

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika dětské neurologie

**HLEDÁNÍ VZÁCNÝCH A OBJEVOVÁNÍ NOVÝCH
PŘÍČIN DĚDIČNÝCH PERIFERNÍCH NEUROPATIÍ
V ČR**

Habilitační práce

Praha 2021

MUDr. Petra Laššuthová, Ph.D.

Resumé

Dědičné periferní neuropatie (DěN) jsou heterogenní skupinou onemocnění. Cílem práce bylo hledat u pacientů, u nichž již byly vyloučeny nejčastější 3 typy DěN (CMT1A/HNPP, CMTX1, CMT1B), vzácné typy DěN, nebo hledat příčiny nové.

Zavedli jsme nejmodernější postupy, včetně masivně paralelního sekvenování (MPS), a těmito testy bylo vyšetřeno až 400 pacientů s DěN – cílený panel genů u 299 pacientů, celoexomové sekvenování u 103 pacientů, celogenomové sekvenování u 8 pacientů. Byla-li pro některý gen zjištěna prevalentní kauzální varianta v naší populaci, vyšetřili jsme vždy soubor téměř všech dostupných DNA kompatibilních s typem neuropatie a dědičnosti (v průměru kolem 550 pacientů/varianta, a to pro prevalentní variantu v genech *SH3TC2*, *HINT1*, *MORC2* a *SORD*).

Tyto postupy vedly k objasnění příčiny DěN u téměř 200 pacientů ze 170 rodin. Jde vesměs o unikátní příčiny DěN, které by nebylo možné objasnit běžnými postupy. Nejvýznamnějším vědeckým výsledkem mezinárodní úrovně je objev nové příčiny DěN v důsledku mutací genu *ATPIA1*. Dále jsme podrobně popsali několik vzácných typů DěN a pro mnohé typy jsme publikovali celosvětově největší kohorty pacientů (*SH3TC2*, *HINT*, *SORD*, *SBF2*). Tím bylo možné detailně popsat fenotyp pacientů a stanovit fenotypovo-genotypové korelace. Naše práce také vedla k potvrzení kauzálního vztahu pro několik genů, kde náš nálezný druh – potvrzující – rodiny verifikoval originální studie (*MORC2*, *COX6A1*, *GNB4*).

Výsledky mají významný léčebně preventivní přínos, realizace projektu zvýšila úroveň genetické i neurologické diagnostiky na úroveň nejvyspělejších zemí a pacientům a rodinám poskytuje nejmodernější dostupné diagnostické možnosti, které bylo dříve nutno hledat v zahraničí. Objasnění příčiny závažného dědičného onemocnění má velký přínos pro pacienta, jeho rodinu, ale i celou společnost – efektivní molekulárně genetická diagnostika ušetří další zbytečné a nákladné diagnostické postupy. Naše práce je unikátní právě v tom, že spojujeme neurologickou diagnostiku s kvalitně provedenou genetickou analýzou.

Výsledky jsou důležité i celosvětově – pro mezinárodní komunitu jsme pomohli definovat mnohé typy DěN. O významu svědčí i naše široké zapojení jak do evropských konsorcií, tak i dalších mezinárodních výzkumných projektů.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji všem kolegům z Neurogenetické laboratoře za jejich ochotu, příjemné pracovní prostředí a všechny podnětné diskuze.

Zvláště děkuji nejbližším kolegům a spolupracovníkům:
Daně Š. Brožkové, Marcele Krůtové, Anně U. Meszárosově, Janě Neupauerové, Davidovi Staňkovi a Lucii Sedláčkové.

Děkuji Prof. MUDr. Pavlovi Seemanovi, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné rady.

Taktéž děkuji kolegům na neurologických klinikách – Neurologické klinice i Klinice dětské neurologie UK 2.LF a FN Motol, zejména Radimovi Mazancovi, Janě Haberlové a Katalin Štěrbové.

Děkuji i všem kolegům z České republiky, i ze Slovenska, ať už z pracovišť neurologických, či genetických, za doporučení pacientů k vyšetření na naše pracoviště, a také za velice cennou spolupráci.

Velice děkuji vedení Kliniky dětské neurologie za podporu fungování laboratoře.

Děkuji Prof. MUDr. Pavlovi Krškovi, Ph.D. za jeho nasazení a podporu našich projektů.

Výsledky této práce byly umožněny na základě podpory grantových agentur, a to zejména Interní grantové agentury (IGA MZ ČR) – nyní Agentury pro zdravotnický výzkum (AZV MZ ČR); Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK) a Společného evropského programu pro výzkum vzácných onemocnění (ERARE, EJP RD, MŠMT ČR).

Velice děkuji své rodině za trpělivost, podporu a pochopení.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem habilitační 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, 04.01.2021

Jméno – Příjmení

.....

Podpis autora

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	1
<i>Seznam obrázků</i>	<i>6</i>
<i>Seznam tabulek.....</i>	<i>7</i>
<i>Seznam zkratk použitých v textu</i>	<i>8</i>
<i>Seznam příloh – významné publikace</i>	<i>9</i>
1. ÚVOD.....	11
1.1. DĚDIČNÉ PERIFERNÍ NEUROPATIE.....	11
1.2. DĚLENÍ A KLASIFIKACE DĚN.....	12
1.3. KLINICKÉ PROJEVY.....	12
<i>Neurofyziologické vyšetření</i>	<i>13</i>
1.4. KLASIFIKACE	13
1.4.1. <i>Dědičná motorická a senzitivní neuropatie – HMSN.....</i>	<i>16</i>
<i>Nejčastější příčiny DěN</i>	<i>17</i>
<i>Demyelinizační formy autosomálně dominantně dědičné (CMT1)</i>	<i>18</i>
<i>CMT1A.....</i>	<i>18</i>
<i>CMT1B.....</i>	<i>18</i>
<i>Demyelinizační formy autosomálně recesivně dědičné (CMT4)</i>	<i>18</i>
<i>Axonální formy autosomálně dominantně dědičné (CMT2).....</i>	<i>19</i>
<i>Axonální formy autosomálně recesivně dědičné</i>	<i>19</i>
<i>X-vázané formy</i>	<i>20</i>
<i>Vzácné příčiny.....</i>	<i>20</i>
1.4.2. <i>Hereditární motorické neuropatie – HMN</i>	<i>20</i>
1.4.3. <i>Hereditární senzitivní neuropatie – HSN.....</i>	<i>21</i>
1.4.4. <i>Současné možnosti terapie u DěN</i>	<i>22</i>
1.4.5. <i>Význam genetiky pro výzkum nových léčiv pro DěN.....</i>	<i>22</i>

1.4.6.	<i>Jak probíhá neurogenetické vyšetření a výběr vhodného testu?</i>	23
2.	CÍLE PRÁCE:	25
3.	METODY	26
3.1.	MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA DĚN – ZÁKLADNÍ POSTUP	26
3.2.	MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA DĚN – ROZŠÍŘENÝ POSTUP	28
	1) <i>MPS panelu genů</i>	30
	2) <i>MPS všech dosud známých genů – WES</i>	31
	3) <i>MPS celého genomu – WGS</i>	32
	4) <i>Hodnocení dat z MPS</i>	32
	5) <i>Prevalentní kauzální varianty</i>	33
4.	VÝSLEDKY	36
	PŘÍLOHA 1	40
	PŘÍLOHA 2	52
	PŘÍLOHA 3	66
	PŘÍLOHA 4	72
	PŘÍLOHA 5	78
	PŘÍLOHA 6	86
	PŘÍLOHA 7	92
	PŘÍLOHA 8	98
	PŘÍLOHA 9	116
	PŘÍLOHA 10	136
	PŘÍLOHA 11	156
	PŘÍLOHA 12	170
	PŘÍLOHA 13	183
	PŘÍLOHA 14	192

PŘÍLOHA 15	200
PŘÍLOHA 16	210
5. DISKUZE	222
5.1. POROVNÁNÍ PANELU GENŮ A CELOEXOMOVÉHO SEKVENOVÁNÍ (WES).....	222
5.2. PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA.....	227
5.3. MEZINÁRODNÍ SPOLUPRÁCE.....	227
6. ZÁVĚRY	229
7. LITERATURA	231

Seznam obrázků

Obrázek 1: Klinické příznaky u pacientů s DěN (foto: archiv NGL KDN)	13
Obrázek 2: Dělení u DěN.....	17
Obrázek 3: Postup přípravy a zpracování MPS panelu genů v laboratoři	30
Obrázek 4: Ukázka fragmentační analýzy pro variantu c.757del v genu <i>SORD</i>	34
Obrázek 5: Rodokmen pacientky s variantou v genu <i>KCNK9</i>	67
Obrázek 6: Rodokmen původní české rodiny s variantou v genu <i>ATP1A1</i>	158
Obrázek 7: Tři námi popisované varianty, které ovlivňují RNA sestřih.	183

Seznam tabulek

Tabulka 1: Základní dělení neuropatií – volně upraveno dle (Reilly 2009).....	11
Tabulka 2: Vybrané (častější) typy DěN a jejich zařazení dle klasifikace	15
Tabulka 3: Vybrané typy DěN a typické znaky.....	27
Tabulka 4: Vyšetření prevalentních variant ve vybraných genech.....	33
Tabulka 5: Počty pacientů vyšetřených na jednotlivé prevalentní varianty	37
Tabulka 6: Celkový souhrn pacientů s prokázanou kauzální variantou pomocí nových metod	38
Tabulka 7: Porovnání kvality dat.....	223
Tabulka 8: Změny v pokrytí a kvalitě dat z WES v posledních 5 letech v naší laboratoři	225

Seznam zkratk použitých v textu

DĚN: Dědičná neuropatie

CMT: Charcot-Marie-Tooth

CMT1: demyelinizační forma CMT, autosomálně dominantně dědičná

CMT1A: Charcot-Marie-Tooth neuropatie typu 1A, autosomálně dominantně dědičná

CMT2: axonální forma CMT, autosomálně dominantně dědičná

CMT2A: Charcot-Marie-Tooth neuropatie typu 2A, patří mezi nejčastější axonální dominantní neuropatie v České Republice, je způsobená převážně mutacemi v genu mitofusin 2 (*MFN2*).

CMT4: demyelinizační forma CMT, autosomálně recesivně dědičná

NGS: Next generation sequencing

MPS: masivně paralelní sekvenování

WES: celoexomové sekvenování (whole exome sequencing)

WGS: celogenomové sekvenování (whole genome sequencing)

ROI: regions of interest

AD: autosomálně dominantní

AR: autosomálně recesivní

MLPA: multiplex ligand dependent probe analysis

Klíčová slova: dědičné neuropatie (DĚN); Charcot-Marie-Tooth (CMT); masivně paralelní sekvenování (MPS); kauzální varianta;

Seznam příloh – významné publikace

Příloha 1	40
Příloha 2	52
Příloha 3	66
Příloha 4	72
Příloha 5	78
Příloha 6	86
Příloha 7	92
Příloha 8	98
Příloha 9	116
Příloha 10	136
Příloha 11	156
Příloha 12	170
Příloha 13	182
Příloha 14	192
Příloha 15	200
Příloha 16	210

1. ÚVOD

1.1. DĚDIČNÉ PERIFERNÍ NEUROPATIE

Dědičné periferní neuropatie (DĚN) jsou heterogenní skupinou onemocnění. Rozlišujeme dědičné periferní neuropatie, u nichž je neuropatie základním klinickým projevem, neuropatie je primární příčinou obtíží (Rossor et al. 2016). Druhou skupinou jsou nemoci, kde je neuropatie součástí komplexního klinického obrazu, neuropatie je sekundární – přidružený symptom. Dělení je znázorněno v **tabulce 1**.

Tabulka 1: Základní dělení neuropatií – volně upraveno dle (Reilly 2009)

1. Neuropatie jako primární příčina obtíží

HMSN –	hereditární motorická a senzitivní neuropatie
dHMN –	distální hereditární motorická neuropatie
HS(A)N –	hereditární senzitivní (a autonomní) neuropatie
HNPP –	hereditární neuropatie se sklonem k tlakovým obrnám
HNA –	hereditární neuralgická amyotrofie

2. Neuropatie je součástí komplexního klinického obrazu, například:

Nemoci mitochondriální

Poruchy lipidového metabolismu

Poruchy reparace DNA

Amyloidózy

Neuropatie asociované s hereditární ataxií

A případně dalších, přehledně shrnuto v (Rossor et al. 2017)

1.2. DĚLENÍ A KLASIFIKACE DĚN

Tato práce je věnovaná zejména první skupině nemocí – kde je neuropatie primární a základním patofyziologickým mechanismem je progresivní neurodegenerace PNS, délkově závislá (Baets and Timmerman 2011). Podle svých objevitelů se označuje jako nemoc Charcot-Marie-Tooth (CMT), i když se v současné době tento název používá pouze pro nejčastější formu DěN, a to hereditární motorickou a senzitivní neuropatii (HMSN), kdy je vyjádřen motorický i senzitivní deficit. U některých pacientů převažuje postižení motorických nervů, tuto skupinu označujeme jako hereditární motorickou neuropatii (dHMN) (Bansagi et al. 2017). Nejméně častá je skupina hereditárních senzitivních neuropatií (HSN), kdy převládá postižení nervů senzitivních (Rossor et al. 2013).

1.3. KLINICKÉ PROJEVY

DĚN jsou nejčastějším dědičným nervosvalovým onemocněním s prevalencí 1 : 2500 (Kazamel and Boes 2015; Skre 1974). Předpokládáme, že v ČR žije asi 4000 pacientů s DěN. Onemocnění je velice heterogenní – jak klinicky (pacienti mohou mít různorodé klinické projevy), tak geneticky (poruchy mnoha různých genů mohou mít podobné příznaky).

Ve většině případů jde o pomalu progredující onemocnění, které nezkracuje délku života, ale pacienta invalidizuje. Nemoc obvykle začíná v první nebo druhé životní dekádě, i když jsou četné výjimky ve formě časnějšího (zejména CTM2A – *MFN2*, případně různé autosomálně recesivně dědičné formy) i pozdnějšího nástupu (poruchy genu *MME* jsou typické nástupem obtíží až v páté dekádě). Příznaky jsou délkově závislé – začínají na akrech dolních (později i horních) končetin a postupují proximálně, úměrně délce postiženého nervu a trvání nemoci (Pareyson and Marchesi 2009).

Obrázek 1: Klinické příznaky u pacientů s DĚN (foto: archiv NGL KDN)



Typickým klinickým projevem je svalová slabost a symetrické svalové atrofie. Šlachosvalové reflexy jsou snižené až vyhaslé nejdříve na dolních končetinách (L5/S2). K rozvinutému obrazu patří také deformity nohou typu pes cavus, později případně i rukou. Může být přítomná porucha vibračního cití, či snížená citlivost (Verhamme et al. 2004).

Neurofyziologické vyšetření

Elektrofyziologické vyšetření rozliší, zda se jedná o demyelinizační, nebo axonální formu DĚN (Reilly et al. 2011). Standardně se používá rychlost vedení periferním nervem (n. medianus) na předloktí, jako hranice byla stanovena rychlost 38 m/s (Harding and Thomas 1980). Demyelinizační typ DĚN (označován též HMSN I neboli typ 1) má rychlost vedení výrazně sníženou, zatímco axonální typ DĚN (HMSN II neboli typ 2) má relativně zachovanou rychlost vedení, ale zároveň signifikantní pokles sumačního svalového akčního potenciálu (CMAP, resp. SNAP – sensory nerve action potential) (Saporta and Shy 2013). Na rozhraní těchto dvou skupin jsou intermediární formy s rychlostmi vedení 25-45 m/s (Nicholson and Myers 2006).

1.4. KLASIFIKACE

Klasifikace DĚN prošla vzhledem k velké klinické i genetické heterogenitě onemocnění komplikovaným vývojem (Reilly, et al. 2011). Klasifikace se utvářela postupně tak, jak byly jednotlivé typy DĚN popisovány a objasňovány na molekulárně genetické úrovni (znázorněno v **tabulce 2**). Určilo se základní označení skupiny: CMT1 pro autosomálně dominantně dědičné demyelinizační formy, CMT2 pro axonální,

autosomálně dominantně dědičný typ DĚN a podobně. Následně se přidávala písmena abecedy pro každý nově popsáný typ. Ale pro enormní nárůst poznatků, což je spojeno také s rozvojem masivně paralelního sekvenování, byla již v roce 2016 pro některé skupiny vyčerpána všechna písmena abecedy (např. CMT2A – CMT2Z).

Vzhledem k velké heterogenitě a vzájemně se prolínajícím podskupinám začalo být následně zřejmé, že výše uvedená klasifikace dědičných neuropatií je obtížně pochopitelná a příliš komplikovaná.

Proto tým autorů vedený J. M. Vallatem navrhl klasifikaci dle kauzální varianty a typu dědičnosti (Magy et al. 2018; Mathis et al. 2015). Popis v klasifikaci by byl tvořen z několika částí, které jasně určují typ dědičnosti, typ neuropatie dle primárního postižení na EMG a z názvu genu, ve kterém je kauzální varianta. Dědičnost je popsána zkratkami AD (autosomálně dominantní), AR (autosomálně recesivní), nebo X (X-vázaná). Typ neuropatie má být popsán jako de (demyelinizační), ax (axonální), nebo int (intermediární). Např. nejčastější typ CMT1A, který je způsoben duplikací v oblasti genu *PMP22* a jde o autosomálně dominantně dědičnou formu, by se jmenoval AD-CMTde-*PMP22dup*.

Zda komunita přijme uvedený popis, zatím není jasné. Nicméně, i kdyby návrh nebyl přijat v kompletní podobě, trend zjednodušit popis a klasifikaci zůstává. Někteří autoři v současné době již používají popis, který odkazuje pouze na kauzální gen, např. *SORD* neuropathy (Cortese et al. 2020b).

Tabulka 2: Vybrané (častější) typy DěN a jejich zařazení dle klasifikace

Typ DěN	Dědičnost	Označení skupiny	Vybrané příklady: Klasifikace konkrétního typu dle kauzálního genu	Kauzální gen a odkaz na primární literaturu
Demyelinizační	AD	CMT1	CMT1A	<i>PMP22</i> (Lupski et al. 1991)
			CMT1B	<i>MPZ</i> (Shy et al. 2004)
			CMT1C	<i>LITAF/SIMPLE</i> (Street et al. 2003)
			CMT1D	<i>EGR2</i> (Warner et al. 1998)
Axonální	AD	CMT2	CMT2A	<i>MFN2</i> (Zuchner et al. 2004)
			CMT2B	<i>RAB7</i> (Auer-Grumbach et al. 2000)
			CMT2N	<i>AARS</i> (Latour et al. 2010)
			CMT2Z	<i>MORC2</i> (Sevilla et al. 2016)
Demyelinizační	AR	CMT4	CMT4A/CMTRIB	<i>GDAP1</i> (Senderek et al. 2003a)
			CMT4C	<i>SH3TC2</i> (Senderek et al. 2003b)
			CMT4J	<i>FIG4</i> (Chow et al. 2007)
Intermediární	X-vázaná	CMTX	CMTX1	<i>GJB1</i> (Bergoffen et al. 1993)

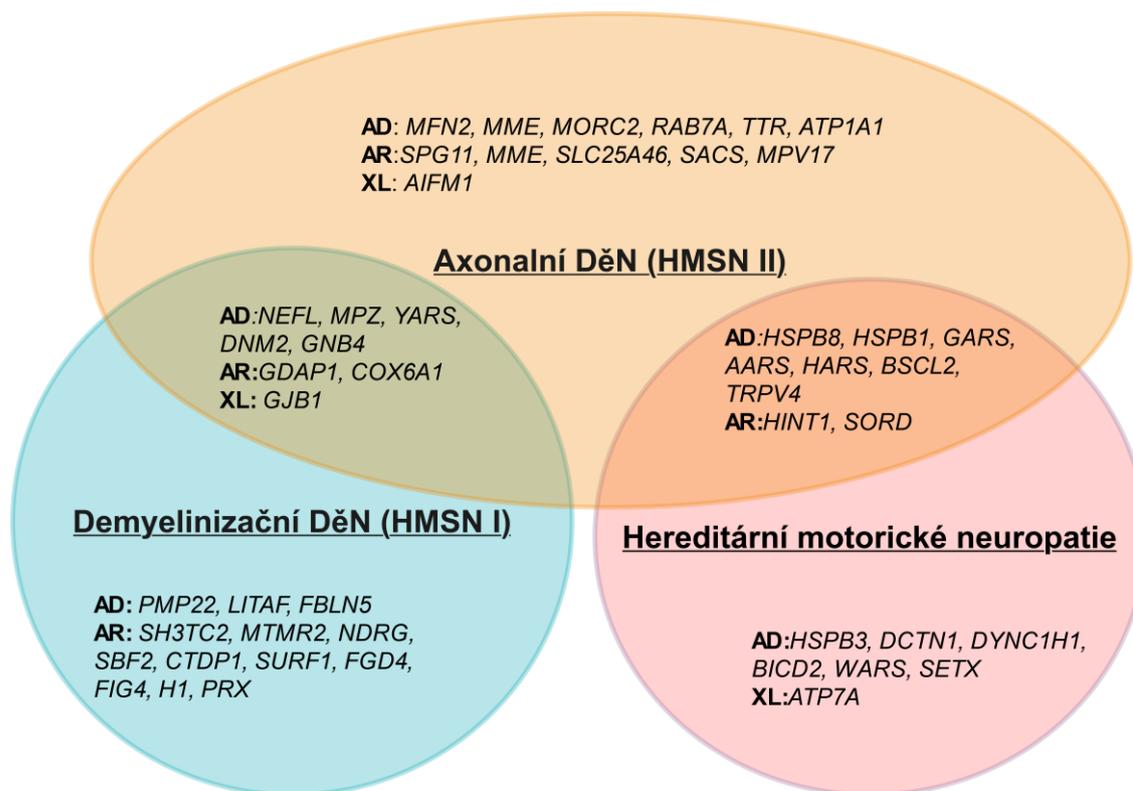
Legenda: AD – autosomálně dominantně dědičná; AR – autosomálně recesivně dědičná forma

Souhrnem lze říct, že v současné době prochází klasifikace vývojem. Podobně, jako je tomu i u jiných vzácných onemocnění, i u DěN je patrný posun v myšlení a heterogenní onemocnění je již chápáno spíše jako spektrum nemocí než přesně vyhraněné jednotlivé klinické jednotky.

1.4.1. Dědičná motorická a senzitivní neuropatie – HMSN

Označení CMT – nemoc Charcot-Marie-Tooth – se používá pro nejčastější formu: dědičnou motorickou a senzitivní neuropatii (HMSN). U tohoto typu jde o poruchu funkce jak motorického, tak senzitivního neuronu. K této skupině má blízko HMN – dědičná motorická neuropatie, kdy je téměř zachovaná funkce senzitivní, ale je přítomná výraznější porucha motorická. Jak se překrývají uvedené skupiny, je znázorněno na obrázku 2.

Obrázek 2: Dělení u DěN



Legenda: Vennův diagram znázorňuje jednotlivé typy DěN a překryv mezi skupinami HMSN a HMN. Pro každou skupinu jsou uvedeny kauzální geny, které jsme našli u našich pacientů v ČR. Schéma je upraveno dle (Rudnik-Schoneborn et al. 2020), kde autoři přehledně popisují většinu v současné době známých genů. AD – autosomálně dominantní dědičnost, AR – autosomálně recesivní dědičnost, XL – X-vázaná dědičnost

Nejčastější příčiny DěN

CMT neboli HMSN je geneticky heterogenní, v současné době je s nemocí asociováno již více než 100 genů. Mnohé z těchto příčin jsou ale velice vzácné, celosvětově je popsáno jen několik málo rodin, také v rámci ČR jde pouze o jednu nebo dvě rodiny s poruchou daného genu. Existují ale některé typy CMT, které jsou více zastoupeny, z nich nejčastější je CMT1A. Níže je přehled nejčastějších typů DěN v ČR, popsány jsou ty typy, pro které je v naší databázi Neurogenetické laboratoře víc než 20 pacientů s poruchami daného genu.

Demyelinizační formy autosomálně dominantně dědičné (CMT1)

CMT1A

Jde o autosomálně dominantně dědičnou demyelinizační formu CMT. Molekulárním podkladem jsou duplikace v oblasti 17p11.2-12, kde leží i gen *PMP22* (Lupski, et al. 1991). Ten kóduje periferní myelin protein, jeho úloha je důležitá zejména pro Schwannovy buňky, jejich dozrávání a udržování myelinu.

Pro diagnostiku se používá jednoduché vyšetření metodou MLPA. Až 40 % všech pacientů s objasněnou příčinou DĚN má CMT1A. Toto vyšetření tedy je a i zůstává základním vyšetřením pro pacienty s demyelinizační formou DĚN.

Je zajímavé, že i přesto, že je mechanismus vzniku nemoci relativně uniformní na podkladě duplikací v oblasti genu *PMP22*, u pacientů pozorujeme často velmi rozdílný fenotyp a míru postižení. Míra postižení navíc nekoreluje s expresí *PMP22* (Visigalli et al. 2016). Proto se předpokládá, že existuje nějaký modifikující faktor (Tao et al. 2019).

CMT1B

Z dalších významnějších demyelinizačních AD forem DĚN je potřeba uvést zejména CMT1B na podkladě kauzálních variant v genu *MPZ*. Tvoří asi 10 % všech objasněných pacientů s CMT1. Pacienti mohou mít klasický CMT fenotyp, ale lze rozlišit i skupinu pacientů s časným začátkem a výrazně sníženými rychlostmi vedení, nebo naopak pozdně nastupující axonální/intermediární formy (Shy, et al. 2004).

Demyelinizační formy autosomálně recesivně dědičné (CMT4)

Autosomálně recesivně dědičné formy jsou obecně celosvětově považovány spíše za vzácné a jejich vyšší výskyt se předpokládá jenom u některých populací (uzavřené, homogenní populace). Mnoho z těchto typů je ale relativně častých v ČR. U autosomálně recesivních forem je popisován časnější nástup obtíží a závažnější míra postižení. Velmi početně zastoupený je typ CMT4C, který je podmíněn bialelickými variantami v genu *SH3TC2*. Pro tento typ je typická skolióza.

Axonální formy autosomálně dominantně dědičné (CMT2)

Jde o relativně početnou skupinu, je známo více než 20 kauzálních genů pro CMT2. Nejčastější příčinou jsou mutace v genu pro *MFN2*, které způsobují CMT2A. Nemoc má těžší a závažnější průběh, první obtíže se objevují do deseti let věku.

Axonální formy autosomálně recesivně dědičné

V této skupině jsou významné zejména geny *SORD* a *HINT1*, které byly popsány nedávno. Jejich objev byl významným překvapením, jelikož málokdo očekával, že je možné i v současné době najít novou příčinou DĚN, která bude relativně častá.

Bialelické varianty v genu *HINT1* (Zimon et al. 2012) způsobují autosomálně recesivně dědičnou neuropatii s neuromyotonií. Jde o významný a snadno rozpoznatelný znak, kdy např. po usilovném stisku pacient není schopen samovolně ruku uvolnit, ale musí si dopomoci druhou rukou. To, že existuje typ neuropatie s neuromyotonií, bylo popsáno již dávno (Hahn et al. 1991), ale nebylo známo, jak časté toto onemocnění je. U pacientů se první obtíže objevují kolem desátého roku věku. Jde o středně těžké postižení více motorických nervů, kromě neuromyotonie jsme pozorovali u všech našich pacientů oslabení extenze až plegii palce nohou.

Bialelické varianty v genu *SORD* byly popsány jako příčina neuropatie teprve nedávno – v roce 2020 (Cortese, et al. 2020b). Jde o významný objev, a to nejen proto, že jde o častou formu neuropatie. Jde také o potenciálně léčitelnou formu, u pacientů jsou totiž změněny hladiny sorbitolu. Navíc pochopení patofyziologických mechanismů pro tento typ neuropatie může mít terapeutický význam i pro diabetickou neuropatii.

O pozoruhodný počín jde ale také z hlediska analýzy dat. Byly použity nové metodiky analýzy dat z MPS založené na velkém množství dostupných vyšetřených pacientů. Data byla spojena a byly hledány ne vzácné varianty, jak je obecně zvykem, ale naopak varianty společné – časté v uvedené skupině pacientů.

Klinicky jde opět o středně těžké postižení, rozvoj obtíží nastupuje ve druhé nebo třetí dekádě. Výraznější je postižení motorických nervů, časté jsou deformity nohou typu pes cavus.

X-vázané formy

Významný je *GJB1*, jedná se o jednu z nejčastějších forem DĚN (Bone et al. 1997). Postižení u mužů je výraznější, s časnějším nástupem. Taktéž rychlosti vedení perif. nervem jsou výrazněji sníženy – demyelinizační typ. U žen přenašeček může jít o intermediární typ CMT (rychlosti vedení perif. nervem 30–40 m/s), klinicky jsou postižené mírněji, nebo jsou i zcela bez příznaků. Tato skupina tvoří až 10 % všech objasněných DĚN.

Vzácné příčiny

Je mnoho dalších podtypů DĚN, které jsou ale již relativně vzácné. Každý rok je popsáno několik nových kauzálních genů pro DĚN, poznatků přibývá, i když se tempo postupně zvolňuje. Nejvíce nových příčin DĚN bylo popsáno v letech 2010 až 2015, kdy např. v roce 2012 to bylo až 10 nových genů, v roce 2013 až 11 nových příčin DĚN (Timmerman et al. 2014). Nepochybně to souvisí s rozvojem metodik MPS. V roce 2020 pak byly popsány minimálně dva geny: *SORD* (Cortese, et al. 2020b) a *GBF1* (Mendoza-Ferreira et al. 2020) pro primární DĚN. V roce 2019 byl výrazný zejména gen *ATP1A1* (Lassuthova et al. 2018).

Naopak ale přibývá prací, které popisují nové geny a jejich kauzální asociace pro komplexnější fenotypy, kde je neuropatie součástí komplexního klinického obrazu. Taktéž jsou dnes v mnohem větší míře popisovány překryvy jednotlivých klinických jednotek (např. ataxie – spastická paraparéza – neuropatie) (Bis-Brewer and Zuchner 2018; Cortese et al. 2020a).

1.4.2. Hereditární motorické neuropatie – HMN

Jde o skupinu neuropatií, které tvoří asi 10 % DĚN. Představuje výraznější postižení motorických nervů, klinicky pozorujeme u pacientů výrazné atrofie a slabost na DK. Elektrofyzilogicky jde o axonální formy DĚN, kde je velký překryv se skupinou axonálních HMSN (CMT2).

1.4.3. Hereditární senzitivní neuropatie – HSN

Jde o nejméně častou formu DĚN, ale klinicky velice závažnou. Je porušena správná funkce senzitivního neuronu. U pacientů proto vidíme porušené funkce vnímání bolesti, teploty, tlaku nebo dotyku.

Rozlišujeme několik typů HSN s Mendelovskou dědičností:

1) Ztráta citlivosti, označována též jako CIP – congenital insensivity to pain

Nejčastěji podmíněna bíalelickými mutacemi v genu pro $Na_v1.7$ – *SCN9A* (Cox et al. 2006). Jde o závažnou formu onemocnění, u pacientů jsou typická častá poranění, pokousání (jazyka, rtů, prstů), vnímání viscerální bolesti je také sníženo, a to včetně např. bezbolestných porodů (Goldberg et al. 2007; Yuan et al. 2013). Kromě kauzálních variant v genu *SCN9A* mohou tuto formu onemocnění způsobovat i varianty v genech *SCN11A* nebo *ZFHX2* (Habib et al. 2018; Leipold et al. 2013).

2) Hereditární senzitivní a autonomní neuropatie – HSAN

Jde o širokou skupinu nemocí, kde je známo více forem (Rotthier et al. 2012). Autosomálně dědičné formy se označují jako HSAN1, autosomálně recesivní formy jako HSAN2-8. U těch je patrný časnější nástup a výraznější obtíže typu častých poranění, sebepoškozujícího chování, časté a špatně se hojící rány, osteomyelitidy. Někdy je patrná i porucha autonomních funkcí (kolísání krevního tlaku, neobvyklé pocení, poruchy trávení a jiné). Při elektrofyziologickém vyšetření pozorujeme axonální neuropatii na senzitivních nervedech, rychlosti vedení a amplitudy na motorických nervedech jsou většinou zachovány.

Autosomálně dominantní formy jsou způsobeny kauzálními variantami v genech *ATL1*, *ATL3*, *DNMT1*, *SCN11A*, *SPTLC1* a *SPTLC2*. Autosomálně recesivně dědičné formy způsobují bíalelické varianty v genech *DST*, *RETREG1*, *ELP1*, *KIF1A*, *NGF*, *NTRK1*, *PRDM12*, *WNK1* nebo *FLVCR1* (Lotsch et al. 2013; Naureen et al. 2020).

U mnoha pacientů zůstává příčina nemoci neobjasněna i po vyšetření baterie těchto známých genů.

3) Zvýšená citlivost a zvýšené vnímání bolesti

V některých případech porucha funkce senzitivního neuronu vede naopak právě ke zvýšené vnímavosti pro bolest, teplo, dotyk nebo tlak. Typickým představitelem je skupina tzv. small fiber neuropathies (SFN) (Faber et al. 2012a; Faber et al. 2012b).

Pro skupinu HSN je v současné době možné poskytnout pouze podpůrnou terapii a péči. Nicméně je právě tato skupina nemocí důležitým a zajímavým kandidátem pro nové terapie (Goldberg et al. 2012). U CIP bialelické varianty v genu *SCN9A*, který kóduje iontový kanál $Na_v1.7$, způsobují blokování kanálu, a tím ztrátu vnímání bolesti. Pokud bychom pochopili mechanismus působení, mělo by to velký význam pro vývoj nových analgetik. A pokud by byla účinná, výsledek by měl velký dosah i pro terapii bolestivých stavů obecně. Tyto nemoci jsou dobrým modelem pro studium bolestivých stavů a vývoj nových analgetik (Sexton et al. 2018). I proto jde o velmi významný obor zkoumání.

1.4.4. Současné možnosti terapie u DĚN

Zatím neexistuje kauzální terapie. Pacientům lze ale nabídnout terapii podpůrnou, ze které mohou výrazně profitovat. Jde o multidisciplinární péči, nezbytnou součástí je genetické poradenství, rehabilitace a ortopedická péče.

1.4.5. Význam genetiky pro výzkum nových léčiv pro DĚN

I když zatím neexistuje kauzální terapie, znalost kauzálních mutací je zcela zásadní, a to zejména:

- 1) Pro pacienta a jeho rodinu.
- 2) Pro možnost studovat mechanismy, kterými poruchy jednotlivých genů způsobují DĚN.
- 3) Pro možnost shromažďovat data od větších skupin pacientů s poruchami daného genu tak, aby bylo možné dobře popsat klinické projevy daného podtypu, ale taktéž aby bylo možné vytvořit kohorty pro případné klinické studie.

Kauzální terapii musí předcházet podrobné zkoumání daného typu nemoci, a proto je diagnostika prvním krokem ke klinickým studiím. Nicméně, v dnešní době má

z našeho pohledu hledání nových a objasňování vzácných příčin DĚN největší význam pro samotné pacienty.

1.4.6. Jak probíhá neurogenetické vyšetření a výběr vhodného testu?

V klinické praxi je pro neurologa nejdůležitější rozpoznat, zda se u daného pacienta s periferní neuropatií může jednat o dědičnou formu, a na základě toho odeslat pacienta ke genetické konzultaci.

V současnosti je v České republice doporučováno, aby pacienti před zahájením molekulárně genetického testování vždy podstoupili **genetické poradenství**, které je nedírekativní.

Optimální postup:

- 1) Stanovení neurologické diagnózy, nebo klinického závěru. Správný a detailní popis obtíží, výsledky pomocných vyšetření a klinický závěr, či podezření na určitou diagnózu jsou pro klinického genetika zcela zásadní.
- 2) Genetická konzultace. Cílem je vysvětlit přínos a limity genetického testování a poukázat na výsledky, ke kterým je možné dospět. Respektujeme rozhodnutí pacienta/rodiny o provedení/neprovedení genetického testování. Přínosem genetického testování může být zejména upřesnění diagnózy. Součástí konzultace je vypracování rodokmenu, získání a podepsání informovaných souhlasů, výběr vhodných DNA testů a laboratoří.
- 3) Molekulárně genetické vyšetření – DNA testování.
- 4) Genetická konzultace. Sdělení a vysvětlení výsledků vyšetření, upřesnění rizika dle výsledků, nabídka vyšetření příbuzných, nabídka případné prevence.

1.4.7. Jak vybrat vhodný a správný molekulárně genetický test?

Technologie nyní umožňují sekvenovat (přečíst) libovolně velký úsek DNA nebo i celý genom, v podstatě tedy odpadají technické limitace rozsahu vyšetření. O to zásadnějším a důležitějším problémem se stává správný výběr metodiky a vhodného DNA testu. Na základě obtíží pacienta se snažíme vybrat optimální řešení tak, abychom vyšetřili ty oblasti genomu, které nás vzhledem k fenotypu zajímají (sekvenování celého genomu není vždy nejefektivnějším řešením). Zároveň musíme být schopni tyto oblasti zanalyzovat a nalezené varianty vyhodnotit (čím větší úsek si vybereme, tím více variant musíme hodnotit a máme více vedlejších nálezů). Musíme také zohlednit i finanční hledisko (i když cena klesá, pořád jde o relativně vysoké částky). Vybíráme proto co nejefektivnější řešení.

V současnosti je k dispozici následující škála možností:

- 1) Vyšetření cílené na konkrétní (prevalentní) variantu.
- 2) Vyšetření cílené na jednotlivé geny.
- 3) Vyšetření cílené na jednotlivé skupiny/panely genů (10-500).
- 4) Celoexomové sekvenování (Whole Exome Sequencing – WES; až 20 tisíc genů, pouze exony).
- 5) Celogenomové sekvenování (Whole Genome Sequencing – WGS; 3 miliardy bází – exony i introny).
- 6) Molekulárně cytogenetická vyšetření (array Comparative Genomic Hybridization – aCHG; fluorescenční in situ hybridizace – FISH; apod.) – zejména pro odchylky v počtu kopií (copy number variation – CNV), příp. větší přestavby.

2. CÍLE PRÁCE:

Hlavním cílem práce bylo zjistit, jaké jsou molekulární příčiny dědičné neuropatie u pacientů, u nichž dosud použité metody genetiky neobjasnily příčinu obtíží.

Dílčím cílem pak bylo objevování nových příčin vzácných dědičných nervosvalových onemocnění a fenotypovo-genotypová analýza u vzácných typů dědičných neuropatií.

Pro splnění uvedených cílů byl navržen následovný postup:

- 1) Navrhnout optimální a ověřený standardní postup pro DNA vyšetření u pacientů s dědičnou neuropatií, u kterých již byly vyloučeny nejčastější 3 typy DĚN.
- 2) Zavést postupy s využitím nejmodernějších vyšetřovacích technologií pro DNA vyšetření českých pacientů s dědičnou periferní neuropatií, a to zejména masivně paralelní sekvenování (MPS).
- 3) Vytvořit nástroj pro MPS panelu všech dosud známých genů – jejichž mutace mohou vést k dědičné neuropatii.
- 4) Navrhnout a ověřit použitelnost a spolehlivost postupu vyhodnocování a filtrování dat z masivně paralelního sekvenování k efektivní DNA diagnostice pacientů s DĚN.
- 5) Využít sekvenování exomu u rodin, u nichž výsledky předchozích vyšetření neobjasnily příčinu DĚN.
- 6) Zjistit a popsat fenotyp a případné typické příznaky u pacientů a rodin, u nichž budou prokázány kauzální mutace, zejména ty v nově asociovaných genech.
- 7) Při nálezů mutací v genech dosud nespojovaných s DĚN vyšetřit tyto nové příčiny u většího počtu pacientů s neobjasněnou DĚN z naší databáze.
- 8) Ověřit spolehlivost a citlivost použitého postupu NGS a vyhodnocování získaných dat.
- 9) Zlepšit úroveň genetické i neurologické diagnostiky na úroveň nejvyspělejších zemí a pacientům a rodinám poskytnout nejmodernější dostupné diagnostické možnosti, které bylo dříve třeba hledat v zahraničí.

3. METODY

3.1. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA DĚN – ZÁKLADNÍ POSTUP

Základním testem je a stále zůstává vyšetření delecí/duplikací v oblasti CMT/HNPP region 17p12. V současnosti využíváme metodiku MLPA – metoda multiplexní amplifikace sond závislá na ligaci (www.mlpa.com). Používaný kit <https://www.mrcholland.com/product/P033/726>) obsahuje 38 prób, z toho 16 v oblasti 17p12, 2 próby pro gen *KIF1B* a 18 kontrolních prób. Submikroskopické 1,5Mb velké duplikace v oblasti 17p12 způsobují CMT1A – demyelinizační autosomálně dominantně dědičnou formu DěN – nejčastější formu neuropatie vůbec (až 70 % všech demyelinizačních forem). Naopak delece této oblasti vedou k HNPP – hereditary neuropathy with liability to pressure palsies – tomakulózní neuropatie (Seeman et al. 1999).

Dále u vybraných pacientů následuje klasické Sangerovo sekvenování vybraných nejčastějších příčin DěN, a to zejména sekvenování genu *GJB1*, *MPZ* a *MFN2*.

V některých případech je vhodné vyšetřit konkrétní gen (nebo vyšetření na prevalentní patogenní variantu konkrétního genu) dle specifických klinických příznaků a typu dědičnosti v rodině. Některé příklady námi používaného algoritmu jsou uvedeny v **tabulce 3**.

Tabulka 3: Vybrané typy DěN a typické znaky

TYP DěN	GEN/ PREVALENTNÍ VARIANTA	TYPICKÉ ZNAKY/ FENOTYP
CMT1		
CMT1A	<i>PMP22/ duplikace</i>	Klasický fenotyp
CMT1B	<i>MPZ</i>	Klasický fenotyp/ DSS/ CHN
CMT1E	<i>PMP22/ bodové mutace</i>	Klasický fenotyp/ DSS/ CHN
CMT1	<i>FBLN5</i>	CMT1/ hyperelasticita kůže/ makulární degenerace
HNPP	<i>PMP22/ delece</i>	Neuropatie s tendencí k tlakovým obrnám
CMTX		
CMTX1	<i>GJB1</i>	Intermediární typ, mírnější postižení u žen, v rodině není přenos z otce na syna
CMT4		
CMT4B2	<i>SBF2</i>	Závažné postižení, glaukom (Senderek et al. 2003c)
CMT4C	<i>SH3TC2</i>	Závažné postižení, skolióza (Yger et al. 2012)
CMT4D	<i>NDRG1</i>	Závažné postižení/ Romové/ hluchota
CMT4J	<i>FIG4</i>	Časný nástup, závažnější postižení
CMT		
CMT2		
CMT2A	<i>MFN2</i>	Závažné postižení, časný nástup, atrofie optiku (Bombelli et al. 2014)
CMT2B	<i>RAB7A</i>	Axonální typ s převažujícím senzitivním postižením
CMT2C	<i>TRPV4</i>	Axonální typ, paralýza hlasivek (Chen et al. 2010)
AR-NANM	<i>HINT1</i>	Axonální typ, neuromyotonie, AR dědičnost (Lassuthova et al. 2015)
SORDD	<i>SORD</i>	Axonální typ, spíše motorický deficit

Legenda: Vybrané klinické znaky, které nás mohou navést přímo ke kauzální variantě

AR – autosomálně recesivní; DSS – Neuropatie typu Déjerine-Sottas; CHN – kongenitální hypomyelinizační neuropatie

Další diagnostický postup je již složitější, optimalizace tohoto postupu byla předmětem této práce.

3.2. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ DIAGNOSTIKA DĚN – ROZŠÍŘENÝ POSTUP

Masivně paralelní sekvenování patří k moderním metodám genetiky. Základním principem je vyšetření více oblastí genomu (masivně) v jednom vyšetřovacím postupu (paralelně) a v reálném čase. Pro masivně paralelní sekvenování jsou k dispozici různé platformy, my používáme chemikálie SureSelect (Agilent Technologies, CA, USA) a přístroje Illumina (Illumina, Inc, CA, USA) (Liu et al. 2012).

1) MPS panelu genů

MPS panelu genů jsme začali používat v roce 2012. Pomocí nástroje SureDesign (Agilent Technologies, CA, USA) byl sestaven design pro metodu HaloPlex, který obsahoval všech 59 dosud (v té době) známých genů spojovaných s DĚN: *AARS, ARHGEF10, ATLI, BSCL2, CCT5, CTDP1, DCTNI, DNM2, EGR2, FAM134B, FBLN5, FGD4, FIG4, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, HARS, HINT1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IGHMBP2, IKBKAP, INF2, KARS, KIF1B, LITAF, LMNA, LRSAM1, MED25, MFN2, MICAL1, MPZ, MTMR2, NDRG1, NEFL, NGF, NTRK1, PLEKHG5, PMP22, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF2, SEPT9, SETX, SH3TC2, SLC12A6, SLC18A3, SLC5A7, SOX10, SPTLC1, SPTLC2, TFG, RPV4, WNK1, YARS.*

Následně byl panel rozšiřován vždy o nově popsané geny, poslední používaná verze pokrývala oblast 102 genů, jejichž varianty byly spojovány s DĚN:

AARS, AIFM1, ARHGEF10, ATLI, ATP1A1, ATP7A, BAG3, BICD2, BSCL2, CCT5, COX6A1, CTDP1, CTNI, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DNMT1, DRP2, DST, DYNCCI1, EGR2, FAM134B, FBLN5, FBXO38, FGD4, FIG4, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, GJB3, GNB4, HARS, HINT1, HK1, HSPB1, HSPB8, CHCHD10, IFRD1, IGHMBP2, IKBKAP, INF2, KARS, KIF1A, KIF5A, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MCM3AP, MFN2, MME, MORC2, MPZ, MT-ATP6, MTMR2, MYH14, NDRG1, NEFH, NEFL, NGF, NTRK1, PDK3, PLEKHG5, PMP2, PMP22, PNKP, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SACS, SBF1, SBF2, SCN11A, SCN9A, SEPT9, SETX, SH3TC2, SIGMAR1, SLC12A6, SLC25A46, SLC5A7, SOD1, SOX10, SPG11, SPTLC1, SPTLC2, SURF1, TFG, TRIM2, TRPV4, TTR, TUBB3, VAPB, VCP, WARS, WNK1, YARS.

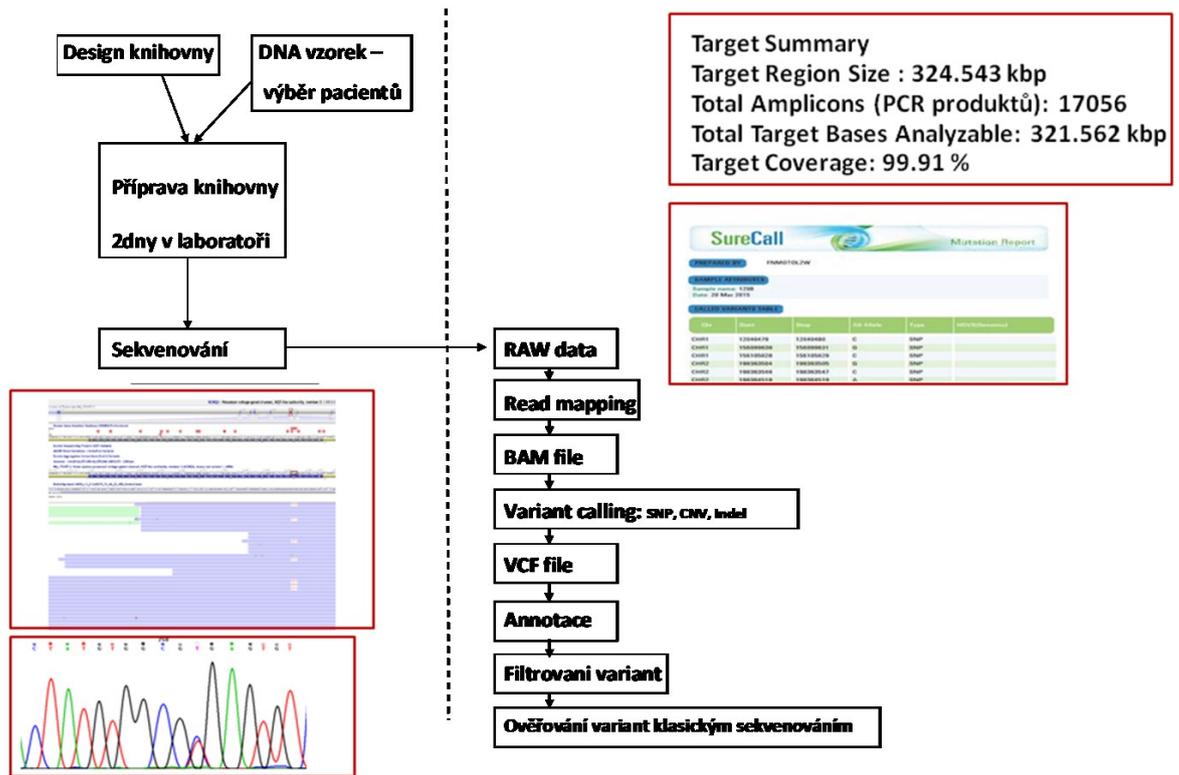
Geny pro zařazení do panelu jsme vybírali na základě kritérií:

1) Publikovaná jedna práce, která popisuje kauzální vztah variant v daném genu pro DĚN, ale součástí je i funkční studie, a zároveň byly zachyceny kauzální varianty v genu u více než dvou nepříbuzných rodin.

2) Pokud některá z výše uvedených podmínek nebyla splněna, byl gen zařazen do panelu pouze, pokud byly publikovány alespoň dvě nezávislé (z jiných pracovišť) práce, které potvrzují kauzální vztah gen – DĚN.

Postup zpracování je znázorněn na obrázku 3.

Obrázek 3: Postup přípravy a zpracování MPS panelu genů v laboratoři



Legenda: Vpravo znázorněn postup přípravy vzorku v laboratoři, vlevo bioinformatické zpracování. Zkratky: bam – komprimovaný binární formát souborů .sam – sequence alignment/map file; VCF – variant calling file – soubor, kde jsou zapsány vyvolané varianty v definovaném formátu.

2) MPS všech dosud známých genů – WES

Celoexomové sekvenování (Whole exome sequencing – WES) je přístup, kdy sekvenujeme pouze kódující oblasti DNA. Jde o oblast, která tvoří pouze 1-2 % genomu, ale dle současného stavu poznání leží v této oblasti až 85 % kauzálních variant (Choi et al. 2009). V naší laboratoři používáme kit pro přípravu knihoven od firmy Agilent Technologies (CA, USA): SureSelect Human All Exon kity (verze 4 až verze 7) <https://www.agilent.com/en/product/next-generation-sequencing/hybridization-based-next-generation-sequencing-ngs/exome-probes/sureselect-human-all-exon-v7-232866>. K sekvenování jsou použité přístroje od firmy Illumina (Illumina, Inc, CA, USA), a to zejména vysokokapacitní platformy HiSeq 4000 a HiSeq X <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>.

3) MPS celého genomu – WGS

Sekvenování celého genomu (WGS) je náročný proces, ale v porovnání s WES může vést k získání nových dat a poznatků. Literatura uvádí, že WGS může výrazně zlepšit diagnostické možnosti MPS, může zachytit až o 10 % více variant i v kódujících oblastech, a navíc je schopno zachytit i jiné než bodové varianty (Gilissen et al. 2014).

Pro WGS protokol byl použit TruSeq DNA PCR free protocol (Illumina) <https://emea.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-dna-pcr-free.html?langsel=/cz/>, data byla zpracována dle doporučení GATK. V procesu hodnocení variant jsme se zaměřili zejména na varianty v kódující oblasti genomu. Podezřelé varianty byly následně ověřeny klasickým sekvenováním, včetně segregace varianty s onemocněním v rodině.

4) Hodnocení dat z MPS

Všechna data z MPS panelu genů, WES i WGS jsme vyhodnotili většinou více nástroji a algoritmy.

Na našem pracovišti v současnosti používáme 3 nástroje pro kompletní bioinformatickou analýzu dat z MPS (NGS) – 2 komerční nástroje s grafickým uživatelským rozhraním (GUI): SureCall (Agilent Technologies, CA, USA) a NextGENe (Softgenetics, USA) a „GATK best practices“ pipeline v příkazové řádce na pracovní stanici s Linuxem.

Data z MPS panelu genů a WES byla vyhodnocena vždy s použitím dvou různých nástrojů, a to většinou kombinace jednoho komerčního nástroje (většinou SureCall) a vlastního postupu (tzv. pipeline) dle „GATK best practices“ (Van der Auwera et al. 2013).

Data z WGS byla vyhodnocena s použitím vlastní pipeline dle „GATK best practices“.

Při analýze dat z WGS jsme použili dva přístupy – jednak analýza s použitím .bed file z WES (analýza pouze „kódujících oblastí“ stejně jako u WES, ale s rovnoměrnějším pokrytím), jednak analýza bez omezení oblasti, bez použití .bed file. U vybraných rodin, pokud máme k dispozici i data z vazebné analýzy, lze tyto také využít pro filtrování dat.

Anotace a filtrování variant byla provedena opět vždy s použitím alespoň dvou různých nástrojů.

Použili jsme jednak anotaci komerčním nástrojem Alamut®Batch (Interactive Biosoftware, a Sophia Genetics company, France), která měla výhodu zejména v tom, že přiřadila i údaje z databáze HGMD Professional (nyní dostupné na: <https://digitalinsights.qiagen.com/>, HGMD® Online, Qiagen Digital Insights, Qiagen, Hilden, Germany). Bohužel, od roku 2018 toto propojení s HGMD Professional již přestalo být dostupné kvůli změnám vlastníků firem, proto jsme přešli na jiný nástroj, a to Ingenuity Variant analysis (Qiagen, Hilden, Germany).

Z volně dostupných nástrojů anotace jsme pak využívali aplikaci Annovar (Wang et al. 2010), tento nástroj jsme implementovali do vlastního bioinformatického postupu (tzv. „pipeline“).

Dále jsme používali pokročilejší způsoby anotace a filtrování dat, které jsou založeny zejména na analýze dle fenotypu pacienta, a to s použitím HPO termínů – Human Phenotype Ontology (dostupné na: <https://hpo.jax.org/app/>) (Kohler et al. 2019) a pomocí nástroje Exomiser (Robinson et al. 2014).

5) Prevalentní kauzální varianty

Pro některé geny jsme našli v naší populaci lokálně specifické prevalentní kauzální varianty. Tyto varianty bylo vhodné vyšetřovat i samostatným, cíleným testem. Proto jsme navrhli testování pomocí fragmentační analýzy nebo real-time PCR pro některé vybrané časté varianty – uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Vyšetření prevalentních variant ve vybraných genech

Gen	Varianta	Metoda	Počet vyšetřených pacientů
<i>SH3TC2</i> NM_024577.3	p.(Arg954Stop) c.2860C>T	Real-time PCR	412
<i>HINT1</i> NM_005340.6	p.(Arg37Pro) c.110G>C	Real-time PCR	746
<i>SORD</i> NM_003104.5	p.(Ala253Glnfs*27) c.757del	Fragmentační analýza	931
<i>MORC2</i> NM_001303256.3	p.(Arg252Trp) c.754C>T	RFLP	161

Legenda: RFLP – restriction fragment length polymorphisms analysis

Real-time PCR pro varianty v genech SH3TC2 a HINT1:

Principem použití real-time PCR pro detekci bodových variant v genech *SH3TC2* – p.(Arg954Stop) a *HINT1* – p.(Arg37Pro) je použití TaqMan®SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems – nyní LifeTechnologies, CA, USA).

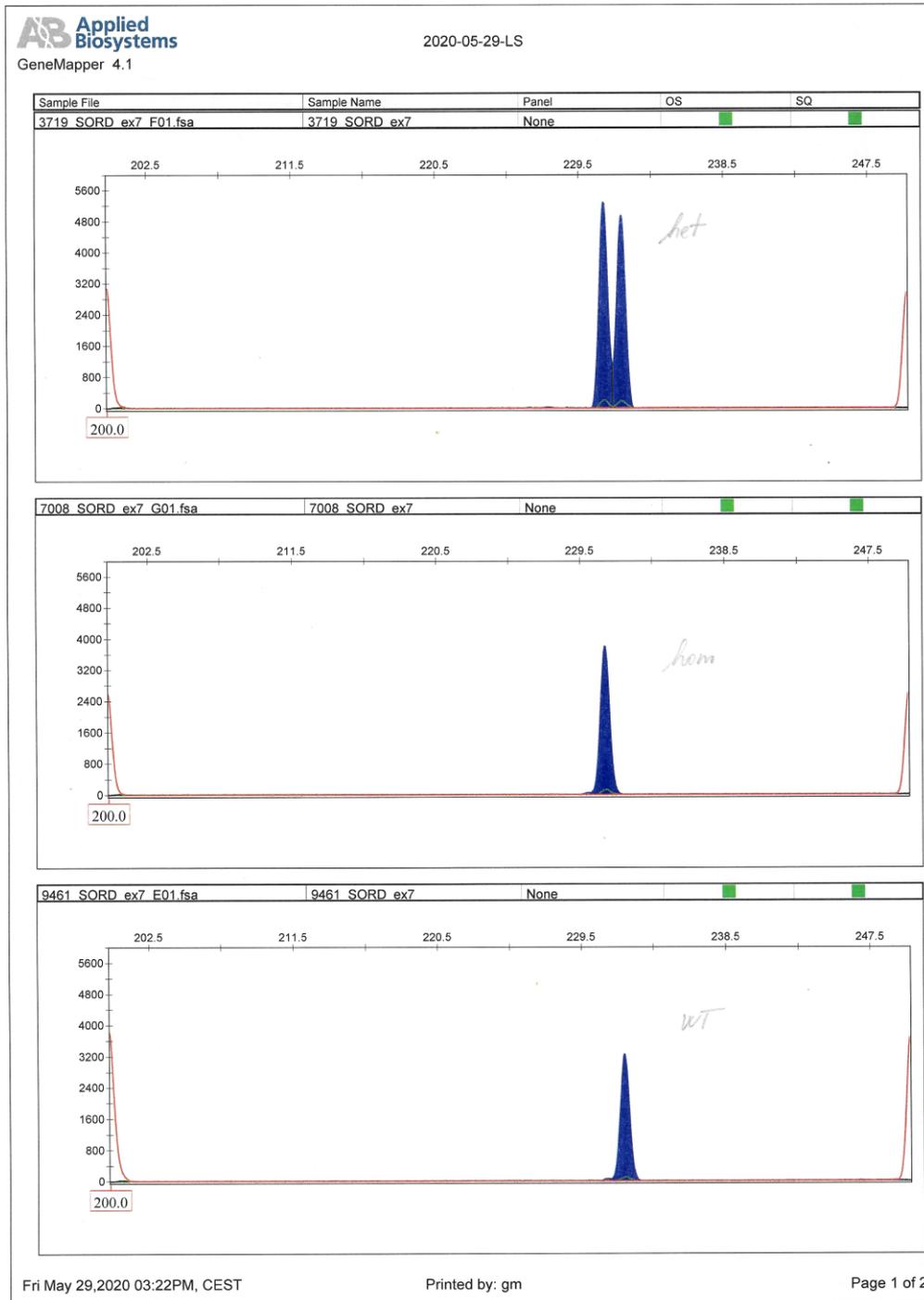
Fragmentační analýza pro variantu c.757del v genu SORD:

Pro fragmentační analýzu jsme použili genově specifický (amplifikuje gen *SORD* a ne pseudogen *SORD2P*) fluorescenčně značený primer v kombinaci s neznačeným primerem. Po amplifikaci běžným způsobem byly vzorky analyzovány na přístroji ABI3130 a kapilární elektroforézou rozděleny na jednotlivé fragmenty dle relativní délky.

Jelikož varianta v genu *SORD*, kterou jsme vyšetřovali, je jednonukleotidová delece, výsledek měl tři možné podoby: byl detekován pouze fragment o délce 230bp (wild type homozygot), pouze fragment o délce 229bp (homozygot pro deleci c.757del)

anebo byly detekovány dva píky, jeden o délce 229bp a jeden o délce 230bp (heterozygot).
Ukázku výsledku znázorňuje obrázek 4.

Obrázek 4: Ukázka fragmentační analýzy pro variantu c.757del v genu SORD



Legenda: Amplifikace se SORD specifickými primery vede ke vzniku dvou produktů o různé délce pro heterozygota, produktu o kratší délce pro homozygota s delecí a produktu o normální délce pro homozygota wild type.

Restrikční štěpení PCR produktu pro detekci varianty p.(Arg252Trp) v genu MORC2

Pro vyšetření velkého počtu pacientů (161) na přítomnost mutace p.(Arg252Trp) v *MORC2* (NM_001303256.3) genu jsme zvolili přístup pomocí štěpení PCR produktu restrikčním enzymem HpaII od firmy NewEnglandBiolabs (MA, USA).

Poznámka: V původním článku (Sevilla, et al. 2016), a pak i v našem autorském článku je tato varinta označená jako p.(Arg190Trp) dle NM_014941.3(MORC2):c.568C>T. Nyní je shoda v používání NM_001303256.3, a proto název varianty je NM_001303256.3(MORC2):c.754C>T nebo-li p.(Arg252Trp).

4. VÝSLEDKY

Výsledky této práce přispěly k objasnění příčiny DĚN u celkem asi 190 pacientů ze 170 rodin v ČR. Jde o vzácné příčiny.

V naší unikátní databázi všech pacientů s DĚN z celé ČR máme v současné době celkem 2313 pacientů s objasněnou příčinou DĚN. Nejčastější příčinou DĚN v našem souboru je duplikace/delece oblasti genu *PMP22*. Duplikace byla prokázána u 900 pacientů (39 % objasněných pacientů) a delece svědčící pro HNPP u 567 pacientů (24,5 %). Celkem tedy až 62,5 % objasněných pacientů je objasněno pomocí základní metody cílené na detekci duplikací/delecí v lokusu 17p12. CMT1A/HNPP je tedy nejčastější příčinou DĚN, a to nejen v ČR, ale i celosvětově (Nelis et al. 1996).

Ze zbylé skupiny pacientů s objasněnou příčinou DĚN (846) tvoří velkou část pacienti s kauzálními variantami v několika málo nejčastějších genech (bodové mutace *PMP22* = 31, *MPZ* = 92, *GJB1* = 231, *MFN2* = 67, tyto 4 nejčastější příčiny spolu tvoří až 18,2 % všech objasněných pacientů = 421).

Tento postup diagnostiky, kdy nejdříve budou vyšetřeny nejčastější příčiny, je racionální a bude i nadále zachován, protože je efektivní – tyto příčiny tvoří podíl více než 80 % ze všech objasněných pacientů s DĚN.

Pak je tady ale relativně velká skupina pacientů, u nichž příčina nemoci zůstane neobjasněna i po vyšetření této základní baterie testů.

A u těch je potřeba doplnit další testy. V současné době jde zejména o MPS panelu genů či celoexomové sekvenování. V některých případech lze s výhodou použít rychlé testy na prevalentní mutace, a to zejména v genech *MORC2*, *HINT1*, *SH3TC2* nebo *SORD*.

Pro tyto prevalentní varianty jsme provedli rozsáhlé testování, počty vyšetřených pacientů a počty nalezených variant jsou uvedeny v **tabulce 5**.

Tabulka 5: Počty pacientů vyšetřených na jednotlivé prevalentní varianty

Gen	Varianta	Počet vyšetřených pacientů	Počet pacientů s prokázanou variantou
<i>SH3TC2</i>	p.Arg954Stop	412	8 (2x HET, 6x HOM)
<i>HINT1</i>	p.Arg37Pro	746	11 (6xHET, 5xHOM)
<i>SORD</i>	c.757del	931	17 (10x HET, 7xHOM)
<i>MORC2</i>	p.Arg190Trp	161	1 (HET)

Na zavedení všech těchto metod jsem se podílela a většinu z nich i prováděla. U dat z MPS jsem se podílela na hodnocení dat a optimalizaci pipeline – tedy nástrojů pro hodnocení dat. Tyto metodiky společně vedly k objasnění příčiny DěN u více než 190 pacientů. Výsledky této práce přispěly k objasnění příčiny DěN u celkem asi 8,4 % všech objasněných pacientů s DěN.

Přehledné shrnutí počtu provedených testů a objasnitelnosti je v **tabulce 6** níže.

Tabulka 6: Celkový počet prokázaných kauzálních variant pomocí nových metod

Metodika – typ vyšetření	Počet vyšetřených pacientů	Počet objasněných s prokázanou kauzální variantou		Pozitivní záchyt v %	Podíl ze všech objasněných v ČR (2313) v %
		– pacienti	– rodiny		
MPS panel genů	299	81	81	27,09	3,50
MPS – WES	102	24	22	23,52	1,03
p.Arg954Stop (<i>SH3TC2</i>)		28	24		1,21
p.Arg37Pro (<i>HINT1</i>)		30	27		1,29
c.757del (<i>SORD</i>)		18 (3)	16		0,78
p. Arg190Trp (<i>MORC2</i>)		8 (3)	6 (3)		0,22
Klasické sekvenování (u dalších vybraných pacientů dle fenotypu)		<i>ATP1A1</i> : 18 (2)	2 (2)		0,69
Součet		196 pacientů	170 rodin		8,4

Legenda:

Počet vyšetřených pacientů je uveden pro provedená vyšetření MPS panel genů a WES. Počet není uveden u jednotlivých genů, protože zde dochází k překryvu více metod, vyšetření na přítomnost prevalentní varianty, klasické Sangerovo sekvenování a hodnocení dat z WES. Číslo v závorce popisuje počet pacientů s kauzální variantou v daném genu, která byla zachycena nejdříve pomocí WES, a následně ověřena další metodou.

Jednotlivé výsledky jsou uvedeny přehledně níže. Ke každému výsledku byl publikován článek v impaktovaném časopisu, tyto práce jsou v příloze, kam pro detaily odkazujeme.

Publikační výstupy a získané výsledky jsou rozděleny do několika skupin:

- 1) Zavedení MPS a souhrn získaných výsledků (příloha č. 1).
- 2) Studie zaměřené na jednotlivé geny: práce, které podrobně stanovují a popisují spektrum kauzálních mutací a genů způsobujících dědičné neuropatie. Bylo možné upřesnit neurologická kritéria s mutacemi v jednotlivých genech, korelace genotyp-fenotyp (přílohy č. 2- 9).
- 3) Nové příčiny DĚN (příloha č. 10).
- 4) Studie zaměřené na komplexní fenotypy (přílohy č. 11- 13).
- 5) Bioinformatické práce (přílohy č. 14-16).

Uvádím zde pouze práce, kde jsem prvním, korespondujícím nebo posledním autorem. Ze spoluautorských prací jsou uvedeny pouze dvě vybrané publikace. Spoluautorsky jsem se podílela na dalších významných článcích s tématem DĚN, ty zde ale nebylo možné uvést s ohledem na přehlednost samotné práce.

PŘÍLOHA 1

LASSUTHOVA, P., D. SAFKA BROZKOVA, M. KRUTOVA, J. NEUPAUEROVA, J. HABERLOVA, R. MAZANEC, P. DRIMAL AND P. SEEMAN. **Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis.** Orphanet J Rare Dis, Aug 22 2016, 11(1), 118.

Zavedli jsme postup, laboratorní i bioinformatický, pro cílené masivně paralelní sekvenování (MPS nebo také NGS) pro diagnostiku a objasňování příčin méně častých typů dědičné neuropatie.

Výsledky uvedené v článku jsou založené na datech získaných v období 2012-2016. V rámci projektu jsme vyšetřili pomocí masivně paralelního sekvenování panelu všech dosud známých genů spojených s dědičnou neuropatií **198 pacientů** s dědičnou neuropatií, a to postupně pomocí 5 rozšiřovaných verzí genových panelů se stále se zvyšujícím počtem genů. Nejspíše patogenní a kauzální mutace jsme prokázali u **51 pacientů (26 %)**. U dalších 31 pacientů byly prokázány varianty, které mohou, ale nemusí, být kauzální pro dědičnou neuropatii. Nejčastěji byly pravděpodobně kauzální mutace prokázány v genech: *MFN2* – 9×, *GJB1* – 5×, *BSCL2* – 3×, *SH3TC2* – 3×.

Kauzální mutace jsme prokázali v 25 genech z celkem 93 vyšetřených. U většiny genů s nalezenými kauzálními mutacemi byly mutace prokázány pouze u jediného pacienta (13 genů), nebo někdy u dvou (6 genů). To vše jasně opodstatňuje využití MPS jako toho času jediný efektivní postup pro diagnostiku a detekci vzácnějších typů dědičné neuropatie (ale i dalších geneticky heterogenních skupin dědičných chorob) oproti dřívějšímu sekvenování klasicky jednotlivých genů s velmi nízkou šancí na záchyt kauzální mutace.

Do roku 2019 jsme pokračovali ve vyšetřování MPS panelu genů, nyní máme vyšetřených **299 pacientů s DĚN**, z toho u **81 pacientů** byla tímto způsobem objasněna příčina nemoci (26 %). Od roku 2020 jsme již přešli na vyšetření pomocí WES a následnou analýzu virtuálního panelu genů.

PŘÍLOHA 2

LASSUTHOVA, P., D. S. BROZKOVA, M. KRUTOVA, J. NEUPAUEROVA, J. HABERLOVA, R. MAZANEC, N. DVORACKOVA, Z. GOLDENBERG AND P. SEEMAN. **Mutations in HINT1 are one of the most frequent causes of hereditary neuropathy among Czech patients and neuromyotonia is rather an underdiagnosed symptom.** *Neurogenetics*, Jan 2015, 16(1), 43-54.

Článek v časopise *Neurogenetics* popisuje náš významný a prioritní objev, že mutace v *HINT1* genu, způsobující autozomálně recesivní (AR) typ axonální a převážně motorické neuropatie s neuromyotonií, jsou jednou z nejčastějších příčin dědičné neuropatie v České republice.

V článku popisujeme typický fenotyp s neurologickými i elektrofyziologickými nálezy. U většiny pacientů lze cíleným vyšetřením zjistit projevy neuromyotonie – poruchu dekontrakce po usilovném stisku ruky, což dosud nebylo zjišťováno nebo správně interpretováno, podobně jako elektrofyziologické nálezy. U mladších pacientů jde typicky o čistě motorickou axonální neuropatii, koncem 2. dekády a později se přidává i porucha čítí a elektrofyziologické nálezy prokazují abnormality senzitivních neurogramů.

PŘÍLOHA 3

SEDIVA, M., P. LASSUTHOVA, J. ZAMECNIK, L. SEDLACKOVA, P. SEEMAN AND J. HABERLOVA. **Novel variant in the *KCNK9* gene in a girl with Birk Barel syndrome.** Eur J Med Genet, Jan 2020, 63(1), 103619.

Práce popisuje pacientku s Birk Barelovým syndromem, u které jsme prokázali variantu v genu *KCNK9* pomocí celoexomového sekvenování.

U pacientky jsme prokázali dosud nepopsanou variantu:

cDNA Level: **NM_001282534.1:c.710C>A**

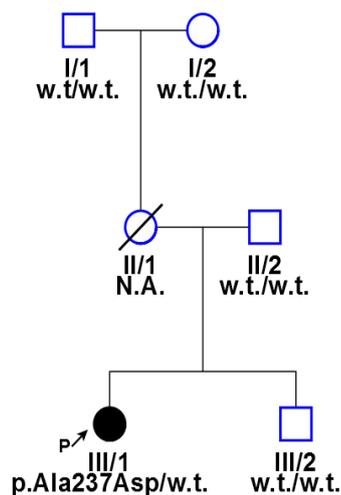
gDNA Level: **Chr8(GRCh37):g.140630916G>T**

Protein Level: **p.(Ala237Asp)**

(Hodnoceno nástrojem Alamut Visual, version 2.14, SOPHiA Genetics, Lausanne, Switzerland)

Obrázek 5: Rodokmen pacientky s variantou v genu *KCNK9*

Family *KCNK9*



Legenda k obrázku 5:

Gen *KCNK9* podléhá imprintingu a je utlumen na paternální alele. Varianta nebyla prokázána u zdravého otce. DNA od matky nebyla k dispozici. Dovyšetření maternálních prarodičů ukázalo, že ani jeden z nich není nositelem varianty. Varianta proto pochází nejspíše od matky probandky, anebo je vzniklá de novo.

Použité znaky: čtverec – muž; kruh – žena; prázdný symbol – nepostižený; plný černý symbol – postižený; šipka – proband.

Vzhledem k výše uvedenému považujeme variantu za příčinu obtíží u probandky.

PŘÍLOHA 4

LASSUTHOVA, P., D. SAFKA BROZKOVA, J. NEUPAUEROVA, M. KRUTOVA, R. MAZANEC AND P. SEEMAN. **Confirmation of the GNB4 gene as causal for Charcot-Marie-Tooth disease by a novel de novo mutation in a Czech patient.** *Neuromuscul Disord*, Jan 2017, 27(1), 57-60.

U pacienta s hereditární motoricko a senzitivní neuropatií demyelinizačního typu (HMSN typ I) jsme prokázali variantu p.Lys57Glu v *GNB4* genu. Spojitost *GNB4* s AD CMT byla objevena až v roce 2013 a jsou popsány pouze 2 mutace ze dvou rodin v jediné originální publikaci (Soong et al. 2013). Námi nalezená mutace je tedy teprve 3. dosud popsanou mutací v tomto genu v dosud 3. rodině celosvětově. Nalezená mutace nebyla prokázána u zdravých rodičů pacienta ani u jeho zdravého bratra, je tedy nejspíše de novo vzniklá.

Tato kasuistika ukazuje, že i pacienti vyšetření pomocí panelu genů mohou mít mutace v genech zcela nedávno objevených a je tedy smysluplné vyšetření panelu v dalších rozšířenějších verzích s odstupem opakovat nebo využít WES a data pravidelně opakovaně vyhodnocovat.

PŘÍLOHA 5

LASSUTHOVA, P., K. VILL, S. ERDEM-OZDAMAR, J. M. SCHRODER, H. TOPALOGLU, R. HORVATH, W. MULLER-FELBER, B. BANSAGI, B. SCHLOTTER-WEIGEL, D. GLASER, J. NEUPAUEROVA, L. SEDLACKOVA, D. STANEK, R. MAZANEC, J. WEIS, P. SEEMAN AND J. SENDEREK. **Novel SBF2 mutations and clinical spectrum of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2.** Clin Genet, Nov 2018, 94(5), 467-472.

Tato práce je klinická studie a fenotypovo-genotypová analýza. Jde o podrobnou specifikaci fenotypu a genotypů u pacientů v důsledku mutací v genu *SBF2*.

Bialelické mutace v genu *SBF2* jsou příčinou autosomálně recesivně dědičné formy DĚN, která je charakterizována demyelinizační neuropatií a glaukomem (CMT4B2) (Senderek, et al. 2003c).

Popisujeme deset pacientů ze sedmi rodin, u kterých jsme prokázali až 9 různých variant v genu *SBF2*. Jde o unikátní soubor pacientů ze 4 zemí.

PŘÍLOHA 6

LASSUTHOVA, P., R. BEHARKA, M. KRUTOVA, J. NEUPAUEROVA AND P. SEEMAN. ***COX6A1* mutation causes axonal hereditary motor and sensory neuropathy - the confirmation of the primary report.** Clin Genet, Apr 2016, 89(4), 512-514

Článek v časopise Clinical Genetics popisuje pacientku se závažnou neuropatií, u které jsme prokázali homozygotní mutaci v genu pro *COX6A1*. Mutace v genu *COX6A1* byly prokázány teprve nedávno jako příčina dědičné neuropatie u dvou rodin z Japonska (AJHG, 2014). Naše publikace popisuje teprve 3. rodinu se 4. pacientkou celosvětově, čímž potvrzujeme kauzalitu mutací v *COX6A1* genu pro dědičnou neuropatii. Naše práce je první zprávou o mutacích v *COX6A1* kromě původní publikace z Japonska.

Exon 3 genu *COX6A1* byl vyšetřen u 20 dalších českých pacientů klasickým sekvenováním pouze exonu 3. Tento gen byl již také zařazen do designu (č. 4 a č. 5), tímto způsobem byl gen vyšetřen již u 87 dalších pacientů. Mutace c. 247-7_247-3del nebyla u nikoho z nich prokázána.

PŘÍLOHA 7

LASSUTHOVA, P., D. SAFKA BROZKOVA, M. KRUTOVA, R. MAZANEC, S. ZUCHNER, M. A. GONZALEZ AND P. SEEMAN. **Severe axonal Charcot-Marie-Tooth disease with proximal weakness caused by de novo mutation in the *MORC2* gene.** Brain, Apr 2016, 139(Pt 4), e26.

V časopise Brain (Sevilla, et al. 2016) byl publikován článek o mutacích v genu *MORC2*, které způsobují CMT2. Na základě této práce jsme reanalyzovali naše data z WES u pacientů s dosud neobjasněnou příčinou CMT. U jednoho našeho pacienta jsme našli stejnou mutaci (p.R190W) jako v původním článku autorů Sevilla, et al. Mutaci jsme následně potvrdili Sangerovým sekvenováním a taktéž jsme vyšetřili oba rodiče na přítomnost uvedené mutace. Ani u jednoho rodiče nebyla mutace nalezena, mutace je proto u pacienta nejspíše de novo vzniklá. Fenotyp pacienta je podobný tomu, co popisují autoři ve své původní práci. To vše spolu svědčí o patogenním charakteru a kauzalitě této mutace. Tyto naše výsledky potvrzují práci autorů Sevilla et al (Sevilla, et al. 2016). Je to významný objev i pro další diagnostiku pacientů s CMT2, protože fenotyp je klinicky rozpoznatelný, vybraní pacienti by proto měli být testováni na přítomnost této mutace. Taktéž jsme načrtli, že se pravděpodobně jedná o relativně častou formu CMT2, což se následně potvrdilo, když byly v navazujícím období publikovány další práce dosvědčující tyto výsledky.

Tato naše práce ukazuje, že data z MPS, u kterých dosud nebyla nalezena kauzální varianta, je vhodné reanalyzovat, a to opakovaně, dle nových poznatků.

Dále bylo vyšetřeno 160 pacientů z naší databáze na přítomnost prevalentní mutace v *MORC2* genu, mutace byla prokázána u jedné další pacientky.

PŘÍLOHA 8

SANCHO, P., L. BARTESAGHI, O. MIOSSEC, F. GARCIA-GARCIA, L. RAMIREZ-IMENEZ, A. SIDDELL, E. AKESSON, E. HEDLUND, P. LASSUTHOVA, S. I. PASCUAL-PASCUAL, T. SEVILLA, M. KENNERSON, V. LUPO, R. CHRAST AND C. ESPINOS. **Characterization of molecular mechanisms underlying the axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by MORC2 mutations.** Hum Mol Genet, May 15 2019, 28(10), 1629-1644.

Tato práce navazuje na původní studie, ve kterých byli popsáni pacienti s kauzálními variantami v genu *MORC2*. Cílem práce bylo objasnit mechanismus, kterým varianty v genu *MORC2* způsobují axonální neuropatii.

Byla studována exprese isoform MORC2, a bylo ukázáno, že predominantním transkriptem v nervové tkáni je NM_001303256. U myšího modelu byl studován expresní profil během vývoje. Byla také provedena charakterizace fibroblastů získaných od pacientů s kauzální variantou p.(R252W), ale i dalších variant, zejména varianty p.(S87L).

PŘÍLOHA 9

LAŠŠUTHOVÁ, P., MAZANEC R., STANĚK D., SEDLÁČKOVÁ L., PLEVOVÁ P., HABERLOVÁ J. AND P. SEEMAN.

Biallelic variants in the *SORD* gene are one of the most common causes of hereditary neuropathy among Czech patients.

Submitted, 2020

Přijato k tisku: Scientific reports, 2021 (IF:4,1)

V roce 2020 byla popsána autosomálně recesivně dědičná forma axonální DĚN způsobená bialelickými variantami v genu *SORD*. Jde o relativně častou příčinu DĚN, prevalentní varianta NM_003104.5(*SORD*):c.757del dosud unikala identifikaci pro vysokou shodu genu *SORD* a pseudogenu *SORD2P*.

Nalezli jsme až 18 pacientů z 16 nepříbuzných rodin s bialelickými patogenními nebo pravděpodobně patogenními variantami. Varianta c.757del byla prokázána u devíti pacientů v homozygotním stavu a u dalších devíti pacientů v heterozygotním stavu v kombinaci s jinou variantou (u šesti pacientů již dříve popsaná c.458C>A, a pak vždy u jednoho pacienta tyto dosud nepopsané varianty: c.218C>T, c.503G>A a c.553G>A). Dále bylo nalezeno šest heterozygotních nosičů varianty c.757del bez průkazu další varianty na druhé alele genu *SORD*. Celkem byla nejčastější (prevalentní) varianta c.757del prokázána v 79 % patogenních alel (33 alel). Všichni pacienti jsou nosiči prevalentní varianty c.757del alespoň na jedné alele genu *SORD*. Vyšetření varianty c.757del sekvenováním exonu 7 genu *SORD* by mělo odhalit všechny pacienty s kauzálními bialelickými variantami v genu *SORD*.

Klinické obtíže jsou u všech pacientů podobné – axonální periferní neuropatie se začátkem ve druhé nebo třetí dekádě života. U pacientů jsou výrazné atrofie svalstva dolních končetin distálně, svalová slabost a deformity nohy typu pes cavus.

V této rozsáhlé studii jsme prokázali, že autosomálně recesivně dědičná neuropatie způsobená bialelickými variantami v genu *SORD* je u pacientů v ČR častá – jedná se o třetí nejčastější autosomálně recesivně dědičnou formu.

PŘÍLOHA 10

SENDEREK, J., P. LASSUTHOVA, D. KABZINSKA, L. ABREU, J. BAETS, C. BEETZ, G. J. BRAATHEN, D. BRENNER, J. DALTON, L. DANKWA, T. DECONINCK, P. DE JONGHE, B. DRAGER, K. EGGERMANN, M. ELLIS, C. FISCHER, T. STOJKOVIC, D. N. HERRMANN, R. HORVATH, H. HOYER, S. IGLSEDER, M. KENNERSON, K. KINSLECHNER, J. N. KOHLER, I. KURTH, N. G. LAING, P. J. LAMONT, W. LOSCHER, A. LUDOLPH, W. MARQUES, JR., G. NICHOLSON, R. ONG, S. PETRI, G. RAVENSCROFT, A. REBELO, G. RICCI, S. RUDNIK-SCHONEBORN, A. SCHIRMACHER, B. SCHLOTTER-WEIGEL, L. SCHOELS, R. SCHULE, M. SYNOFZIK, B. FRANCOU, T. M. STROM, J. WAGNER, D. WALK, J. WANSCHITZ, D. WEINMANN, J. WEISHAUP, M. WIESSNER, R. WINDHAGER, P. YOUNG, S. ZUCHNER, S. TOEGEL, P. SEEMAN, A. KOCHANSKI AND M. AUER-GRUMBACH. **The genetic landscape of axonal neuropathies in the middle-aged and elderly: Focus on MME.** *Neurology*, Nov 3 2020.

V této práci, která je mezinárodní studií, se věnujeme objasňování příčin DĚN u pacientů s pozdním začátkem (po 40. roce života). Jde o dosud marginalizovanou skupinu pacientů, které nebyla vzhledem k obtížnosti diagnostiky a překrývání se DĚN se skupinou získaných neuropatií věnována náležitá pozornost.

Ukázali jsme, že jsou v této skupině nejčastější příčinou DĚN kauzální varianty v genu *MME*, čímž jsme potvrdili původní studii (Auer-Grumbach et al. 2016). Popsali jsme spektrum a frekvenci variant v genu *MME*. Taktéž byly nalezeny kauzální varianty v dalších genech: *TTR*, *LRSAMI* a *MPZ*.

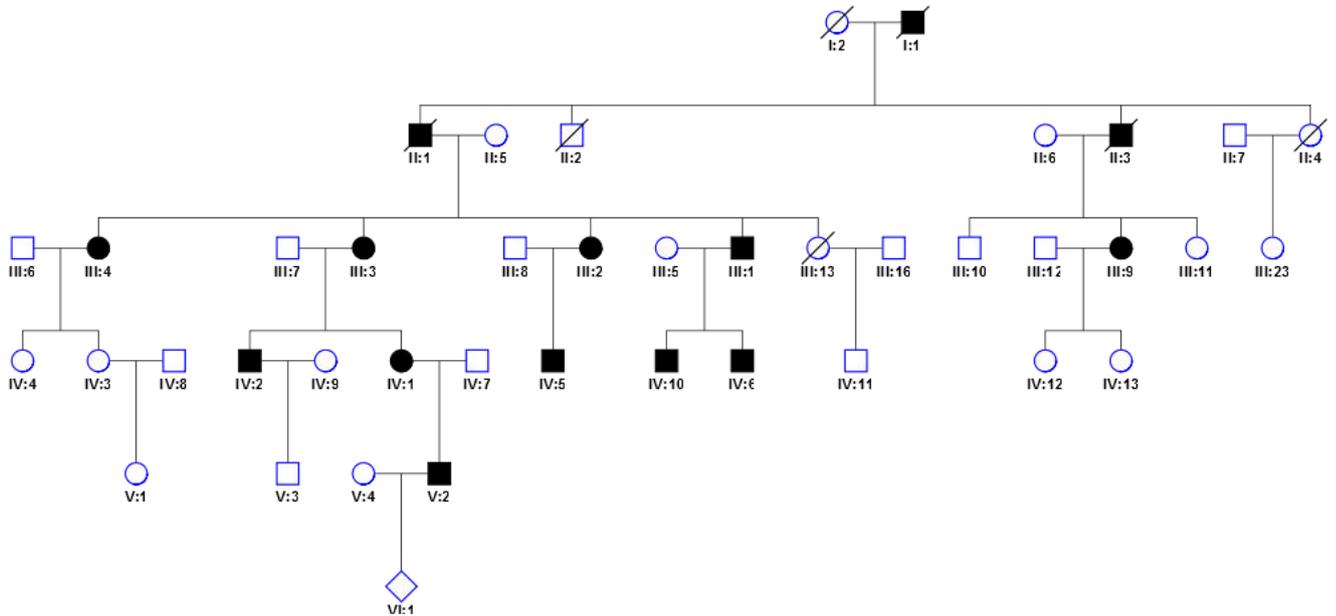
PŘÍLOHA 11

LASSUTHOVA, P., A. P. REBELO, G. RAVENSCROFT, P. J. LAMONT, M. R. DAVIS, F. MANGANELLI, S. M. FEELY, C. BACON, D. S. BROZKOVA, J. HABERLOVA, R. MAZANEC, F. TAO, C. SAGHIRA, L. ABREU, S. COUREL, E. POWELL, E. BUGLO, D. M. BIS, M. F. BAXTER, R. W. ONG, L. MARNS, Y. C. LEE, Y. BAI, D. G. ISOM, R. BARRO-SORIA, K. W. CHUNG, S. S. SCHERER, H. P. LARSSON, N. G. LAING, B. O. CHOI, P. SEEMAN, M. E. SHY, L. SANTORO AND S. ZUCHNER. **Mutations in ATP1A1 Cause Dominant Charcot-Marie-Tooth Type 2.** *Am J Hum Genet*, Mar 1 2018, 102(3), 505-514.

Významným výsledkem vynikající mezinárodní úrovně je náš článek, který popisuje objev nové příčiny dědičné neuropatie v důsledku mutací genu *ATP1A1* (článek v *American Journal of Human Genetics*), kde byla původní rodinou česká rodina s CMT2, vyšetřovaná naším pracovištěm již od roku 2000 (**Obrázek 6**).

Díky mezinárodní spolupráci v rámci platformy Genesis (Gonzalez et al. 2015) (<https://www.tgp-foundation.org/>) bylo nalezeno celkem až sedm rodin s dědičnou neuropatií způsobenou patogenní variantou v genu *ATP1A1*.

Obrázek 6: Rodokmen původní české rodiny s variantou v genu ATP1A1



Legenda k obrázku: Použité znaky: čtverec – muž; kruh – žena; prázdný symbol – nepostížený; plný černý symbol – postižený; šipka – proband

PŘÍLOHA 12

LASSUTHOVA, P., D. SISKOVA, J. HABERLOVA, I. SAKMARYOVA, A. FILOUS AND P. SEEMAN. **Congenital cataract, facial dysmorphism and demyelinating neuropathy (CCFDN) in 10 Czech Gypsy children--frequent and underestimated cause of disability among Czech Gypsies.** Orphanet J Rare Dis, Apr 1 2014, 9, 46.

Článek je souhrnná práce, v níž popisujeme 10 pacientů se syndromem CCFDN: Hereditární neuropatie s kongenitální kataraktou a faciální dysmorfii. Tento syndrom se vyskytuje pouze u pacientů romského etnika, molekulárním podkladem je intronová varianta v genu *CTDPI* (c.863+389C>T), pacienti jsou homozygoty pro tuto variantu.

Syndrom byl poprvé popsán v roce 1999 (Angelicheva et al. 1999; Tournev et al. 1999), v roce 2003 byla identifikována kauzální varianta (Varon et al. 2003). Od té doby bylo publikováno několik málo pacientů, kromě původní studie vesměs izolované případy. Nami publikovaný soubor 10 pacientů je unikátní jak velikostí souboru, tak tím, že prezentuje data od dětských – pediatrických pacientů.

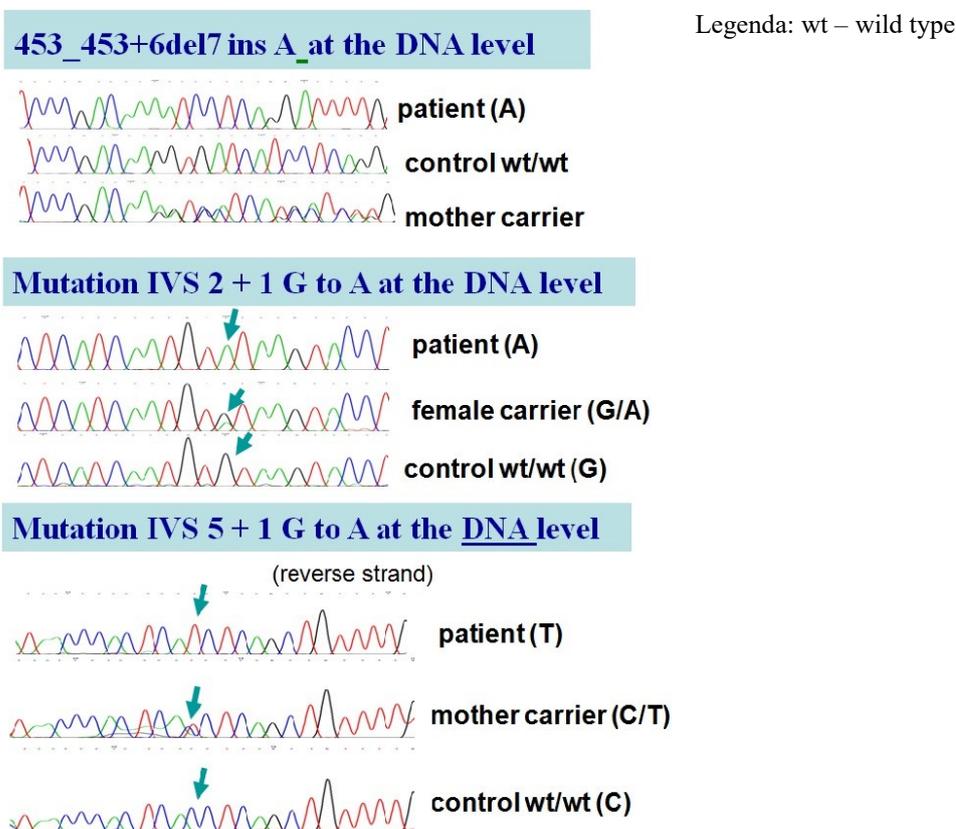
PŘÍLOHA 13

LASSUTHOVA, P., M. ZALIOVA, K. INOUE, J. HABERLOVA, K. SIXTOVA, I. SAKMARYOVA, K. PADEROVA, R. MAZANEC, J. ZAMECNIK, D. SSKOVA, J. GARBERN AND P. SEEMAN. **Three new PLP1 splicing mutations demonstrate pathogenic and phenotypic diversity of Pelizaeus-Merzbacher disease.** J Child Neurol, Jul 2014, 29(7), 924-931.

Pelizaeus Merzbacherova choroba je onemocnění způsobené kauzálními variantami v genu *PLP1*, který se nachází na X-chromozomu. Klinicky jde o poruchu centrální myelinizace. Gen *PLP1* má dva transkripty: PLP1 a DM20 (Inoue 2005).

V práci popisujeme 3 v té době nepopsané varianty, které mění RNA sestřih. Ukazujeme, jaký je vztah mezi změnou sestřihu, tvorbou transkriptu a tíží postižení.

Obrázek 7: Tři námi popisované varianty, které ovlivňují RNA sestřih.



PŘÍLOHA 14

NEUPAUEROVA, J., D. GRECMALOVA, P. SEEMAN AND P. LASSUTHOVA.
Massively Parallel Sequencing Detected a Mutation in the MFN2 Gene Missed by Sanger Sequencing Due to a Primer Mismatch on an SNP Site. *Ann Hum Genet*, May 2016, 80(3), 182-186.

Nejčastějším typem axonální dědičné neuropatie s autosomálně dominantní ddičností je Charcot-Marie-Tooth neuropatie typu 2A (CMT2A) způsobená mutacemi v genu mitofusin 2 (*MFN2*).

U pacientů pozorujeme časný nástup obtíží, většinou v první životní dekádě. Onemocnění má progresivní charakter, rozvíjí se distální svalová slabost.

V práci popisujeme pacienta, který k nám byl odeslán pro rozvoj axonální neuropatie se začátkem obtíží kolem třetího roku věku.. Podobné obtíže byly popisovány i u matky probanda.

Provedli jsme Sangerovo sekvenování všech kódujících exonů genu *MFN2*. Variantu, která by mohla objasnit příčinu potíží u probanda jsme nenalezli. Následně bylo provedeno MPS panelu genů, které detekovalo variantu c.1081C>T; p.(His361Tyr) v *MFN2* genu.

Byly manuálně porovnány sekvencí z MPS panelu genů (.bam files/soubory) s elektroferogramy. Ukázalo se, že pod sekvencí v té době používaného PCR primeru pro exon 11 v *MFN2* genu je single nukleotid polymorfism (dbSNP: rs2236057). To vedlo k alelickému dropout-u, došlo k výpadku amplifikace na jedné alele. MPS panelu genů je užitečný nástroj i pro odhalení podobných úskalí. Článek také poukazuje na důležitost a potřebu speciální pozornosti při navrhování primerů pro PCR amplifikaci.

PŘÍLOHA 15

STANEK, D., D. M. BIS-BREWER, C. SAGHIRA, M. C. DANZI, P. SEEMAN, P. LASSUTHOVA AND S. ZUCHNER. **Prot2HG: a database of protein domains mapped to the human genome.** Database (Oxford), Jan 1 2020, 2020.

Databáze je dostupná na adrese: <http://prot2hg.com/>.

Interpretace dat z WES je náročný proces, v rámci kterého se hodnotí charakter (benigní/patogenní) jednotlivých variant. Rozmanité anotační nástroje nám umožňují získat co nejvíce informací o každé variantě, a tím se kvalifikovaně rozhodnout. V práci popisujeme vytvoření nástroje, který pomáhá určit, zda daná varianta se nachází v konkrétní proteinové doméně. Dále ukazujeme význam této anotace pro hodnocení na datech z databáze ClinVar (Landrum et al. 2020).

PŘÍLOHA 16

STANEK, D., L. SEDLACKOVA, P. SEEMAN, D. SAFKA BROZKOVA AND P. LASSUTHOVA. **Whole-Exome Sequencing in Czech Patients with Neurogenetic Diseases**. *Genet Test Mol Biomarkers*, May 2020, 24(5), 264-273.

Vytvořili jsme databázi dat z WES (analyzováno 222 pacientů). Databáze je v omezené míře dostupná na <http://prot2hg.com/variantbrowser/>, kde je možné dohledat která varianta ve kterém genu je jak početně zastoupená v našem souboru dat z WES.

Databáze slouží zejména pro analýzu dat, k odfiltrování častých a falešně pozitivních variant.

Taktéž slouží k rychlé reanalýze dat; v situaci, kdy je publikován nový gen – asociace s nemocí. V takovém případě lze jednoduše zkontrolovat všechna dostupná data na přítomnost variant v hledaném genu. Tento přístup jsme opakovaně úspěšně využili – pro hledání variant v genu *MORC2*, *SORD* či jiných.

5. DISKUZE

Vyšetření základních typů DĚN (CMT1A/HNPP, *MPZ*, *MFN2* a *GJBI*) objasní naprostou většinu pacientů – v naší kohortě až 80 % ze všech objasněných pacientů. Proto má význam používat tuto základní baterii testů i v době MPS. Jde o vyšetření relativně rychlá a levná, používají se metodiky MLPA a klasické sekvenování. Podobné výsledky jsou popisovány i jinde ve světě (Gess et al. 2013; Saporta et al. 2011).

Po provedení těchto základních testů ale pořád zůstává velká skupina s neobjasněnou příčinou DĚN. U těchto pacientů je výhodné provést MPS, a to formou cíleného panelu genů nebo celoexomového sekvenování.

5.1. POROVNÁNÍ PANELU GENŮ A CELOEXOMOVÉHO SEKVENOVÁNÍ (WES)

Od roku 2013 jsme u nás na pracovišti začali používat panel genů, který pokrýval kódující exony genů, jejichž varianty byly spojovány s DĚN. Začali jsme používat panel o velikosti 59 genů, který se postupně rozšiřoval až na 102 genů.

Tento přístup má své výhody i nevýhody.

Nesporným kladem byla dobrá kvalita získaných dat a pokrytí cílové oblasti, a to zejména ze začátku. Použitím chemikálií od firmy Agilent Technologies (CA, USA) (na principu custom design assay SureSelect) a sekvenování na vysokokapacitních strojích, které nejsou běžně v ČR dostupné (HiSeq 4000 a HiSeq X od firmy Illumina), bylo dosaženo uniformních a kvalitních výsledků.

Porovnání našich výsledků z hlediska kvality dat pro MPS panelu genů a WES je uvedeno v tabulce 7. Toto je stav z analýz do roku 2018.

Tabulka 7: Porovnání kvality dat

	Panel	WES
Pokrytí	99,9 %	95-98 %
Hloubka čtení	500-1000×	50-100×
Nepokryté oblasti	Cca 50 bp	Cca 1 000 000 bp

V našich podmínkách jsme pracovali s panely o velikosti kolem 100 genů, kapacita designu byla max. 0,5 Mbp. Jde rozsahem o středně velké panely. Opodstatněnost tohoto postupu je založená zejména na úvaze finanční – při zvyšování kapacity panelu na 200 nebo 300 genů roste cena samotného sekvenování, a to i dvojnásobně. Přitom je ale diagnostický přínos velkého panelu oproti středně velkému malý, a to proto, že naprostá většina kauzálních variant se nachází v malém počtu genů – v našem případě byly kauzální varianty nalezeny v 26 ze 102 genů: 80 % příčin je objasněno vyšetřením 20 % genů. Ostatní geny jsou v panelu zařazeny, ale varianty v těchto genech jsou velice vzácné. Navýšením počtu vzácných genů tedy výtěžnost zvýšíme jen minimálně. Podobné výsledky byly popsány i v jiných studiích (Trump et al. 2016). Na druhou stranu, snížit počet genů nebylo v našem případě žádoucí, protože by to nevedlo ke snížení ceny (cena designu zůstává stejná do rozsahu 0,5 Mbp), a naopak, ztratili bychom některé vzácnější diagnózy.

Vyšetření panelu genů spojených s určitou skupinou chorob se ukázvalo dlouho jako výhodnější oproti používání celoexomového sekvenování (WES), a to z několika důvodů. Jednak šlo o výrazně levnější řešení (vyšetření panelu genů stálo jen cca 20-30 % ceny WES), jednak byl v té době (do roku 2018) výrazný rozdíl v pokrytí oblastí, kdy u panelu dosahujeme pokrytí 100× u > 90 % cílových oblastí, ale u WES pokrytí pouze 100× u pouze 80 % oblastí.

Panel genů byl proto v tomto období zlatým standardem pro vyšetřování vzácných nemocí, které jsou geneticky heterogenní.

Další rozvoj metodiky MPS, včetně výrazného zlepšení v kvalitě sekvenátorů nové generace vedl k tomu, že bylo nutné zvážit výhody MPS panelu genů vs. WES.

Geny zařazený na panel jsme v pravidelných intervalech revidovali, a na základě nových informací byl připravován nový design. Vzhledem k rozvoji poznatků, bylo nutné design pro MPS panelu genů často kontrolovat a doplňovat. Toto lze považovat za určitou nevýhodu MPS panelu genů. Příprava nového designu je náročná časově. Taktéž to vedlo k situacím, kdy jeden pacient musel být opakovaně vyšetřen novější verzí MPS panelu genů pro dědičné neuropatie. Podobnou zkušenost uvádějí i autoři Seleman M. a kolektiv (Seleman et al. 2017). Ve své práci porovnávají možnosti využití MPS panelu genů a WES u pacientů s primárními imunodeficiencemi. Popisují, že potřeba aktualizace designu panelu genů je určitou limitací.

Taktéž, asi od roku 2018 pozorujeme výrazný posun v kvalitě získaných dat. Data z WES, která jsme měli v počátečním období (2015), mají horší kvalitu než ta získaná v roce 2019/2020. Je to dáno jednak samotným sekvenačním kitem (SureSelect verze 4 na začátku, nyní SureSelect V6), ale také a zejména výraznějším navýšením kvality a kapacity sekvenátorů. Námi používané sekvenátory nyní generují 10-12 GB dat pro jeden vzorek.

Úměrně tomu narůstá i hloubka pokrytí. Zároveň klesá cena WES a cena cíleného panelu genů zůstává stejná. V současné době jsou tedy oba dva typy vyšetření stejně drahé (250-300 EUR). Jak se měnila kvalita sekvenačních dat pro WES, je uvedeno v **tabulce 8**.

Tabulka 8: Změny v pokrytí a kvalitě dat z WES v posledních 5 letech v naší laboratoři

běh (run)_měsíc_rok	hloubka čtení		% cílové oblasti pokryto alespoň ×-krát			
	průměr	medián	5×	10×	20×	50×
WES_09_2020	163	138	97,48	96,9	95,81	90,06
WES_03_2020	182	142	99,41	98,74	97,24	88,92
WES_01_2020	141	118	97,26	96,52	94,98	86,3
WES_05_2019	137	119	97,53	96,95	95,88	89,59
WES_01_2018	124	109	98,17	97,2	94,66	81,67
WES_11_2017	46	39	97,78	95,13	82,92	36,74
WES_04_2017	70	63	97,9	96,57	91,98	63,47
WES_08_2015	96	58	89,74	83,63	73,95	54,22

Dalším důležitým aspektem je, že nyní již běžně zpracováváme data z WES, a není to problém ani bioinformatický, ani z hlediska ukládání dat, kde máme dostatečnou kapacitu datového úložiště.

Proto jsme nyní přistoupili k WES jako prvnímu testu, a to na základě těchto čtyř důležitých bodů:

- 1) stejná cena pro WES a cíleného MPS panelu genů,
- 2) výrazně lepší kvalita dat z WES, která sice pořád nedosahuje hloubku čtení jako u MPS panelu genů, ale nyní ji považujeme již za dostatečně kvalitní a validní,
- 3) bezproblémová možnost analýzy a ukládání dat z WES,
- 4) výrazně lepší objasnitelnost.

To znamená, že po provedení základní baterie testů provedeme MPS pomocí WES. Data v prvním kroku vyhodnocujeme jako virtuální panel genů a následně, pokud má rodina zájem a pacient vyjádřil svůj souhlas, data z WES otevíráme a hodnotíme tzv. „opened WES“. To nám umožní za jednu cenu a jedním zpracováním dat v bioinformatické pipeline získat oba dva typy výsledků – jak z panelu genů, tak z WES.

Tento přístup je potřebný zejména v dnešní době, kdy skokově narůstá počet genů asociovaných s daným onemocněním. Proto již odpadá nutnost nového custom designu pro knihovnu vždy, kdy je potřeba zařadit do panelu nové geny. Stačí upravit bed file a provést novou analýzu. Tento přístup má ale nesporné výhody i z jiného důvodu. Je stále více zřejmé, že je u mnoha pacientů obtížné přesné zařazení do klinické jednotky, mnohé jednotky se prolínají, příp. klinické projevy nejsou úplně jasné, anebo jde o kombinaci více důvodů.

U těchto pacientů je provedení WES analýzy zcela stěžejní, protože restriktivním zaměřením MPS panelu genů bychom u těchto pacientů nebyli schopni objasnit příčinu jejich obtíží. Tento přístup někdy umožní až tzv. reverse phenotyping, kdy až na základě genotypu pochopíme a správně interpretujeme pacientovy klinické obtíže. Tento přístup může výrazně zvýšit diagnostickou přesnost, jak dokládá například i studie provedena u 111 pacientů s nefrotickým syndromem (Landini et al. 2020).

Na druhou stranu, obavy ze snížené kvality dat při provedení WES a analýzy jako virtuální panel jsou oprávněné. Proto jsme provedli validační studie, sledovali jsme pokrytí v genech, které byly zařazeny i na panel, a porovnávali jsme, které exony těchto genů nemáme dobře pokryté. Ukázalo se, že jde průměrně o čtyři exony, které jsou při použití MPS panelu genů pokryty dostatečně a jejichž pokrytí je při použití WES menší než 20x. Je nutné si být vědom této imitace a tyto exony v průběhu analýzy manuálně kontrolovat. Taktéž lze doplnit klasické sekvenování těchto úseků, pokud to molekulární biolog uzná za vhodné.

Další opodstatněnou výhradou k použití WES je možnost náhodných nálezů, které nesouvisí s primárním onemocněním. Tato problematika byla řešena v rámci Evropské společnosti pro lidskou genetiku (ESHG – European Society of Human Genetics). Bylo vydáno doporučení (van El et al. 2013), které stanoví nutnost individuálně zvážit potřebu provedení WES místo cíleného panelu genů. Taktéž je diskutována možnost provedení WES a následné analýzy dat jako virtuální panel – tedy cílené hodnocení. Autoři ale upozorňují na to, že tento přístup může být někdy příliš restriktivní. I s ohledem na toto doporučení jsme zvolili postup, kdy data z WES hodnotíme jako virtuální panel genů. Cílovou oblast tohoto virtuálního panelu upravujeme bioinformatickou analýzou. Re-analýza vzorků probíhá v pravidelných

intervalech (á 6 měsíců). Následně, v případě potřeby, data otevíráme a hodnotíme jako WES, pouze v případě souhlasu rodiny.

Myslíme si, že tento kompromis je opodstatněný s ohledem na výše uvedené výhody provedení WES jako prvního testu.

K podobnému závěru dospěli i autoři Sun, a kolektiv (Sun et al. 2015). Porovnali kvalitu dat z MPS panelu genů (bylo zahrnuto 500 genů), WES a také WGS. Na sadě 9 vzorků provedli všechny tyto tři vyšetření, a ukázali, že použití WES je optimální řešení za předpokladu použití kvalitního kitu pro přípravu knihoven a dostatečné hloubky čtení.

5.2. PERSONALIZOVANÁ MEDICÍNA

Objasnění příčiny závažného dědičného onemocnění má velký přínos pro pacienta, jeho rodinu, ale i celou společnost – efektivní molekulárně genetická diagnostika ušetří další zbytečné a nákladné diagnostické postupy. Pacientům a rodinám nyní můžeme poskytnout nejmodernější dostupné diagnostické možnosti, které bylo dříve třeba hledat v zahraničí.

Nově poskytujeme možnost lépe určit prognózu onemocnění i upřesnit genetickou prognózu pro pacienty a jejich rodiny i odhalit speciální potřeby jednotlivých pacientů – tzv. precision medicine.

Také máme možnost nabídnout rodinám genetické poradenství a upřesnění genetické prognózy pro další plánování rodičovství a případně i cílenou genetickou prevenci.

Úspěšné molekulárně-genetické vyšetření s objasněním příčiny onemocnění ukončí sled opakovaných vyšetření, která nejsou bez rizik, a tím ušetří finanční zdroje ve zdravotním systému. Optimalizace léčby pak vede ke snížení počtu hospitalizací. Realizace výsledků projektu v praxi přinese změnu s reálným ekonomickým dopadem.

5.3. MEZINÁRODNÍ SPOLUPRÁCE

Mezinárodní spolupráce je stěžejní pro objasňování vzácných příčin DĚN, ale i pro hledání příčin nových. Pouze širší spolupráce ve vědecké komunitě umožňuje sdílet data a výsledky. Naše laboratoř se zapojuje do několika významných skupin.

Pod hlavičkou Peripheral nerve society funguje skupina zaměřena na DěN – CMT(R) – Charcot-Marie-Tooth and related neuropathies konsortium (<https://www.pnsociety.com/i4a/pages/index.cfm?pageid=3471>). Významným kolaborativním projektem, který je hostován na Univerzitě v Miami a vede ho prof. Stephan Züchner, je aplikace Genesis (<https://www.tgp-foundation.org/>). Zde je možné analyzovat data z NGS. V rámci Evropy je také několik významných skupin, které se věnují problematice DěN. V současné době jsme zapojeni zejména v konsorciu ENISNIP, které se věnuje objasňování příčin HSN – hereditárních senzitivních neuropatií (<https://enisnip.org/>).

6. ZÁVĚRY

V průběhu realizace této práce:

1) Byl nalezen **jeden nový gen**, jehož kauzální varianty způsobují DěN s autosomálně dominantním přenosem, a v rámci mezinárodní spolupráce bylo nalezeno celkem až sedm rodin s tímto typem neuropatie – *ATP1A1*.

2) Byly nalezeny kauzální varianty v genech, které byly teprve nedávno popsané jako příčina DěN, a **průkazem druhé – potvrzující – rodiny bylo** možné potvrdit původní práce a taktéž upřesnit fenotyp pro tyto typy DěN – *GNB4*, *MORC2*, *COX6A1*.

3) Byly popsány **jedny z největších skupin pacientů pro několik typů DěN**. Tyto výsledky jsou unikátní, protože spojují detailní klinický popis a genetické analýzy na relativně velkém počtu pacientů. Tím umožňují dobře popsat postižení pro dané typy neuropatií a určit spektrum a frekvenci kauzálních variant pro dané geny: *SH3TC2*, *SORD*, *HINT1*, *CCFDN*.

4) Byly **studovány vybrané molekulární mechanismy**, jejichž pochopení je důležité pro pochopení a studium daného onemocnění – *PLP1*, *MORC2*.

5) **Bioinformatické analýzy** jsou dnes již nezbytnou součástí práce v genetice. Vytváření a používání těchto nástrojů je důležité pro správné provádění analýzy dat z MPS. V laboratoři jsme vytvořili celý postup pro analýzu dat, a dvě práce byly i publikovány – PROT2HG a WES databáze.

Výsledky této naší systematické práce jsou důležité pro zlepšení diagnostiky pacientů s DěN v ČR. Přínosem je pro pacienty možnost určit příčinu jejich obtíží, i když jde o vzácné příčiny, ale v součtu o velké množství pacientů. Možnost upřesnit diagnózu je pro pacienty úlevou. Tyto informace jsou však důležité také pro širší rodinu pacienta.

Souhrnem lze říct, že v rámci hodnocení dat z MPS:

1) Zjistili jsme, že limitem už není detekce, ale interpretace nálezů (která varianta je kauzální a který z podezřelých je opravdu „pachatel“).

- 2) MPS má vysokou spolehlivost – přesnost – vyšetření, blížící se klasickému sekvenování.
- 3) MPS nám přinese objasnění „jen“ u cca 25 % vyšetřených pacientů.
- 4) Téměř vždy je nutné dovyšetřit přímé příbuzné – segregace mutace s nemocí.
- 5) Při vyhodnocování je nutné se vrátit k detailnímu klinickému popisu – zda mutace, kterou/ktelé jsme našli, mohou způsobovat daný fenotyp.
- 6) Bez těchto informací často není možné vyšetření spolehlivě uzavřít – výsledky spolehlivě interpretovat – „pachatele spolehlivě usvědčit – odsoudit“.

I když zatím není možná kauzální léčba, pro vývoj terapeutik jsou velké, dobře prostudované kohorty pacientů nezbytným předpokladem. Naše práce je unikátní právě v tom, že spojujeme výbornou neurologickou diagnostiku s kvalitně provedenou genetickou analýzou.

Výsledky jsou důležité i celosvětově – pro mezinárodní komunitu jsme pomohli definovat mnohé typy DĚN. O významu svědčí i naše široké zapojení jak do evropských konsorcií, tak i dalších mezinárodních výzkumných projektů.

7. LITERATURA

ANGELICHEVA, D., I. TURNEV, D. DYE, D. CHANDLER, et al. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter. *Eur J Hum Genet*, Jul 1999, 7(5), 560-566.

AUER-GRUMBACH, M., P. DE JONGHE, K. WAGNER, K. VERHOEVEN, et al. Phenotype-genotype correlations in a CMT2B family with refined 3q13-q22 locus. *Neurology*, Nov 28 2000, 55(10), 1552-1557.

AUER-GRUMBACH, M., S. TOEGEL, M. SCHABHUTTL, D. WEINMANN, et al. Rare Variants in MME, Encoding Metalloprotease Neprilysin, Are Linked to Late-Onset Autosomal-Dominant Axonal Polyneuropathies. *Am J Hum Genet*, Sep 1 2016, 99(3), 607-623.

BAETS, J. AND V. TIMMERMAN Inherited peripheral neuropathies: a myriad of genes and complex phenotypes. *Brain*, Jun 2011, 134(Pt 6), 1587-1590.

BANSAGI, B., H. GRIFFIN, R. G. WHITTAKER, T. ANTONIADI, et al. Genetic heterogeneity of motor neuropathies. *Neurology*, Mar 28 2017, 88(13), 1226-1234.

BERGOFFEN, J., S. S. SCHERER, S. WANG, M. O. SCOTT, et al. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, Dec 24 1993, 262(5142), 2039-2042.

BIS-BREWER, D. M. AND S. ZUCHNER Perspectives on the Genomics of HSP Beyond Mendelian Inheritance. *Front Neurol*, 2018, 9, 958.

BOMBELLI, F., T. STOJKOVIC, O. DUBOURG, A. ECHANIZ-LAGUNA, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A: from typical to rare phenotypic and genotypic features. *JAMA Neurol*, Aug 2014, 71(8), 1036-1042.

BONE, L. J., S. M. DESCHENES, R. J. BALICE-GORDON, K. H. FISCHBECK, et al. Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis*, 1997, 4(3-4), 221-230.

CHEN, D. H., Y. SUL, M. WEISS, A. HILLEL, et al. CMT2C with vocal cord paresis associated with short stature and mutations in the TRPV4 gene. *Neurology*, Nov 30 2010, 75(22), 1968-1975.

CHOI, M., U. I. SCHOLL, W. JI, T. LIU, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nov 10 2009, 106(45), 19096-19101.

CHOW, C. Y., Y. ZHANG, J. J. DOWLING, N. JIN, et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature*, Jul 5 2007, 448(7149), 68-72.

CORTESE, A., S. TOZZA, W. Y. YAU, S. ROSSI, et al. Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome due to RFC1 repeat expansion. *Brain*, Feb 1 2020a, 143(2), 480-490.

CORTESE, A., Y. ZHU, A. P. REBELO, S. NEGRI, et al. Biallelic mutations in SORD cause a common and potentially treatable hereditary neuropathy with implications for diabetes. *Nat Genet*, May 2020b, 52(5), 473-481.

COX, J. J., F. REIMANN, A. K. NICHOLAS, G. THORNTON, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*, Dec 14 2006, 444(7121), 894-898.

FABER, C. G., J. G. HOEIJMAKERS, H. S. AHN, X. CHENG, et al. Gain of function *Nanu1.7* mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol*, Jan 2012a, 71(1), 26-39.

FABER, C. G., G. LAURIA, I. S. MERKIES, X. CHENG, et al. Gain-of-function *Nav1.8* mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nov 20 2012b, 109(47), 19444-19449.

GESS, B., A. SCHIRMACHER, M. BOENTERT AND P. YOUNG Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes in a German neuromuscular center population. *Neuromuscul Disord*, Aug 2013, 23(8), 647-651.

- GILISSEN, C., J. Y. HEHIR-KWA, D. T. THUNG, M. VAN DE VORST, et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature*, Jul 17 2014, 511(7509), 344-347.
- GOLDBERG, Y. P., J. MACFARLANE, M. L. MACDONALD, J. THOMPSON, et al. Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet*, Apr 2007, 71(4), 311-319.
- GOLDBERG, Y. P., S. N. PIMSTONE, R. NAMDARI, N. PRICE, et al. Human Mendelian pain disorders: a key to discovery and validation of novel analgesics. *Clin Genet*, Oct 2012, 82(4), 367-373.
- GONZALEZ, M., M. J. FALK, X. GAI, R. POSTREL, et al. Innovative genomic collaboration using the GENESIS (GEM.app) platform. *Hum Mutat*, Oct 2015, 36(10), 950-956.
- HABIB, A. M., A. MATSUYAMA, A. L. OKOROKOV, S. SANTANA-VARELA, et al. A novel human pain insensitivity disorder caused by a point mutation in ZFH2. *Brain*, Feb 1 2018, 141(2), 365-376.
- HAHN, A. F., A. W. PARKES, C. F. BOLTON AND S. A. STEWART Neuromyotonia in hereditary motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Mar 1991, 54(3), 230-235.
- HARDING, A. E. AND P. K. THOMAS The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*, Jun 1980, 103(2), 259-280.
- INOUE, K. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics*, Feb 2005, 6(1), 1-16.
- KAZAMEL, M. AND C. J. BOES Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution. *J Neurol*, 2015, 262(4), 801-805.

KOHLER, S., L. CARMODY, N. VASILEVSKY, J. O. B. JACOBSEN, et al.

Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res*, Jan 8 2019, 47(D1), D1018-D1027.

LANDINI, S., B. MAZZINGHI, F. BECHERUCCI, M. ALLINOVI, et al. Reverse Phenotyping after Whole-Exome Sequencing in Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, Jan 7 2020, 15(1), 89-100.

LANDRUM, M. J., S. CHITIPIRALLA, G. R. BROWN, C. CHEN, et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res*, Jan 8 2020, 48(D1), D835-D844.

LASSUTHOVA, P., D. S. BROZKOVA, M. KRUTOVA, J. NEUPAUEROVA, et al. Mutations in HINT1 are one of the most frequent causes of hereditary neuropathy among Czech patients and neuromyotonia is rather an underdiagnosed symptom. *Neurogenetics*, Jan 2015, 16(1), 43-54.

LASSUTHOVA, P., A. P. REBELO, G. RAVENSCROFT, P. J. LAMONT, et al. Mutations in ATP1A1 Cause Dominant Charcot-Marie-Tooth Type 2. *Am J Hum Genet*, Mar 1 2018, 102(3), 505-514.

LATOUR, P., C. THAUVIN-ROBINET, C. BAUDELET-MERY, P. SOICHOT, et al. A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet*, Jan 2010, 86(1), 77-82.

LEIPOLD, E., L. LIEBMANN, G. C. KORENKE, T. HEINRICH, et al. A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nat Genet*, Nov 2013, 45(11), 1399-1404.

LIU, L., Y. LI, S. LI, N. HU, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012, 251364.

LOTSCH, J., A. DOEHRING, J. S. MOGIL, T. ARNDT, et al. Functional genomics of pain in analgesic drug development and therapy. *Pharmacol Ther*, Jul 2013, 139(1), 60-70.

LUPSKI, J. R., R. M. DE OCA-LUNA, S. SLAUGENHAUPT, L. PENTAO, et al. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, Jul 26 1991, 66(2), 219-232.

MAGY, L., S. MATHIS, G. LE MASSON, C. GOIZET, et al. Updating the classification of inherited neuropathies: Results of an international survey. *Neurology*, Mar 6 2018, 90(10), e870-e876.

MATHIS, S., C. GOIZET, M. TAZIR, C. MAGDELAINE, et al. Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J Med Genet*, Oct 2015, 52(10), 681-690.

MENDOZA-FERREIRA, N., M. KARAKAYA, N. CENGIZ, D. BEIJER, et al. De Novo and Inherited Variants in GBF1 are Associated with Axonal Neuropathy Caused by Golgi Fragmentation. *Am J Hum Genet*, Oct 1 2020, 107(4), 763-777.

NAUREEN, Z., L. LORUSSO, P. MANGANOTTI, P. CARUSO, et al. Genetics of pain: From rare Mendelian disorders to genetic predisposition to pain. *Acta Biomed*, Nov 9 2020, 91(13-S), e2020010.

NELIS, E., C. VAN BROECKHOVEN, P. DE JONGHE, A. LOFGREN, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet*, 1996, 4(1), 25-33.

NICHOLSON, G. AND S. MYERS Intermediate forms of Charcot-Marie-Tooth neuropathy: a review. *Neuromolecular Med*, 2006, 8(1-2), 123-130.

PAREYSON, D. AND C. MARCHESI Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol*, Jul 2009, 8(7), 654-667.

REILLY, M. M. Classification and diagnosis of the inherited neuropathies. *Ann Indian Acad Neurol*, Apr 2009, 12(2), 80-88.

REILLY, M. M., S. M. MURPHY AND M. LAURA Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, Mar 2011, 16(1), 1-14.

ROBINSON, P. N., S. KOHLER, A. OELLRICH, P. SANGER MOUSE GENETICS, et al. Improved exome prioritization of disease genes through cross-species phenotype comparison. *Genome Res*, Feb 2014, 24(2), 340-348.

ROSSOR, A. M., A. S. CARR, H. DEVINE, H. CHANDRASHEKAR, et al. Peripheral neuropathy in complex inherited diseases: an approach to diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Oct 2017, 88(10), 846-863.

ROSSOR, A. M., J. M. POLKE, H. HOULDEN AND M. M. REILLY Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol*, Oct 2013, 9(10), 562-571.

ROSSOR, A. M., P. J. TOMASELLI AND M. M. REILLY Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol*, Oct 2016, 29(5), 537-548.

ROTHIER, A., J. BAETS, V. TIMMERMAN AND K. JANSSENS Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Nat Rev Neurol*, Jan 24 2012, 8(2), 73-85.

RUDNIK-SCHONEBORN, S., M. AUER-GRUMBACH AND J. SENDEREK Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary motor neuropathies - Update 2020. *Medizinische Genetik*, 2020, 32(3), 207-219.

SAPORTA, A. S., S. L. SOTTILE, L. J. MILLER, S. M. FEELY, et al. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*, Jan 2011, 69(1), 22-33.

SAPORTA, M. A. AND M. E. SHY Inherited peripheral neuropathies. *Neurol Clin*, May 2013, 31(2), 597-619.

SEEMAN, P., R. MAZANEC, E. SEEMANOVÁ, M. BOJAR, et al. Charcot-Marie-Tooth 1 (CMT1) a tomakulózní neuropatie (HNPP) - průkaz specifických DNA

duplikační a delecí v oblasti 17p11.2-12 pomocí sady dinukleotidových markerů. Čes. a Slov. Neurol. Neurochir., 1999, 62(95), 212-218.

SELEMAN, M., R. HOYOS-BACHILOGLU, R. S. GEHA AND J. CHOU Uses of Next-Generation Sequencing Technologies for the Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol*, 2017, 8, 847.

SENDEREK, J., C. BERGMANN, V. T. RAMAEKERS, E. NELIS, et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, Mar 2003a, 126(Pt 3), 642-649.

SENDEREK, J., C. BERGMANN, C. STENDEL, J. KIRFEL, et al. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet*, Nov 2003b, 73(5), 1106-1119.

SENDEREK, J., C. BERGMANN, S. WEBER, U. P. KETELSEN, et al. Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet*, Feb 1 2003c, 12(3), 349-356.

SEVILLA, T., V. LUPO, D. MARTINEZ-RUBIO, P. SANCHO, et al. Mutations in the MORC2 gene cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, Jan 2016, 139(Pt 1), 62-72.

SEXTON, J. E., J. J. COX, J. ZHAO AND J. N. WOOD The Genetics of Pain: Implications for Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Jan 6 2018, 58, 123-142.

SHY, M. E., A. JANI, K. KRAJEWSKI, M. GRANDIS, et al. Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain*, Feb 2004, 127(Pt 2), 371-384.

SKRE, H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*, 1974, 6(2), 98-118.

SOONG, B. W., Y. H. HUANG, P. C. TSAI, C. C. HUANG, et al. Exome sequencing identifies GNB4 mutations as a cause of dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet*, Mar 7 2013, 92(3), 422-430.

STREET, V. A., C. L. BENNETT, J. D. GOLDY, A. J. SHIRK, et al. Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology*, Jan 14 2003, 60(1), 22-26.

SUN, Y., C. A. RUIVENKAMP, M. J. HOFFER, T. VRIJENHOEK, et al. Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? *Hum Mutat*, Jun 2015, 36(6), 648-655.

TAO, F., G. W. BEECHAM, A. P. REBELO, S. H. BLANTON, et al. Modifier Gene Candidates in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A: A Case-Only Genome-Wide Association Study. *J Neuromuscul Dis*, 2019, 6(2), 201-211.

TIMMERMAN, V., A. V. STRICKLAND AND S. ZUCHNER Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)*, Jan 22 2014, 5(1), 13-32.

TOURNEV, I., R. H. KING, J. WORKMAN, M. NOURALLAH, et al. Peripheral nerve abnormalities in the congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome. *Acta Neuropathol*, Aug 1999, 98(2), 165-170.

TRUMP, N., A. MCTAGUE, H. BRITTAIN, A. PAPANDREOU, et al. Improving diagnosis and broadening the phenotypes in early-onset seizure and severe developmental delay disorders through gene panel analysis. *J Med Genet*, May 2016, 53(5), 310-317.

VAN DER AUWERA, G. A., M. O. CARNEIRO, C. HARTL, R. POPLIN, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2013, 43, 11 10 11-11 10 33.

VAN EL, C. G., M. C. CORNEL, P. BORRY, R. J. HASTINGS, et al. Whole-genome sequencing in health care. Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet*, Jun 2013, 21 Suppl 1, S1-5.

VARON, R., R. GOODING, C. STEGLICH, L. MARNS, et al. Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet*, Oct 2003, 35(2), 185-189.

VERHAMME, C., I. N. VAN SCHAIK, J. H. KOELMAN, R. J. DE HAAN, et al. Clinical disease severity and axonal dysfunction in hereditary motor and sensory neuropathy Ia. *J Neurol*, Dec 2004, 251(12), 1491-1497.

VISIGALLI, D., P. CASTAGNOLA, G. CAPODIVENTO, A. GEROLDI, et al. Alternative Splicing in the Human PMP22 Gene: Implications in CMT1A Neuropathy. *Hum Mutat*, Jan 2016, 37(1), 98-109.

WANG, K., M. LI AND H. HAKONARSON ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*, Sep 2010, 38(16), e164.

WARNER, L. E., P. MANCIAS, I. J. BUTLER, C. M. MCDONALD, et al. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet*, Apr 1998, 18(4), 382-384.

YGER, M., T. STOJKOVIC, S. TARDIEU, T. MAISONOBE, et al. Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. *J Peripher Nerv Syst*, Mar 2012, 17(1), 112-122.

YUAN, J., E. MATSUURA, Y. HIGUCHI, A. HASHIGUCHI, et al. Hereditary sensory and autonomic neuropathy type IID caused by an SCN9A mutation. *Neurology*, Apr 30 2013, 80(18), 1641-1649.

ZIMON, M., J. BAETS, L. ALMEIDA-SOUZA, E. DE VRIENDT, et al. Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia. *Nat Genet*, Oct 2012, 44(10), 1080-1083.

ZUCHNER, S., I. V. MERSEYANOVA, M. MUGLIA, N. BISSAR-TADMOURI, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, May 2004, 36(5), 449-451.