, A. A. Dijkstra, K. McFadden, W. A. Clayton, D. J. Hong, H. Miyahara, Y. Iwasaki, J. Sone, Z. X. Wang, and N. Charlet-Berguerand. 2021. Translation of GGC repeat expansions into a toxic polyglycine protein in NIID defines a novel class of human genetic disorders: The polyG diseases. *Neuron* 109 (11):1825-+.
- Boldrini, M., C. A. Fulmore, A. N. Tartt, L. R. Simeon, I. Pavlova, V. Poposka, G. B. Rosoklija, A. Stankov, V. Arango, A. J. Dwork, R. Hen, and J. J. Mann. 2018. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22 (4):589-599 e585.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32 (3):314-331.
- Boycott, K. M., M. R. Vanstone, D. E. Bulman, and A. E. MacKenzie. 2013. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet* 14 (10):681-691.
- Bras, J., R. Djaldetti, A. M. Alves, S. Mead, L. Darwent, A. Lleo, J. L. Molinuevo, R. Blesa, A. Singleton, J. Hardy, J. Clarimon, and R. Guerreiro. 2016. Exome sequencing in a consanguineous family clinically diagnosed with early-onset Alzheimer's disease identifies a homozygous CTSF mutation. *Neurobiology of Aging* 46:236 e231-236.

- Bras, J., A. Verloes, S. A. Schneider, S. E. Mole, and R. J. Guerreiro. 2012. Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Human Molecular Genetics* 21 (12):2646-2650.
- Burdick, K. J., J. D. Cogan, L. C. Rives, A. K. Robertson, M. E. Koziura, E. Brokamp, L. Duncan, V. Hannig, J. Pfothenhauer, R. Vanzo, M. S. Paul, A. Bican, T. Morgan, J. Duis, J. H. Newman, R. Hamid, J. A. Phillips, 3rd, and N. Undiagnosed Diseases. 2020. Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A* 182 (6):1400-1406.
- Burgoyne, R. D., and A. Morgan. 2015. Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 40:153-159.
- Calucho, M., S. Bernal, L. Alias, F. March, A. Vencesla, F. J. Rodriguez-Alvarez, E. Aller, R. M. Fernandez, S. Borrego, J. M. Milian, C. Hernandez-Chico, I. Cusco, P. Fuentes-Prior, and E. F. Tizzano. 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 Disorders* 28 (3):208-215.
- Camerucci, E., C. D. Stang, M. Hajeb, P. Turcano, A. F. Mullan, P. Martin, O. A. Ross, J. H. Bower, M. M. Mielke, and R. Savica. 2021. Early-Onset Parkinsonism and Early-Onset Parkinson's Disease: A Population-Based Study (2010-2015). *J Parkinsons Dis* 11 (3):1197-1207.
- Coffey, C. E. 1999. The American Neuropsychiatric Association: ten years of progress and a future of great promise. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 11 (1):8-18.
- Connolly, K. J., M. B. O'Hare, A. Mohammed, K. M. Aitchison, N. C. Anthoney, M. J. Taylor, B. A. Stewart, R. I. Tuxworth, and G. Tear. 2019. The neuronal ceroid lipofuscinosis protein Cln7 functions in the postsynaptic cell to regulate synapse development. *Sci Rep* 9 (1):15592.
- Cotman, S. L., and S. Lefrancois. 2021. CLN3, at the crossroads of endocytic trafficking. *Neuroscience Letters* 762.
- Czibere, L., S. Burggraf, T. Fleige, B. Gluck, L. M. Keitel, O. Landt, J. Durner, W. Roschinger, K. Hohenfellner, B. Wirth, W. Muller-Felber, K. Vill, and M. Becker. 2020. High-throughput genetic newborn screening for spinal muscular atrophy by rapid nucleic acid extraction from dried blood spots and 384-well qPCR. *Eur J Hum Genet* 28 (1):23-30.
- Dangouloff, T., E. Vrscaj, L. Servais, D. Osredkar, and S. N. W. S. Grp. 2021. Newborn screening programs for spinal muscular atrophy worldwide: Where we stand and where to go. *Neuromuscular Disorders* 31 (6):574-582.
- DeJesus-Hernandez, M., I. R. Mackenzie, B. F. Boeve, A. L. Boxer, M. Baker, N. J. Rutherford, A. M. Nicholson, N. A. Finch, H. Flynn, J. Adamson, N. Kouri, A. Wojtas, P. Sengdy, G. Y. Hsiung, A. Karydas, W. W. Seeley, K. A. Josephs, G. Coppola, D. H. Geschwind, Z. K. Wszolek, H. Feldman, D. S. Knopman, R. C. Petersen, B. L. Miller, D. W. Dickson, K. B. Boylan, N. R. Graff-Radford, and R. Rademakers. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72 (2):245-256.
- Deng, H. X., C. J. Klein, J. Yan, Y. Shi, Y. Wu, F. Fecto, H. J. Yau, Y. Yang, H. Zhai, N. Siddique, E. T. Hedley-Whyte, R. Delong, M. Martina, P. J. Dyck, and T. Siddique. 2010. Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nat Genet* 42 (2):165-169.
- Depienne, C., and J. L. Mandel. 2021. 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *American Journal of Human Genetics* 108 (5):764-785.

- Dolzhenko, E., V. Deshpande, F. Schlesinger, P. Krusche, R. Petrovski, S. Chen, D. Emig-Agius, A. Gross, G. Narzisi, B. Bowman, K. Scheffler, J. van Vugt, C. French, A. Sanchis-Juan, K. Ibanez, A. Tucci, B. R. Lajoie, J. H. Veldink, F. L. Raymond, R. J. Taft, D. R. Bentley, and M. A. Eberle. 2019. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics* 35 (22):4754-4756.
- Donis-Keller, H., P. Green, C. Helms, S. Cartinhour, B. Weiffenbach, K. Stephens, T. P. Keith, D. W. Bowden, D. R. Smith, E. S. Lander, and et al. 1987. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51 (2):319-337.
- Ehrlich, M. E., and L. M. Ellerby. 2021. Neuronal intranuclear inclusion disease: Polyglycine protein is the culprit. *Neuron* 109 (11):1757-1760.
- English, A. C., S. Richards, Y. Han, M. Wang, V. Vee, J. Qu, X. Qin, D. M. Muzny, J. G. Reid, K. C. Worley, and R. A. Gibbs. 2012. Mind the gap: upgrading genomes with Pacific Biosciences RS long-read sequencing technology. *PLoS One* 7 (11):e47768.
- Ernst, A., K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, S. Perl, J. Tisdale, G. Possnert, H. Druid, and J. Frisen. 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156 (5):1072-1083.
- Fallini, C., H. Zhang, Y. Su, V. Silani, R. H. Singer, W. Rossoll, and G. J. Bassell. 2011. The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *J Neurosci* 31 (10):3914-3925.
- Fan, J. B., X. Q. Chen, M. K. Halushka, A. Berno, X. H. Huang, T. Ryder, R. J. Lipshutz, D. J. Lockhart, and A. Chakravarti. 2000. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Research* 10 (6):853-860.
- Fan, Y., Y. Xu, and C. Shi. 2021. NOTCH2NLC-related disorders: the widening spectrum and genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*.
- Faviez, C., X. Chen, N. Garcelon, A. Neuraz, B. Knebelmann, R. Salomon, S. Lyonnet, S. Saunier, and A. Burgun. 2020. Diagnosis support systems for rare diseases: a scoping review. *Orphanet J Rare Dis* 15 (1):94.
- Fecto, F., Y. T. Esengul, and T. Siddique. 2014. Protein recycling pathways in neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther* 6 (2):13.
- Fernandez-Chacon, R., M. Wolfel, H. Nishimune, L. Tabares, F. Schmitz, M. Castellano-Munoz, C. Rosenmund, M. L. Montesinos, J. R. Sanes, R. Schneggenburger, and T. C. Sudhof. 2004. The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron* 42 (2):237-251.
- Fogel, B. S., and R. B. Schiffer. 1989. Defining neuropsychiatry: professional activities and opinions of psychiatrist-neurologists with dual certification. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1 (2):173-175.
- Gass, J., W. C. Lee, C. Cook, N. Finch, C. Stetler, K. Jansen-West, J. Lewis, C. D. Link, R. Rademakers, A. Nykjaer, and L. Petrucelli. 2012. Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Mol Neurodegener* 7:33.
- Genin, E. C., M. Plutino, S. Bannwarth, E. Villa, E. Cisneros-Barroso, M. Roy, B. Ortega-Vila, K. Fragaki, F. Lespinasse, E. Pinero-Martos, G. Auge, D. Moore, F. Burte, S. Lacas-Gervais, Y. Kageyama, K. Itoh, P. Yu-Wai-Man, H. Sesaki, J. E. Ricci, C. Vives-Bauza, and V. Paquis-Flucklinger. 2016. CHCHD10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol Med* 8 (1):58-72.
- Genomes Project, C., G. R. Abecasis, D. Altshuler, A. Auton, L. D. Brooks, R. M. Durbin, R. A. Gibbs, M. E. Hurles, and G. A. McVean. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467 (7319):1061-1073.

- Gijssels, I., C. Van Broeckhoven, and M. Cruts. 2008. Granulin mutations associated with frontotemporal lobar degeneration and related disorders: an update. *Hum Mutat* 29 (12):1373-1386.
- Gilissen, C., J. Y. Hehir-Kwa, D. T. Thung, M. van de Vorst, B. W. van Bon, M. H. Willemsen, M. Kwint, I. M. Janssen, A. Hoischen, A. Schenck, R. Leach, R. Klein, R. Tearle, T. Bo, R. Pfundt, H. G. Yntema, B. B. de Vries, T. Kleefstra, H. G. Brunner, L. E. Vissers, and J. A. Veltman. 2014. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511 (7509):344-347.
- Glineburg, M. R., P. K. Todd, N. Charlet-Berguerand, and C. Sellier. 2018. Repeat-associated non-AUG (RAN) translation and other molecular mechanisms in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Brain Res* 1693 (Pt A):43-54.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349 (6311):704-706.
- Goldmann, J. M., J. A. Veltman, and C. Gilissen. 2019. De Novo Mutations Reflect Development and Aging of the Human Germline. *Trends Genet* 35 (11):828-839.
- Grandi, F. C., and W. An. 2013. Non-LTR retrotransposons and microsatellites: Partners in genomic variation. *Mob Genet Elements* 3 (4):e25674.
- Groen, E. J. N., and T. H. Gilligwater. 2015. UBA1: At the Crossroads of Ubiquitin Homeostasis and Neurodegeneration. *Trends in Molecular Medicine* 21 (10):622-632.
- Gropman, A. L., M. Prust, A. Breeden, S. Fricke, and J. VanMeter. 2013. Urea cycle defects and hyperammonemia: effects on functional imaging. *Metab Brain Dis* 28 (2):269-275.
- Guerreiro, R. J., E. Lohmann, E. Kinsella, J. M. Bras, N. Luu, N. Gurunlian, B. Dursun, B. Bilgic, I. Santana, H. Hanagasi, H. Gurvit, J. R. Gibbs, C. Oliveira, M. Emre, and A. Singleton. 2012. Exome sequencing reveals an unexpected genetic cause of disease: NOTCH3 mutation in a Turkish family with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 33 (5).
- Gundersen, C. B., J. A. Umbach, and A. Mastrogiacomo. 1996. Cysteine-string proteins: a cycle of acylation and deacylation? *Life Sci* 58 (22):2037-2040.
- Guo, W., K. Stoklund Dittlau, and L. Van Den Bosch. 2020. Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cell Dev Biol* 99:133-150.
- Gusella, J. F., N. S. Wexler, P. M. Conneally, S. L. Naylor, M. A. Anderson, R. E. Tanzi, P. C. Watkins, K. Ottina, M. R. Wallace, A. Y. Sakaguchi, and et al. 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306 (5940):234-238.
- Haltia, M. 2006. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present. *Biochim Biophys Acta* 1762 (10):850-856.
- Haltia, M., and H. H. Goebel. 2013. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: a historical introduction. *Biochim Biophys Acta* 1832 (11):1795-1800.
- Haltia, M., H. Somer, J. Palo, and W. G. Johnson. 1984. Neuronal intranuclear inclusion disease in identical twins. *Ann Neurol* 15 (4):316-321.
- Harms, M. B., P. Allred, R. Gardner, Jr., J. A. Fernandes Filho, J. Florence, A. Pestronk, M. Al-Lozi, and R. H. Baloh. 2010. Dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance: linkage to 14q32. *Neurology* 75 (6):539-546.
- Hart, S. N., V. Sarangi, R. Moore, S. Baheti, J. D. Bhavsar, F. J. Couch, and J. P. Kocher. 2013. SoftSearch: integration of multiple sequence features to identify breakpoints of structural variations. *PLoS One* 8 (12):e83356.

- He, Z., and A. Bateman. 2003. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)* 81 (10):600-612.
- Hoang, H. T., M. A. Schlager, A. P. Carter, and S. L. Bullock. 2017. DYNC1H1 mutations associated with neurological diseases compromise processivity of dynein-dynactin-cargo adaptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (9):E1597-E1606.
- Hood, L., and L. Rowen. 2013. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med* 5 (9):79.
- Hoy, S. M. 2019. Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval. *Drugs* 79 (11):1255-1262.
- Hsiao, K., H. F. Baker, T. J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J. D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott, and S. B. Prusiner. 1989. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338 (6213):342-345.
- Hubbard, T., D. Barker, E. Birney, G. Cameron, Y. Chen, L. Clark, T. Cox, J. Cuff, V. Curwen, T. Down, R. Durbin, E. Eyras, J. Gilbert, M. Hammond, L. Huminiecki, A. Kasprzyk, H. Lehvaslaiho, P. Lijnzaad, C. Melsopp, E. Mongin, R. Pettett, M. Pocock, S. Potter, A. Rust, E. Schmidt, S. Searle, G. Slater, J. Smith, W. Spooner, A. Stabenau, J. Stalker, E. Stupka, A. Ureta-Vidal, I. Vastrik, and M. Clamp. 2002. The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res* 30 (1):38-41.
- Hung, C., E. Tuck, V. Stubbs, S. J. van der Lee, C. Aalfs, R. van Spaendonk, P. Scheltens, J. Hardy, H. Holstege, and F. J. Livesey. 2021. SORL1 deficiency in human excitatory neurons causes APP-dependent defects in the endolysosome-autophagy network. *Cell Rep* 35 (11):109259.
- Chamberlain, L. H., and R. D. Burgoyne. 1998. The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting. *Biochemical Journal* 335:205-209.
- Chartier-Harlin, M. C., J. C. Dachsel, C. Vilarino-Guell, S. J. Lincoln, F. Lefretre, M. M. Hulihan, J. Kachergus, A. J. Milnerwood, L. Tapia, M. S. Song, E. Le Rhun, E. Mutez, L. Larvor, A. Duflot, C. Vanbesien-Mailliot, A. Kreisler, O. A. Ross, K. Nishioka, A. I. Soto-Ortolaza, S. A. Cobb, H. L. Melrose, B. Behrouz, B. H. Keeling, J. A. Bacon, E. Hentati, L. Williams, A. Yanagiya, N. Sonenberg, P. J. Lockhart, A. C. Zubair, R. J. Uitti, J. O. Aasly, A. Krygowska-Wajs, G. Opala, Z. K. Wszolek, R. Frigerio, D. M. Maraganore, D. Gosal, T. Lynch, M. Hutchinson, A. R. Bentivoglio, E. M. Valente, W. C. Nichols, N. Pankratz, T. Foroud, R. A. Gibson, F. Hentati, D. W. Dickson, A. Destee, and M. J. Farrer. 2011. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89 (3):398-406.
- Chen, P., M. R. Miah, and M. Aschner. 2016. Metals and Neurodegeneration. *F1000Res* 5.
- Chiriboga, C. A., K. J. Swoboda, B. T. Darras, S. T. Iannaccone, J. Montes, D. C. De Vivo, D. A. Norris, C. F. Bennett, and K. M. Bishop. 2016. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* 86 (10):890-897.
- Choi, M., U. I. Scholl, W. Ji, T. Liu, I. R. Tikhonova, P. Zumbo, A. Nayir, A. Bakkaloglu, S. Ozen, S. Sanjad, C. Nelson-Williams, A. Farhi, S. Mane, and R. P. Lifton. 2009. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (45):19096-19101.
- International HapMap, C. 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426 (6968):789-796.
- Ishiguro, T., Y. Nagai, and K. Ishikawa. 2021. Insight Into Spinocerebellar Ataxia Type 31 (SCA31) From Drosophila Model. *Frontiers in Neuroscience* 15.

- Ishiura, H., S. Shibata, J. Yoshimura, Y. Suzuki, W. Qu, K. Doi, M. A. Almansour, J. K. Kikuchi, M. Taira, J. Mitsui, Y. Takahashi, Y. Ichikawa, T. Mano, A. Iwata, Y. Harigaya, M. K. Matsukawa, T. Matsukawa, M. Tanaka, Y. Shirota, R. Ohtomo, H. Kowa, H. Date, A. Mitsue, H. Hatsuta, S. Morimoto, S. Murayama, Y. Shiio, Y. Saito, A. Mitsutake, M. Kawai, T. Sasaki, Y. Sugiyama, M. Hamada, G. Ohtomo, Y. Terao, Y. Nakazato, A. Takeda, Y. Sakiyama, Y. Umeda-Kameyama, J. Shinmi, K. Ogata, Y. Kohno, S. Y. Lim, A. H. Tan, J. Shimizu, J. Goto, I. Nishino, T. Toda, S. Morishita, and S. Tsuji. 2019. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet* 51 (8):1222-1232.
- Jain, M., H. E. Olsen, B. Paten, and M. Akeson. 2016. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* 17 (1):239.
- Jedlickova, I., M. Cadieux-Dion, A. Pristoupilova, V. Stranecky, H. Hartmannova, K. Hodanova, V. Baresova, H. Hulkova, J. Sikora, L. Noskova, D. Musalkova, P. Vyletal, J. Sovova, P. Cossette, E. Andermann, F. Andermann, S. Kmoch, and N. C. L. G. D. C. Adult. 2020a. 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.
- Jedlickova, I., A. Pristoupilova, L. Noskova, F. Majer, V. Stranecky, H. Hartmannova, K. Hodanova, H. Treslova, M. Hyblova, P. Solar, G. Minarik, M. Giertlova, and S. Kmoch. 2020b. 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.
- Jiao, B., L. Zhou, Y. Zhou, L. Weng, X. Liao, Y. Tian, L. Guo, X. Liu, Z. Yuan, X. Xiao, Y. Jiang, X. Wang, Q. Yang, C. Li, Y. Zhu, L. Zhou, W. Zhang, J. Wang, Y. Li, W. Gu, J. Yang, J. Xia, Q. Huang, J. Yin, J. Xue, R. Duan, B. Tang, and L. Shen. 2020. Identification of expanded repeats in NOTCH2NLC in neurodegenerative dementias. *Neurobiology of Aging* 89:142 e141-142 e147.
- Johnson, J. O., J. Mandrioli, M. Benatar, Y. Abramzon, V. M. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski, J. R. Gibbs, M. Brunetti, S. Gronka, J. Wu, J. H. Ding, L. McCluskey, M. Martinez-Lage, D. Falcone, D. G. Hernandez, S. Arepalli, S. Chong, J. C. Schymick, J. Rothstein, F. Landi, Y. D. Wang, A. Calvo, G. Mora, M. Sabatelli, M. R. Monsurro, S. Battistini, F. Salvi, R. Spataro, P. Sola, G. Borghero, G. Galassi, S. W. Scholz, J. P. Taylor, G. Restagno, A. Chio, B. J. Traynor, and I. Consortium. 2010. Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. *Neuron* 68 (5):857-864.
- Johnson, T. B., J. T. Cain, K. A. White, D. Ramirez-Montealegre, D. A. Pearce, and J. M. Weimer. 2019. Therapeutic landscape for Batten disease: current treatments and future prospects. *Nat Rev Neurol* 15 (3):161-178.
- Joosten, I. B. T., D. Hellebrekers, B. T. A. de Greef, H. J. M. Smeets, C. E. M. de Die-Smulders, C. G. Faber, and M. M. Gerrits. 2020. Parental repeat length instability in myotonic dystrophy type 1 pre- and protomutations. *Eur J Hum Genet* 28 (7):956-962.
- Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, A. Mankodi, C. Lungu, C. A. Thornton, D. Esson, A. M. Timmers, W. W. Hauswirth, and M. S. Swanson. 2003. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302 (5652):1978-1980.
- Karczewski, K. J., L. C. Francioli, G. Tiao, B. B. Cummings, J. Alfoldi, Q. Wang, R. L. Collins, K. M. Laricchia, A. Ganna, D. P. Birnbaum, L. D. Gauthier, H. Brand, M. Solomonson, N. A. Watts, D. Rhodes, M. Singer-Berk, E. M. England, E. G. Seaby, J. A. Kosmicki, R. K. Walters, K. Tashman, Y. Farjoun, E. Banks, T. Poterba, A. Wang,

- C. Seed, N. Whiffin, J. X. Chong, K. E. Samocha, E. Pierce-Hoffman, Z. Zappala, A. H. O'Donnell-Luria, E. V. Minikel, B. Weisburd, M. Lek, J. S. Ware, C. Vittal, I. M. Armean, L. Bergelson, K. Cibulskis, K. M. Connolly, M. Covarrubias, S. Donnelly, S. Ferreira, S. Gabriel, J. Gentry, N. Gupta, T. Jeandet, D. Kaplan, C. Llanwarne, R. Munshi, S. Novod, N. Petrillo, D. Roazen, V. Ruano-Rubio, A. Saltzman, M. Schleicher, J. Soto, K. Tibbetts, C. Tolonen, G. Wade, M. E. Talkowski, C. Genome Aggregation Database, B. M. Neale, M. J. Daly, and D. G. MacArthur. 2020. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581 (7809):434-443.
- Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler, and D. Haussler. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Research* 12 (6):996-1006.
- Kim, A., A. Grover, K. Hammon, G. de Hart, P. Slasor, A. Cherukuri, T. Ajayi, D. Jacoby, A. Schulz, N. Specchio, E. de Los Reyes, P. Gissen, and J. W. Henshaw. 2021. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cerliponase Alfa, Enzyme Replacement Therapy for CLN2 Disease by Intracerebroventricular Administration. *Clin Transl Sci* 14 (2):635-644.
- Kimber, T. E., P. C. Blumbergs, J. P. Rice, J. F. Hallpike, R. Edis, P. D. Thompson, and G. Suthers. 1998. Familial neuronal intranuclear inclusion disease with ubiquitin positive inclusions. *J Neurol Sci* 160 (1):33-40.
- Knierim, E., H. Hirata, N. I. Wolf, S. Morales-Gonzalez, G. Schottmann, Y. Tanaka, S. Rudnik-Schoneborn, M. Orgeur, K. Zerres, S. Vogt, A. van Riesen, E. Gill, F. Seifert, A. Zwirner, J. Kirschner, H. H. Goebel, C. Hubner, S. Stricker, D. Meierhofer, W. Stenzel, and M. Schuelke. 2016. Mutations in Subunits of the Activating Signal Cointegrator 1 Complex Are Associated with Prenatal Spinal Muscular Atrophy and Congenital Bone Fractures. *Am J Hum Genet* 98 (3):473-489.
- Koliatsos, V. E., R. Wisner-Carlson, and C. Watkins. 2020. Neuropsychiatry: Definitions, Concepts, and Patient Types. *Psychiatr Clin North Am* 43 (2):213-227.
- Konopka, R. J., and S. Benzer. 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (9):2112-2116.
- Kremer, E. J., M. Pritchard, M. Lynch, S. Yu, K. Holman, E. Baker, S. T. Warren, D. Schlessinger, G. R. Sutherland, and R. I. Richards. 1991. Mapping of DNA Instability at the Fragile-X to a Trinucleotide Repeat Sequence P(Ccg)N. *Science* 252 (5013):1711-1714.
- Kufs, H. F. 1925. Über eine Spätform der amaurotischen Idiotie und ihre heredofamiliären Grundlagen. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* (95):169-188.
- Kumar, A., V. Pareek, M. A. Faiq, S. K. Ghosh, and C. Kumari. 2019. ADULT NEUROGENESIS IN HUMANS: A Review of Basic Concepts, History, Current Research, and Clinical Implications. *Innov Clin Neurosci* 16 (5-6):30-37.
- Lacroix, A. J., D. Stabley, R. Sahraoui, M. P. Adam, M. Mehaffey, K. Kernan, C. T. Myers, C. Fagerstrom, G. Anadiotis, Y. M. Akkari, K. M. Robbins, K. W. Gripp, W. A. Baratela, M. B. Bober, A. L. Duker, D. Doherty, J. C. Dempsey, D. G. Miller, M. Kircher, M. J. Bamshad, D. A. Nickerson, H. C. Mefford, K. Sol-Church, and U. W. C. M. Geno. 2019. GGC Repeat Expansion and Exon 1 Methylation of XYLT1 Is a Common Pathogenic Variant in Baratela-Scott Syndrome. *American Journal of Human Genetics* 104 (1):35-44.
- Lanciotti, A., M. S. Brignone, P. Molinari, S. Visentin, C. De Nuccio, G. Macchia, C. Aiello, E. Bertini, F. Aloisi, T. C. Petrucci, and E. Ambrosini. 2012. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts protein 1 functionally cooperates with the TRPV4 cation channel to activate the response of astrocytes to osmotic stress:

- dysregulation by pathological mutations. *Human Molecular Genetics* 21 (10):2166-2180.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, J. Szustakowki, and C. International Human Genome Sequencing. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822):860-921.
- Lauria, F., P. Bernabo, T. Tebaldi, E. J. N. Groen, E. Perenthaler, F. Maniscalco, A. Rossi, D. Donzel, M. Clamer, M. Marchioretto, N. Omersa, J. Orri, M. Dalla Serra, G. Anderluh, A. Quattrone, A. Inga, T. H. Gillingwater, and G. Viero. 2020. SMN-primed ribosomes modulate the translation of transcripts related to spinal muscular atrophy. *Nat Cell Biol* 22 (10):1239-1251.
- Leder, A., H. I. Miller, D. H. Hamer, J. G. Seidman, B. Norman, M. Sullivan, and P. Leder. 1978. Comparison of cloned mouse alpha- and beta-globin genes: conservation of

- intervening sequence locations and extragenic homology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (12):6187-6191.
- Lee, C. W., J. N. Stankowski, J. Chew, C. N. Cook, Y. W. Lam, S. Almeida, Y. Carlomagno, K. F. Lau, M. Prudencio, F. B. Gao, M. Bogyo, D. W. Dickson, and L. Petrucelli. 2017a. The lysosomal protein cathepsin L is a progranulin protease. *Molecular Neurodegeneration* 12.
- Lee, D., T. H. Huang, A. De La Cruz, A. Callejas, and C. Lois. 2017b. Methods to investigate the structure and connectivity of the nervous system. *Fly (Austin)* 11 (3):224-238.
- Lee, J. J. Y., W. W. Wasserman, G. F. Hoffmann, C. D. M. van Karnebeek, and N. Blau. 2018. Knowledge base and mini-expert platform for the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Genet Med* 20 (1):151-158.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burllet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani, and et al. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80 (1):155-165.
- Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang, and et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269 (5226):973-977.
- Lindberg, I., J. Shorter, R. L. Wiseman, F. Chiti, C. A. Dickey, and P. J. McLean. 2015. Chaperones in Neurodegeneration. *J Neurosci* 35 (41):13853-13859.
- Liu, Q., and G. Dreyfuss. 1996. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 15 (14):3555-3565.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang, and G. Dreyfuss. 1997. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 90 (6):1013-1021.
- Lonka, L., A. Kytala, S. Ranta, A. Jalanko, and A. E. Lehesjoki. 2000. The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum. *Human Molecular Genetics* 9 (11):1691-1697.
- Lorson, C. L., E. Hahnen, E. J. Androphy, and B. Wirth. 1999. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11):6307-6311.
- Lupski, J. R., J. G. Reid, C. Gonzaga-Jauregui, D. Rio Deiros, D. C. Chen, L. Nazareth, M. Bainbridge, H. Dinh, C. Jing, D. A. Wheeler, A. L. McGuire, F. Zhang, P. Stankiewicz, J. J. Halperin, C. Yang, C. Gehman, D. Guo, R. K. Irikat, W. Tom, N. J. Fantin, D. M. Muzny, and R. A. Gibbs. 2010. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 362 (13):1181-1191.
- Lyketsos, C. G., N. Kozauer, and P. V. Rabins. 2007. Psychiatric manifestations of neurologic disease: where are we headed? *Dialogues Clin Neurosci* 9 (2):111-124.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, and et al. 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255 (5049):1253-1255.
- Majer, F., and J. Sikora. 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., S. Nassani, Y. Guo, Y. Chen, E. Giorgio, A. Brussino, E. Di Gregorio, S. Cavalieri, N. Lo Buono, A. Funaro, N. R. Pizio, B. Nmezi, A. Kytala, F. M. Santorelli, Q. S. Padiath, H. Hakonarson, H. Zhang, and A. Brusco. 2015. Adult-onset autosomal recessive ataxia associated with neuronal ceroid lipofuscinosis type 5 gene (CLN5) mutations. *J Neurol* 262 (1):173-178.

- Mantere, T., S. Kersten, and A. Hoischen. 2019. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet* 10:426.
- Markham, A. 2017. Cerliponase Alfa: First Global Approval. *Drugs* 77 (11):1247-1249.
- Mattioli, F., G. Hayot, N. Drouot, B. Isidor, J. Courraud, M. V. Hinckelmann, F. T. Mau-Them, C. Sellier, A. Goldman, A. Telegrafi, A. Boughton, C. Gamble, S. Moutton, A. Quartier, N. Jean, P. Van Ness, S. Grotto, S. Nambot, G. Douglas, Y. C. Si, J. Chelly, Z. Shad, E. Kaplan, R. Dineen, C. Golzio, N. Charlet-Berguerand, J. L. Mandel, and A. Piton. 2020. De Novo Frameshift Variants in the Neuronal Splicing Factor NOVA2 Result in a Common C-Terminal Extension and Cause a Severe Form of Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet* 106 (4):438-452.
- Mayeux, R., and Y. Stern. 2012. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (8).
- Melki, J., P. Sheth, S. Abdelhak, P. Burlet, M. F. Bachelot, M. G. Lathrop, J. Frezal, and A. Munnich. 1990. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 336 (8710):271-273.
- Metz, K. A., X. Teng, I. Coppens, H. M. Lamb, B. E. Wagner, J. A. Rosenfeld, X. Chen, Y. Zhang, H. J. Kim, M. E. Meadow, T. S. Wang, E. D. Haberlandt, G. W. Anderson, E. Leshinsky-Silver, W. Bi, T. C. Markello, M. Pratt, N. Makhseed, A. Garnica, N. R. Danylchuk, T. A. Burrow, P. Jayakar, D. McKnight, S. Agadi, H. Gbedawo, C. Stanley, M. Alber, I. Prehl, K. Peariso, M. T. Ong, S. R. Mordekar, M. J. Parker, D. Crooks, P. B. Agrawal, G. T. Berry, T. Loddenkemper, Y. Yang, G. H. B. Maegawa, A. Aouacheria, J. G. Markle, J. A. Wohlschlegel, A. L. Hartman, and J. M. Hardwick. 2018. KCTD7 deficiency defines a distinct neurodegenerative disorder with a conserved autophagy-lysosome defect. *Ann Neurol* 84 (5):766-780.
- Miao, H., J. Zhou, Q. Yang, F. Liang, D. Wang, N. Ma, B. Gao, J. Du, G. Lin, K. Wang, and Q. Zhang. 2018. Long-read sequencing identified a causal structural variant in an exome-negative case and enabled preimplantation genetic diagnosis. *Hereditas* 155:32.
- Mole, S. E., and S. L. Cotman. 2015. Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochim Biophys Acta* 1852 (10 Pt B):2237-2241.
- Moliner, A. M., and J. Waligora. 2017. The European Union Policy in the Field of Rare Diseases. *Adv Exp Med Biol* 1031:561-587.
- Monzio Compagnoni, G., A. Di Fonzo, S. Corti, G. P. Comi, N. Bresolin, and E. Masliah. 2020. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 57 (7):2959-2980.
- Moore, S. J., D. J. Buckley, A. MacMillan, H. D. Marshall, L. Steele, P. N. Ray, Z. Nawaz, B. Baskin, M. Frecker, S. M. Carr, E. Ives, and P. S. Parfrey. 2008. The clinical and genetic epidemiology of neuronal ceroid lipofuscinosis in Newfoundland. *Clin Genet* 74 (3):213-222.
- Moreno-Jimenez, E. P., M. Flor-Garcia, J. Terreros-Roncal, A. Rabano, F. Cafini, N. Pallas-Bazarra, J. Avila, and M. Llorens-Martin. 2019. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 25 (4):554-+.
- Morfini, G. A., M. Burns, L. I. Binder, N. M. Kanaan, N. LaPointe, D. A. Bosco, R. H. Brown, Jr., H. Brown, A. Tiwari, L. Hayward, J. Edgar, K. A. Nave, J. Garber, Y. Atagi, Y. Song, G. Pigino, and S. T. Brady. 2009. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci* 29 (41):12776-12786.

- Moussaud, S., D. R. Jones, E. L. Moussaud-Lamodièrre, M. Delenclos, O. A. Ross, and P. J. McLean. 2014. Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Mol Neurodegener* 9:43.
- Mukherjee, A. B., A. P. Appu, T. Sadhukhan, S. Casey, A. Mondal, Z. Zhang, and M. B. Bagh. 2019. Emerging new roles of the lysosome and neuronal ceroid lipofuscinoses. *Mol Neurodegener* 14 (1):4.
- Naseri, N. N., B. Ergel, P. Kharel, Y. Na, Q. Huang, R. Huang, N. Dolzhanskaya, J. Burre, M. T. Velinov, and M. Sharma. 2020. Aggregation of mutant cysteine string protein-alpha via Fe-S cluster binding is mitigated by iron chelators. *Nat Struct Mol Biol* 27 (2):192-201.
- Ng, S. B., K. J. Buckingham, C. Lee, A. W. Bigham, H. K. Tabor, K. M. Dent, C. D. Huff, P. T. Shannon, E. W. Jabs, D. A. Nickerson, J. Shendure, and M. J. Bamshad. 2010. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42 (1):30-35.
- Ng, S. B., E. H. Turner, P. D. Robertson, S. D. Flygare, A. W. Bigham, C. Lee, T. Shaffer, M. Wong, A. Bhattacharjee, E. E. Eichler, M. Bamshad, D. A. Nickerson, and J. Shendure. 2009. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 461 (7261):272-276.
- Nguengang Wakap, S., D. M. Lambert, A. Olry, C. Rodwell, C. Gueydan, V. Lanneau, D. Murphy, Y. Le Cam, and A. Rath. 2020. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet* 28 (2):165-173.
- Nolin, S. L., A. Glicksman, N. Tortora, E. Allen, J. Macpherson, M. Mila, A. M. Vianna-Morgante, S. L. Sherman, C. Dobkin, G. J. Latham, and A. G. Hadd. 2019. Expansions and contractions of the FMR1 CGG repeat in 5,508 transmissions of normal, intermediate, and premutation alleles. *Am J Med Genet A* 179 (7):1148-1156.
- Noskova, L., V. Stranecky, H. Hartmannova, A. Pristoupilova, V. Baresova, R. Ivanek, H. Hulkova, H. Jahnova, J. van der Zee, J. F. Staropoli, K. B. Sims, J. Tynnela, C. Van Broeckhoven, P. C. Nijssen, S. E. Mole, M. Elleder, and S. Kmoch. 2011. Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet* 89 (2):241-252.
- Olloquequi, J., E. Cornejo-Cordova, E. Verdager, F. X. Soriano, O. Binvignat, C. Auladell, and A. Camins. 2018. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *J Psychopharmacol* 32 (3):265-275.
- Oprea, G. E., S. Kroeber, M. L. McWhorter, W. Rossoll, S. Mueller, M. Krawczak, G. J. Bassell, C. E. Beattie, and B. Wirth. 2008. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320 (5875):524-527.
- Orr, H. T., M. Y. Chung, S. Banfi, T. J. Kwiatkowski, Jr., A. Servadio, A. L. Beaudet, A. E. McCall, L. A. Duvick, L. P. Ranum, and H. Y. Zoghbi. 1993. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4 (3):221-226.
- Palpagama, T. H., H. J. Waldvogel, R. L. M. Faull, and A. Kwakowsky. 2019. The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Front Mol Neurosci* 12:258.
- Parsons, D. W., P. E. McAndrew, S. T. Iannaccone, J. R. Mendell, A. H. Burghes, and T. W. Prior. 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 (6):1712-1723.
- Peeters, K., T. Chamova, and A. Jordanova. 2014. Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain* 137 (Pt 11):2879-2896.
- Penttila, S., M. Jokela, P. Hackman, A. M. Saukkonen, J. Toivanen, and B. Udd. 2012. Autosomal dominant late-onset spinal motor neuronopathy is linked to a new locus on

- chromosome 22q11.2-q13.2. *European Journal of Human Genetics* 20 (11):1193-1196.
- Pinkas, D. M., C. E. Sanvitale, J. C. Bufton, F. J. Sorrell, N. Solcan, R. Chalk, J. Douch, and A. N. Bullock. 2017. Structural complexity in the KCTD family of Cullin3-dependent E3 ubiquitin ligases. *Biochemical Journal* 474 (22):3747-3761.
- Pinto, W., P. V. S. Souza, B. M. L. Badia, I. B. Farias, J. M. V. Albuquerque Filho, E. A. Goncalves, R. I. L. Machado, and A. S. B. Oliveira. 2021. Adult-onset non-5q proximal spinal muscular atrophy: a comprehensive review. *Arq Neuropsiquiatr* 79 (10):912-923.
- Prior, T. W., A. R. Krainer, Y. Hua, K. J. Swoboda, P. C. Snyder, S. J. Bridgeman, A. H. Burghes, and J. T. Kissel. 2009. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am J Hum Genet* 85 (3):408-413.
- Prior, T. W., K. J. Swoboda, H. D. Scott, and A. Q. Hejmanowski. 2004. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet A* 130A (3):307-310.
- Przedborski, S., M. Vila, and V. Jackson-Lewis. 2003. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* 111 (1):3-10.
- Ramser, J., M. E. Ahearn, C. Lenski, K. O. Yariz, H. Hellebrand, M. von Rhein, R. D. Clark, R. K. Schmutzler, P. Lichtner, E. P. Hoffman, A. Meindl, and L. Baumbach-Reardon. 2008. Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 82 (1):188-193.
- Rastall, D. P., and A. Amalfitano. 2015. Recent advances in gene therapy for lysosomal storage disorders. *Appl Clin Genet* 8:157-169.
- Rhoads, A., and K. F. Au. 2015. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics & Bioinformatics* 13 (5):278-289.
- Rusina R., Matěj R. a. k. 2019. Neurodegenerativní onemocnění. Mladá fronta a.s., s. 27-31. ISBN 978-80-204-5123-1.
- Robinson, J. T., H. Thorvaldsdottir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz, and J. P. Mesirov. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29 (1):24-26.
- Sanderson, S., A. Green, M. A. Preece, and H. Burton. 2006. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child* 91 (11):896-899.
- Saudubray, J. M., and A. Garcia-Cazorla. 2018. An overview of inborn errors of metabolism affecting the brain: from neurodevelopment to neurodegenerative disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 20 (4):301-325.
- Savukoski, M., T. Klockars, V. Holmberg, P. Santavuori, E. S. Lander, and L. Peltonen. 1998. CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nat Genet* 19 (3):286-288.
- Scarciolla, O., L. Stuppia, M. V. De Angelis, S. Murru, C. Palka, R. Giuliani, M. Pace, A. Di Muzio, I. Torrente, A. Morella, P. Grammatico, M. Giacanelli, M. C. Rosatelli, A. Uncini, and B. Dallapiccola. 2006. Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics* 7 (4):269-276.
- Sedel, F., N. Baumann, J. C. Turpin, O. Lyon-Caen, J. M. Saudubray, and D. Cohen. 2007. Psychiatric manifestations revealing inborn errors of metabolism in adolescents and adults. *J Inherit Metab Dis* 30 (5):631-641.
- Sharp, J. D., R. B. Wheeler, B. D. Lake, M. Savukoski, I. E. Jarvela, L. Peltonen, R. M. Gardiner, and R. E. Williams. 1997. Loci for classical and a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis map to chromosomes 11p15 and 15q21-23. *Human Molecular Genetics* 6 (4):591-595.

- Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens, and P. H. St George-Hyslop. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375 (6534):754-760.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235):467-470.
- Siintola, E., S. Partanen, P. Stromme, A. Haapanen, M. Haltia, J. Maehlen, A. E. Lehesjoki, and J. Tyynela. 2006. Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* 129 (Pt 6):1438-1445.
- Siintola, E., M. Topcu, N. Aula, H. Lohi, B. A. Minassian, A. D. Paterson, X. Q. Liu, C. Wilson, U. Lahtinen, A. K. Anttonen, and A. E. Lehesjoki. 2007. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *Am J Hum Genet* 81 (1):136-146.
- Sikora, J., I. Jedlickova, A. Pristoupilova, V. Stranecky, and T. Honzik. 2021. Genetic heterogeneity of neuronal intranuclear inclusion disease: What about the infantile variant? *Annals of Clinical and Translational Neurology* 8 (4):994-1001.
- Silva, T. Y. T., J. L. Pedroso, M. C. Franca Junior, and O. G. P. Barsottini. 2021. A journey through the history of Neurogenetics. *Arq Neuropsiquiatr* 79 (10):929-932.
- Sim, S. I., S. von Bulow, G. Hummer, and E. Park. 2021. Structural basis of polyamine transport by human ATP13A2 (PARK9). *Mol Cell* 81 (22):4635-4649 e4638.
- Sleat, D. E., R. J. Donnelly, H. Lackland, C. G. Liu, I. Sohar, R. K. Pullarkat, and P. Lobel. 1997. Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277 (5333):1802-1805.
- Smith, K. R., J. Damiano, S. Franceschetti, S. Carpenter, L. Canafoglia, M. Morbin, G. Rossi, D. Pareyson, S. E. Mole, J. F. Staropoli, K. B. Sims, J. Lewis, W. L. Lin, D. W. Dickson, H. H. Dahl, M. Bahlo, and S. F. Berkovic. 2012. Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am J Hum Genet* 90 (6):1102-1107.
- Sone, J., N. Hishikawa, H. Koike, N. Hattori, M. Hirayama, M. Nagamatsu, M. Yamamoto, F. Tanaka, M. Yoshida, Y. Hashizume, H. Imamura, E. Yamada, and G. Sobue. 2005. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease showing motor-sensory and autonomic neuropathy. *Neurology* 65 (10):1538-1543.
- Sone, J., S. Mitsuhashi, A. Fujita, T. Mizuguchi, K. Hamanaka, K. Mori, H. Koike, A. Hashiguchi, H. Takashima, H. Sugiyama, Y. Kohno, Y. Takiyama, K. Maeda, H. Doi, S. Koyano, H. Takeuchi, M. Kawamoto, N. Kohara, T. Ando, T. Ieda, Y. Kita, N. Kokubun, Y. Tsuboi, K. Katoh, Y. Kino, M. Katsuno, Y. Iwasaki, M. Yoshida, F. Tanaka, I. K. Suzuki, M. C. Frith, N. Matsumoto, and G. Sobue. 2019. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet* 51 (8):1215-1221.
- Staropoli, J. F., A. Karaa, E. T. Lim, A. Kirby, N. Elbalalesy, S. G. Romansky, K. B. Leydiker, S. H. Coppel, R. Barone, W. Xin, M. E. MacDonald, J. E. Abdenur, M. J. Daly, K. B. Sims, and S. L. Cotman. 2012. A homozygous mutation in KCTD7 links neuronal ceroid lipofuscinosis to the ubiquitin-proteasome system. *Am J Hum Genet* 91 (1):202-208.

- Su, Y., L. Y. Fan, C. H. Shi, T. Wang, H. M. Zheng, H. Y. Luo, S. Zhang, Z. W. Hu, Y. Fan, Y. L. Dong, J. Yang, C. Y. Mao, and Y. M. Xu. 2021. Deciphering Neurodegenerative Diseases Using Long-Read Sequencing. *Neurology* 97 (9):423-433.
- Swinnen, B., W. Robberecht, and L. Van Den Bosch. 2020. RNA toxicity in non-coding repeat expansion disorders. *EMBO J* 39 (1):e101112.
- Swoboda, K. J. 2011. Of SMN in mice and men: a therapeutic opportunity. *J Clin Invest* 121 (8):2978-2981.
- Tereza Bartoníková, K. M., Vladimír Janout, Petr Kaňovský. 2020. Epidemiologie Parkinsonovy nemoci. *Neurol. praxi* 21 (5):390-394.
- Tereza Uhrová, J. R. a. k. 2020. *Neuropsychiatrie. Klinický průvodce pro ambulantní i nemocniční praxi*. Praha: Maxdorf.
- Thauvin-Robinet, C., S. Drunat, P. Saugier Veber, D. Chantereau, M. Cossee, C. Cassini, P. Soichot, A. Masurel-Paulet, J. V. De Monleon, P. Sagot, F. Huet, M. Antin, N. Calmels, L. Faivre, B. Gerard, and m. reseau francais de genetique. 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 (7):1735-1741.
- Tian, Y., J. L. Wang, W. Huang, S. Zeng, B. Jiao, Z. Liu, Z. Chen, Y. Li, Y. Wang, H. X. Min, X. J. Wang, Y. You, R. X. Zhang, X. Y. Chen, F. Yi, Y. F. Zhou, H. Y. Long, C. J. Zhou, X. Hou, J. P. Wang, B. Xie, F. Liang, Z. Y. Yang, Q. Y. Sun, E. G. Allen, A. M. Shafik, H. E. Kong, J. F. Guo, X. X. Yan, Z. M. Hu, K. Xia, H. Jiang, H. W. Xu, R. H. Duan, P. Jin, B. S. Tang, and L. Shen. 2019. Expansion of Human-Specific GGC Repeat in Neuronal Intranuclear Inclusion Disease-Related Disorders. *Am J Hum Genet* 105 (1):166-176.
- Tobaben, S., P. Thakur, R. Fernandez-Chacon, T. C. Sudhof, J. Rettig, and B. Stahl. 2001. A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* 31 (6):987-999.
- Treangen, T. J., and S. L. Salzberg. 2011. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet* 13 (1):36-46.
- van den Aemele, J., I. Jedlickova, A. Pristoupilova, A. Sieben, S. Van Mossevelde, C. Ceuterick-de Groote, H. Hulkova, R. Matej, A. Meurs, C. Van Broeckhoven, S. F. Berkovic, P. Santens, S. Kmoch, and B. Dermaut. 2018. Teenage-onset progressive myoclonic epilepsy due to a familial C9orf72 repeat expansion. *Neurology* 90 (8):E658-E663.
- van Diggelen, O. P., S. Thobois, C. Tilikete, M. T. Zabet, J. L. Keulemans, P. A. van Bunderen, P. E. Taschner, M. Losekoot, and Y. V. Voznyi. 2001. Adult neuronal ceroid lipofuscinosis with palmitoyl-protein thioesterase deficiency: first adult-onset patients of a childhood disease. *Ann Neurol* 50 (2):269-272.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N.

- Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, and X. Zhu. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507):1304-1351.
- Verdura, E., A. Schluter, G. Fernandez-Eulate, R. Ramos-Martin, M. Zulaica, L. Planas-Serra, M. Ruiz, S. Fourcade, C. Casasnovas, A. Lopez de Munain, and A. Pujol. 2020. A deep intronic splice variant advises reexamination of presumably dominant SPG7 Cases. *Ann Clin Transl Neurol* 7 (1):105-111.
- Verhaart, I. E. C., A. Robertson, I. J. Wilson, A. Aartsma-Rus, S. Cameron, C. C. Jones, S. F. Cook, and H. Lochmuller. 2017. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis* 12 (1):124.
- Verity, C., A. M. Winstone, L. Stellitano, R. Will, and A. Nicoll. 2010. The epidemiology of progressive intellectual and neurological deterioration in childhood. *Arch Dis Child* 95 (5):361-364.
- Vesa, J., E. Hellsten, L. A. Verkruyse, L. A. Camp, J. Rapola, P. Santavuori, S. L. Hofmann, and L. Peltonen. 1995. Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* 376 (6541):584-587.
- Vilarino-Guell, C., C. Wider, O. A. Ross, J. C. Dachselt, J. M. Kachergus, S. J. Lincoln, A. I. Soto-Ortolaza, S. A. Cobb, G. J. Wilhoite, J. A. Bacon, B. Behrouz, H. L. Melrose, E. Hentati, A. Puschmann, D. M. Evans, E. Conibear, W. W. Wasserman, J. O. Aasly, P. R. Burkhard, R. Djaldetti, J. Ghika, F. Hentati, A. Krygowska-Wajs, T. Lynch, E. Melamed, A. Rajput, A. H. Rajput, A. Solida, R. M. Wu, R. J. Uitti, Z. K. Wszolek, F. Vingerhoets, and M. J. Farrer. 2011. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89 (1):162-167.
- Vill, K., O. Schwartz, A. Blaschek, D. Glaser, U. Nennstiel, B. Wirth, S. Burggraf, W. Roschinger, M. Becker, L. Czibere, J. Durner, K. Eggermann, B. Olgemoller, E.

- Harms, U. Schara, H. Kolbel, and W. Muller-Felber. 2021. Newborn screening for spinal muscular atrophy in Germany: clinical results after 2 years. *Orphanet J Rare Dis* 16 (1):153.
- Wang, J. L., X. Yang, K. Xia, Z. M. Hu, L. Weng, X. Jin, H. Jiang, P. Zhang, L. Shen, J. F. Guo, N. Li, Y. R. Li, L. F. Lei, J. Zhou, J. A. Du, Y. F. Zhou, Q. A. Pan, J. A. Wang, J. Wang, R. Q. Li, and B. S. Tang. 2010. TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain* 133:3510-3518.
- Weinreich, S. S., R. Mangon, J. J. Sikkens, M. E. Teeuw, and M. C. Cornel. 2008. [Orphanet: a European database for rare diseases]. *Ned Tijdschr Geneesk* 152 (9):518-519.
- Wheeler, R. B., J. D. Sharp, R. A. Schultz, J. M. Joslin, R. E. Williams, and S. E. Mole. 2002. The gene mutated in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6) and in *nclf* mutant mice encodes a novel predicted transmembrane protein. *Am J Hum Genet* 70 (2):537-542.
- Wilfert, A. B., A. Sulovari, T. N. Turner, B. P. Coe, and E. E. Eichler. 2017. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome Med* 9 (1):101.
- Williams, R. E., and S. E. Mole. 2012. New nomenclature and classification scheme for the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurology* 79 (2):183-191.
- Wirth, B. 2021. Spinal Muscular Atrophy: In the Challenge Lies a Solution. *Trends Neurosci* 44 (4):306-322.
- Wirth, B., M. Herz, A. Wetter, S. Moskau, E. Hahnen, S. Rudnik-Schoneborn, T. Wienker, and K. Zerres. 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 (5):1340-1356.
- Wirth, B., T. Schmidt, E. Hahnen, S. Rudnik-Schoneborn, M. Krawczak, B. Muller-Myhsok, J. Schonling, and K. Zerres. 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 (5):1102-1111.
- Wolfe, M. S. 2018. Solving the Puzzle of Neurodegeneration. In *The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases*: Academic Press, 1-22.
- Yasa, S., E. Sauvageau, G. Modica, and S. Lefrancois. 2021. CLN5 and CLN3 function as a complex to regulate endolysosome function. *Biochemical Journal* 478 (12):2339-2357.
- Yau, W. Y., E. O'Connor, Z. B. Chen, J. Vandrovcova, N. W. Wood, and H. Houlden. 2020. GGC repeat expansion in NOTCH2NLC is rare in European patients with essential tremor. *Brain* 143.
- Z. Rohan, R. M., R. Rusina. 2015. Překrývání neurodegenerativních demenci. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* (6):614-648.
- Zannolli, R., S. Gilman, S. Rossi, N. Volpi, A. Bernini, P. Galluzzi, D. Galimberti, L. Pucci, A. D'Ambrosio, G. Morgese, and F. Giannini. 2002. Hereditary neuronal intranuclear inclusion disease with autonomic failure and cerebellar degeneration. *Archives of Neurology* 59 (8):1319-1326.
- Zarin, D. A., T. Tse, R. J. Williams, R. M. Califf, and N. C. Ide. 2011. The ClinicalTrials.gov results database--update and key issues. *N Engl J Med* 364 (9):852-860.
- Zhou, X., D. H. Paushter, T. Feng, C. M. Pardon, C. S. Mendoza, and F. Hu. 2017. Regulation of cathepsin D activity by the FTL protein progranulin. *Acta Neuropathol* 134 (1):151-153.

- Zimprich, A., A. Benet-Pages, W. Struhal, E. Graf, S. H. Eck, M. N. Offman, D. Haubenberger, S. Spielberger, E. C. Schulte, P. Lichtner, S. C. Rossle, N. Klopp, E. Wolf, K. Seppi, W. Pirker, S. Presslauer, B. Mollenhauer, R. Katzenschlager, T. Foki, C. Hotzy, E. Reinthaler, A. Harutyunyan, R. Kralovics, A. Peters, F. Zimprich, T. Brucke, W. Poewe, E. Auff, C. Trenkwalder, B. Rost, G. Ransmayr, J. Winkelmann, T. Meitinger, and T. M. Strom. 2011. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 89 (1):168-175.
- Zu, T., J. D. Cleary, Y. Liu, M. Banez-Coronel, J. L. Bubenik, F. Ayhan, T. Ashizawa, G. Xia, H. B. Clark, A. T. Yachnis, M. S. Swanson, and L. P. W. Ranum. 2017. RAN Translation Regulated by Muscleblind Proteins in Myotonic Dystrophy Type 2. *Neuron* 95 (6):1292-1305 e1295.
- Zu, T., B. Gibbens, N. S. Doty, M. Gomes-Pereira, A. Huguet, M. D. Stone, J. Margolis, M. Peterson, T. W. Markowski, M. A. Ingram, Z. Nan, C. Forster, W. C. Low, B. Schoser, N. V. Somia, H. B. Clark, S. Schmechel, P. B. Bitterman, G. Gourdon, M. S. Swanson, M. Moseley, and L. P. Ranum. 2011. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (1):260-265.

Internetové zdroje

- American Gene Technologies [online]. AGT: ©2021 [cit. 17.11.2021]. Dostupné z: <https://www.americangene.com/blog/the-future-of-medicine-the-88-gene-therapies-in-development/>
- Gardner, E., Mole, S. NCL Resource - A gateway for Batten disease [online]. University College London: ©2021 [cit. 24.11.2021]. Dostupné z: <https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/>

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