

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Neurogenetické, biochemické a kognitivní aspekty  
familiární i sporadické formy amyotrofické laterální sklerózy  
v populaci České republiky**

**Neurogenetic, biochemical and cognitive aspects  
of familial and sporadic forms of amyotrophic lateral sclerosis  
in Czech population**

**Daniel Baumgartner**

Praha, 2024



Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Neurovědy na Neurologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol.

Školitel: MUDr. Radim Mazanec, Ph.D., Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

Konzultant: prof. MUDr. Jakub Hort, Ph.D., Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Neurovědy dne .....v ..... od ..... hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:  
prof. MUDr. Jan Laczó, Ph.D., Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu *NF-CZ11-PDP-3-2014-Norské granty* a Grantu MZ ČR – RVO, FN Motol 00064203

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

# Neurogenetické, biochemické a kognitivní aspekty familiární i sporadické formy amyotrofické laterální sklerózy v populaci České republiky

## ABSTRAKT

Tato dizertační práce chce upozornit na úskalí diagnostiky ALS a zároveň na rizika chybné diagnózy; dále pak zhodnotit profil genetických variant u českých pacientů s ALS. Tato data dosud zcela chybí a aktuální terapeutické trendy směřují léčbě, cílené na základě genetické etiologie. Prvním cílem práce je zhodnotit diagnostické parametry testů, stanovujících hladiny lehkých (NfL) a fosforylovaných těžkých (p-NfH) řetězců neurofilament v likvoru a séru; obzvláště v diferenciatně diagnosticky složitých situacích. Vedlejším cílem je definovat determinanty hladin neurofilament. Druhým cílem je pilotní analýza frekvence genetických variant u pacientů z ČR. Vedlejším cílem je nalézt klinické prediktory pravděpodobného záchytu kauzální mutace. Naše výsledky prokázaly u pacientů s jasně vyjádřeným klinickým obrazem ALS velmi dobrou a vůči sobě srovnatelnou diagnostickou efektivitu hladin obou řetězců neurofilament v likvoru, které tak mohou být využity jako opora definitivní diagnózy. Na druhou stranu, varianty s neúplně vyjádřeným fenotypem ALS, nebo s pomalou progresí jsou asociovány s nižšími hladinami neurofilament. Naopak u relevantních alternativních diagnóz (komprese nervových struktur) vede rozsáhlé axonální poškození k jejich výrazné elevaci, což limituje jejich využití v diagnosticky obtížných situacích. Studie, hodnotící zastoupení genetických variant u českých pacientů, prokázala nejvyšší frekvenci hexanukleotidové expanze v *C9orf72*, tak jako v ostatních evropských kohortách. Bulbární region rozvoje, resp. komorbidní FTD jsou u sporadických pacientů asociovány s větší pravděpodobností detekce této varianty.

## Klíčová slova

Amyotrofická laterální skleróza, biomarkery, *C9orf72*, frontotemporální demence, neurofilamenta, neurogenetika, sekvenování nové generace

# **Neurogenetic, biochemical and cognitive aspects of familial and sporadic forms of amyotrophic lateral sclerosis in the Czech population**

## **ABSTRACT**

This thesis aims to highlight the pitfalls and risks of diagnosis and misdiagnosis in ALS and to evaluate the profile of genetic variants among Czech ALS patients. These data are still completely lacking and current therapeutic trends are directed towards gene-targeted treatment. The first main objective of the study is to evaluate the diagnostic parameters of tests determining the levels of light (NfL) and phosphorylated heavy (p-NfH) neurofilament chains in the cerebrospinal fluid and serum; especially in clinically difficult-to-distinguish situations. A secondary objective is to define the determinants of neurofilament levels. The second main objective is a pilot study on the frequency of genetic variants among Czech patients. A secondary objective is to find clinical predictors of a causal mutation. Our results have shown that in patients with a typical ALS phenotype, the diagnostic performance of both neurofilaments in the cerebrospinal fluid is very good and comparable to each other, and, therefore, can be used to support the diagnosis. On the other hand, variants with incomplete ALS phenotype or slow progression are associated with lower neurofilament levels. Conversely, in relevant alternative diagnoses (compression of nerve roots or myelon), extensive axonal damage leads to their marked elevation, limiting their use in difficult-to-distinguish situations. The study on genetic variants in Czech patients showed the highest frequency of hexanucleotide repeat expansion in *C9orf72*, as in other European cohorts. Bulbar region of development or comorbid FTD is associated with a higher probability of detecting this variant in sporadic patients.

## **Keywords**

Amyotrophic lateral sclerosis, biomarkers, *C9orf72*, frontotemporal dementia, neurofilaments, neurogenetics, next-generation sequencing

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	7
<b>1.1. Amyotrofická laterální skleróza – úvod do problematiky</b> .....	7
<b>1.2. Epidemiologie</b> .....	8
<b>1.3. Etiopatogeneze</b> .....	8
1.3.1. Genetické faktory .....	9
<b>1.4. Klinická prezentace a diagnostické možnosti</b> .....	10
1.4.1. Klinický obraz .....	10
1.4.2. Biomarkery .....	12
<b>2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY</b> .....	14
<b>2.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	14
<b>2.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	15
<b>3. SOUBOR A METODIKA</b> .....	16
<b>3.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	16
<b>3.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	19
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	22
<b>4.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	22
<b>4.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	26
<b>5. DISKUZE</b> .....	29
<b>5.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS</b> .....	29
<b>5.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS</b> .....	32
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	35
<b>7. SOUHRN (SUMMARY)</b> .....	37
<b>8. LITERATURA</b> .....	39
<b>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA</b> .....	46

# 1. ÚVOD

## 1.1. Amyotrofická laterální skleróza – úvod do problematiky

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je fatální neurodegenerativní onemocnění dospělých, postihující predominantně kortikální motoneurony mozku a  $\alpha$ -motoneurony mozkového kmene a míchy. Typicky se manifestuje jako fokální, nebolestivé oslabení kosterních svalů či ztráta obratnosti, následně s progresí symptomů do sousedních, nebo i vzdálených tělesných regionů. Typickým histopatologickým nálezem jsou intracelulární, cytoplazmatická eozinofilní Bunina tělíčka a hyperfosforylované, ubikvitované agregáty transaktivního, DNA vázajícího proteinu o délce 43 kDa (TDP-43); agregáty identického proteinu jsou nalézány u ~ 50% všech pacientů s frontotemporální demencí (FTD) (Neumann M. et al., 2006), což vedlo k formulování koncepce TDP-43 proteinopatie jako klinicko-patologického kontinua FTD a ALS (Geser F. et al., 2009). Nezávislé neuropsychologické studie dokumentovaly FTD u 5-15 %, resp. kognitivní deficit či frontální behaviorální poruchy u 20-35% pacientů s ALS (Phukan J. et al., 2012). Morfometrické MRI studie prokázaly u tohoto typu pacientů atrofii kortexu i cerebrální bílé hmoty, přesahující primární motorické oblasti (Westeneng HJ. et al., 2016). Lehké známky dysfunkce kortikálních, nebo spinálních  $\alpha$ -motoneuronů byly nalezeny u 30% pacientů s FTD a u 12.5% plně vyjádřená forma ALS (Burrell JR. et al., 2011). S exponenciálním nárůstem nově popsanych genetických variant, asociovaných s ALS, byla zaznamenána jejich schopnost, manifestovat se odlišnými fenotypy, resp. nozologickými jednotkami (kromě ALS a FTD např. Parkinsonské syndromy, Huntingtonské fenokopie apod.), nejmarkantněji u hexanukleotidové expanze v genu *C9orf72* - nejčastěji detekované genetické příčině ALS i FTD. V současné době tudíž převládá koncepce ALS jako syndromu, nikoliv ucelené nozologické jednotky (van Es MA. et al., 2020).

Klinicky se jedná o soubor fenotypů s variabilní mírou postižení kortikálních, bulbárních a spinálních  $\alpha$ -motoneuronů, příp. spolu s kognitivním deficitem, a významně odlišnou prognózou přežití. Tato heterogenita komplikuje včasnou

diagnózu a pravděpodobně odráží i heterogenní patofyziologický podklad (van ES MA. et al., 2020). Absence jednotné etiologie poté komplikuje detailní a ucelené pochopení patofyziologie nemoci, a tím pádem i vývoj účinné léčby.

## **1.2. Epidemiologie**

Incidence (1,49 až 2,76 na 100 000) a prevalence (4,8 až 9,62 na 100 000) onemocnění je nejvyšší v populacích evropského původu; incidence onemocnění plynule narůstá až do 8. dekády s maximem v 7. dekádě (Xu L. et al., 2020). Podkladem pro geografickou variabilitu v distribuci incidence a prevalence je pravděpodobně odlišné genetické pozadí a očekávaná délka dožití mezi regiony (Riggs JE. et al., 1990). Muži jsou mírně častěji postižení, než ženy – 1,3: 1, pravděpodobně vlivem pohlavních hormonů (protektivní efekt estrogenu), resp. vyšší expozice exogenním noxám, popř. vyšší frekvence repetitivního traumatického poškození mozku u mužů (Zamani A. et al., 2024).

## **1.3. Etiopatogeneze**

Obecný koncept představuje patogenezí ALS jako multifaktoriální interakcí mezi genetickou predispozicí a environmentálními faktory, působícími v průběhu života postiženého jedince (Al-Chalabi A. a Hardiman O., 2013; Vasta R. et al., 2022). Tuto hypotézu podporuje validovaný, šestistupňový model patogenezí ALS (Chio A. et al., 2018). Se stále se rozšiřujícím poznáním genů, asociovaných s ALS, byla formulována hypotéza kontinuálního spektra genetických variant, od nízcé-rizikových, po vysoce penetrantní, kauzální mutace (Al-Chalabi A. et al., 2017). Varianty v nízcé-rizikových genech představují např. pouze jeden obecný patogenní stupeň (Vasta R. et al., 2022); i vysoce penetrantní mutace ovšem pravděpodobně vyžadují interakci s exogenními faktory pro rozvoj onemocnění (Chio A. et al., 2018). Environmentální toxiny, popř. exogenní inzulty pravděpodobně působí na úrovni epigenetických interakcí, ale úroveň důkazů není vysoká a epidemiologické studie vykazují řadu metodologických problémů (Vasta



R. et al., 2022). Klíčovým faktorem je stárnutí - celulární mechanismy, narušené při procesu stárnutí, jsou zásadní i v patofyziologii ALS (Jagaraj CJ. et al., 2024).

### 1.3.1. Genetické faktory

Genetické pozadí amyotrofické laterální sklerózy je komplexní a stále ne úplně objasněné (Cooper-Knock J. et al., 2021). Heritabilita (míra genetického vlivu na riziko rozvoje onemocnění) je odhadována na 43 – 61 % (Al-Chalabi A. et al., 2010). Kromě monogenní dědičnosti je pro rozvoj nemoci pravděpodobně významná i oligo- a polygenní dědičnost (Goutman SA. et al., 2022). Kauzální asociace s ALS byla dosud prokázána u více než 30 genů (Cooper-Knock J et al., 2021). V evropských populacích se na patogenezi u asi 48 % familiárních (fALS) a zároveň až 11 % sporadických případů ALS (sALS) podílí mutace v šesti hlavních genech (Zhou J. et al., 2017, van Daele SH. et al., 2023). Nejčastěji jde o hexanukleotidovou expanzi v genu *C9orf72* (30% fALS, 6% sALS, 25% FTD) a poté mutace v genech *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*, *TBKI* a *OPTN*. Varianty v ostatních asociovaných genech jsou zachyceny u cca 3% pacientů (van Daele SH. et al., 2023). Expanze v *C9orf72* se často klinicky manifestuje se značnou fenotypovou variabilitou i v rámci jednotlivých rodin (Van Langenhove T. et al., 2012). Jednotlivé geny, resp. individuální varianty se významně liší svojí penetrancí, která může být věkově vázaná (manifestace až ve stáří) (Murphy NA. et al., 2017). Dělení na „familiární“ (dva a více postižených rodinných příslušníků) nebo „sporadické“ formy (ojedinělý výskyt v rámci rodiny) může být tím pádem nepřesné (variabilní penetrance, úmrtí předků před věkem manifestace onemocnění). Každá varianta genu, nalezená u familiárních forem ALS, byla prokázána zároveň u pacientů bez zjevné rodinné anamnézy a fenotyp i histologie jsou u obou forem velmi podobné (Shatunov A. a Al-Chalabi A., 2021).

Oligogenní forma dědičnosti (nutná interakce dvou a více rizikových genových variant pro rozvoj ALS) byla dokumentována na rozsáhlém souboru pacientů u pouze cca 3% sALS (van Daele SH. et al., 2023). Polygenní rizika (synergie

mnoha variant malého efektu) se podílí na heritabilitě nemoci ze cca. 3,5 % (van Rheenen W. et al., 2016). Jde o intenzivně zkoumanou problematiku, někteří autoři argumentují pro pravděpodobně významně vyšší vliv polygenních rizik (Cooper-Knock J. et al., 2021).

Ačkoliv frekvence a zastoupení genových variant vykazuje značnou geografickou a mezi-etnickou variabilitu (Abecasis GR. et al., 2012), zastoupení genetických variant u fALS a sALS v populaci ČR dosud nebylo systematicky zkoumáno.

## **1.4. Klinická prezentace a diagnostické možnosti**

### **1.4.1. Klinický obraz**

ALS se nejčastěji manifestuje kombinací fokálního postižení kortikálního motoneuronu (kortikospinální dráhy) spolu s lézí spinálních (bulbárních)  $\alpha$ -motoneuronů, s následnou progresí do dalších regionů (bulbární, cervikální, torakální a lumbosakrální) (Brooks BR. et al., 2000). Výskyt léze kortikálních, nebo spinálních (bulbárních)  $\alpha$ -motoneuronů determinuje několik klinických variant ALS s odlišnou prognózou i akcentací vyjádřených symptomů (Izenberg A., 2023). Tato heterogenita komplikuje správnou diagnózu, protože kromě sériového klinického, resp. EMG vyšetření není žádný diagnostický test dostatečně spolehlivý jakožto „zlatý standard“. Diagnostická prodleva činní 12 měsíců; k chybně stanovené diagnóze dochází v iniciální fázi nemoci u 30 až 60 % pacientů (Richards D. et al., 2020) a až u 13 % vede k nesprávně indikovaným operačním výkonům (Srinivasan J et al., 2006), popř. k aplikaci nákladných a potenciálně rizikových léčiv. Diagnostická nejistota tak vede k zátěži jak zdravotního systému, tak pacienta (Galvin M. et al., 2017). Volba vhodných diagnostických testů k exkluzi alternativních diagnóz závisí na variantě ALS (viz dále). Diagnostická kritéria byla za posledních 30 let opakovaně revidována; nejaktuálnější jsou tzv. Gold Coast kritéria z r. 2020, dosahující proti předchozím kritériím lepší senzitivitu a specificitu právě pro varianty ALS (Hannaford A. et al., 2021).

Klasická forma ALS se prezentuje kombinací amyotrofie (denervační atrofie a svalová slabost) a laterální sklerózy (degenerace kortikospinálního traktu v laterálních sloupcích míchy), projevující se hyperreflexií, deliberaci primitivních reflexů a spasticitou. Tato forma postihuje asi 55-60 % pacientů s ALS (Marin B. et al., 2016). Amyotrofii často předchází generalizované fascikulace. Klíčovou alternativní diagnózou bývá spondylogenní cervikální myelopatie s obdobným věkovým vrcholem incidence, jako ALS (Cellura E. et al., 2012). Variabilně rychlá progresse vede k obrazu generalizovaných, ale asymetricky vyjádřených deficitů, finálně i s postižením ventilačních svalů. Medián přežití činí 2-3 let od prvních projevů, do 5 let zemře 80-90 % pacientů (Chió A. et al., 2011). Fokus rozvoje může být i v bulbárním regionu, projevem je dysartrie a spíše s odstupem i dysfagie. Bulbární postižení představuje nepříznivý prognostický faktor, stejně jako vyšší věk a dynamika (rychlost) progresse (Westeneng HJ. et al., 2018).

Varianta s izolovanými projevy léze spinálního  $\alpha$ -motoneuronu, označovaná jako progresivní svalová atrofie (PMA), vykazuje pomalejší progresi (45 % přežívá > 5 let) (Visser J. et al., 2007). PMA je důležité odlišit od klinicky podobných jednotek, jako např. léčitelná multifokální motorická neuropatie, autozomálně recesivní spinální muskulární atrofii s pozdním nástupem – SMA typ 4, popř. X-vázaná, spino-bulbární muskulární atrofie (Kennedyho nemoc).

U 2-4 % pacientů s izolovanými projevy kortikospinální léze (po dobu min. 4 let trvání) hovoříme o primární laterální skleróze (PLS). Přežití je nejdelší ze všech podtypů (u 70 % > 10 let) (Chió A. et al., 2011). Důležité je odlišit hereditární spastickou paraplegii, primárně progresivní sclerosis multiplex či hypovitaminózu B12 (van Es MA. et al., 2017).

U 5-15 % pacientů s ALS je současně přítomna FTD; u ~ 50 % kognitivní nebo behaviorální symptomy, nejčastěji apatie, ztráta sympatie či empatie, snížení verbální fluence, poruchu fatických a exekutivních funkcí a sociální kognice (van Es MA. et al., 2017). Exekutivní dysfunkce představuje nepříznivý prognostický faktor (Elamin M. et al., 2013). Kognitivní poruchy se vyskytují častěji u forem,

podmíněných mutacemi v relevantních genech (typicky *C9orf72*) (Chió A. et al., 2012).

#### 1.4.2. Biomarkery

Biomarkery jsou objektivní, *in vivo* kvantifikovatelný produkt určitého biologického procesu (Biomarkers Definitions Working Group, 2001); podle účelu je lze dělit na diagnostické, prognostické, resp. farmakodynamické; podle modality na biochemické (z tělesných tekutin), zobrazovací či neurofyziologické.

##### 1.4.2.1. Biochemické markery

Dosud jediný etablovaný diagnostický a prognostický biochemický marker u ALS představují lehké (NfL) a fosforylované těžké (p-NfH) řetězce neurofilament (Shahim P. et al., 2024). Tyto cytoskeletální proteiny, exprimované v silných, myelinizovaných axonech, jsou ovšem nespecifickým produktem obecné axonopatie (Witzel S. et al., 2022); elevace jejich hladin v likvoru i v krvi provází řadu dalších patologií CNS (Bridel C. et al., 2019). Hladina NfL v likvoru významně pozitivně koreluje s rychlostí progresu ALS (Dreger M. et al., 2022). Ačkoliv jejich hladina v likvoru lépe odráží patofyziologii onemocnění, hladiny p-NfH i NfL v séru se jeví, z hlediska opakovaného odběru, jako vhodnější marker terapeutické odpovědi (Benatar M. et al., 2018).

Detekce aberantního proteinu TDP-43 představuje hypoteticky ideální, vysoce specifický biomarker. Dosavadní snahy o *in vivo* detekci a kvantifikaci aberantního TDP-43 pomocí cílených protilátek, resp. diskriminační schopnost těchto testů, dosud nevedla k přesvědčivým výsledkům (Cordts I. et al., 2023). Dané protilátky pravděpodobně nereflektují patofyziologii onemocnění. Stále tedy chybí spolehlivá, validovaná metoda detekce TDP-43 (Cordts I. et al., 2023).

Pro formy nemoci, podmíněné mutacemi v *SOD1* genu představuje potenciálně vysoce specifický farmakodynamický marker hladina jeho mRNA, resp. SOD1

proteinu. (Miller T. et al., 2020). Analogií je detekce proteinů s dipeptidovými repeticemi pro formy, podmíněné HRE v genu *C9orf72* (Wilson KM. et al., 2022).

#### *1.4.2.2. Zobrazovací vyšetření*

Absence signálových změn v T2 sekvencích, resp. atrofie v T1 sekvencích v rutinním MRI vyšetření neumožňuje její využití jako diagnostického biomarkeru nemoci. Techniky voxel-based morfometrie, resp. DTI (diffuse-tensor imaging) detekují signifikantně větší regionální kortikální atrofii u pacientů s ALS proti kontrolám (Reyes-Leiva D. et al., 2022). Hypometabolismus frontálních a premotorických oblastí u pacientů s ALS detekuje pozitronová emisní tomografie (PET) s využitím 18 – fluorodeoxyglukózy; metoda ale nebyla nezávislými studii validována (Agosta F. et al., 2018). PET v kombinaci s ligandem, afinitním k fosforylovanému TDP-43 (jako hypoteticky specifický marker) dosud nebyl vyvinut.

#### *1.4.2.3. Neurofyziologické biomarkery*

Kortikální hyperexcitabilita, stanovená pomocí transkraniální magnetické stimulace vykazuje dobrou diagnostickou senzitivitu a specificitu, resp. pozitivní korelaci s další progresí onemocnění (Menon P. et al., 2020). Kvantitativní elektrofyziologická metoda MUNIX (Motor Unit Number Index – index počtu motorických jednotek) predikuje ztrátu spinálních motoneuronů a jeví se jako perspektivní prognostický a potenciálně i farmakodynamický biomarker (Neuwirth C. et al., 2017).

## 2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem naší práce je jednak upozornit na možnosti a zároveň na úskalí diagnostického procesu, hlavně u atypických nebo časných forem ALS; jednak realizovat pilotní analýzu profilu genetických variant, zastoupených v české populaci, protože tato data dosud nejsou k dispozici. Prvním cílem je tak kriticky zhodnotit možnost implementace vyšetřování likvorových a sérových biomarkerů k usnadnění diagnózy; dalším cílem je pomocí molekulárně genetického vyšetření stanovit frekvence variant v genech, asociovaných s onemocněním. Vedlejším cílem je definovat potenciální klinické prediktory detekce kauzálních mutací. Výsledným záměrem je zavedení obou metodik do klinické praxe specializovaných center.

### 2.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

Chybná diagnóza je v iniciálních stádiích onemocnění relativně častá (kompresivní radikulopatie nebo myelopatie; řada alternativních diagnóz u varianty PMA) a může mít vážné důsledky (13% podstoupí chirurgickou léčbu z chybné indikace, s rizikem akcelerace progresu nemoci) (Srinivasan J. et al., 2006; Pinto S. et al., 2014). Signifikantní elevace lehkých (NfL) a fosforylovaných těžkých řetězců (p-NfH) neurofilament v likvoru i v krvi u pacientů s ALS vedla k jejich využití jako diagnostického, prognostického i farmakodynamického biomarkeru (Poesen K. a Van Damme P., 2019). U kompresivních myelo- a/nebo radikulopatií ale byla rovněž dokumentována významná elevace neurofilament (Ohya J. et al., 2015) a naopak u PMA byly pozorovány signifikantně nižší hladiny oproti ostatním variantám ALS (Gaiani A. et al., 2017). Diskriminační schopnost neurofilament v těchto diferenciatně diagnosticky složitých situacích (odlišení od kompresivních myelo-/radikulopatií; varianty s fenotypem PMA) dosud nebyla systematicky zhodnocena. *Hypotéza:* hladiny NfL v likvoru a p-NfH v likvoru i v séru lze využít jako diagnostický biomarker i v případě odlišení ALS od kompresivních myelo-

/radikulopatií a k odlišení fenotypu PMA od relevantních alternativních jednotek. Hlavními cíli práce bylo zhodnotit, zda je diagnostická síla elevace hladiny neurofilament dostatečná k odlišení klinicky obtížně diferencovatelných jednotek. Vedlejšími cíli bylo zhodnotit prognostický význam a nalézt faktory, determinující elevaci hladin neurofilament.

## 2.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS

V současné době je definováno více než 30 genů, jejichž patogenní mutace jsou kauzálně asociovány s rozvojem ALS, nejčastěji s autozomálně dominantní formou dědičnosti (Cooper-Knock J. et al., 2021). Ačkoliv familiární formy (fALS) představují jen 5–10 % případů (Shatunov A. a Al-Chalabi A., 2021), 11% pacientů bez rodinné anamnézy nese mutace v identických genech, jako u fALS, nejčastěji expanzi hexanukleotidových repetitiv (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>; HRE) v prvním intronu genu C9orf72 (Van Daele SH. et al., 2023), ovšem s variabilní frekvencí výskytu mezi evropskými etniky (Zou ZY. et al., 2017). Další frekventně zastoupené geny jsou *FUS*, *SOD1*, *TARDBP*, resp. *TBKI* (Van Daele SH. et al., 2023). Data, analyzující výskyt a proporci jednotlivých mutací u fALS i sALS pacientů, pocházejí z evropských etnik s odlišným genetickým původem ve srovnání s populací České republiky; pro českou populaci tato data dosud zcela chybí. Zastoupení vzácných variant v genech je přitom mezi různými populacemi významně heterogenní, se značnou geografickou variabilitou (Abecasis GR. et al., 2012). *Hypotéza:* genetická skladba kauzálních mutací v genech, asociovaných s ALS, může být v populaci ČR specifická, jak pro frekvenci HRE v C9orf72, tak vzácných variant v dalších genech. Cílem naší práce bylo zmapovat zastoupení jednotlivých variant v detailně popsané kohortě pacientů s familiární i sporadickou formou ALS a zároveň definovat potenciální klinické prediktory kauzálních mutací. S ohledem na rychlý vývoj na poli terapií, specificky cílených na kauzální mutace v jednotlivých genech, se jedná o data, jejichž klinický význam bude v budoucnosti zcela zásadní.

### 3. SOUBOR A METODIKA

#### 3.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

Do této retrospektivní, průřezové studie bylo zařazeno souhrnně 164 pacientů, u kterých byl v letech 2012 až 2019 na Neurologické klinice 2. Lékařské fakulty UK a FN Motol proveden odběr likvoru v rámci rutinního diagnostického procesu a jeho následná archivace. Z toho bylo 71 pacientů s diagnózou ALS, nebo jejich variant, v souladu s návrhem revize El Escorial kritérií z roku 2015 (Ludolph A. et al., 2015), umožňující zařazení i pacientů s průkazem pouze izolovaného postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu ve dvou a více regionech, v souladu se základní hypotézou studie. Zhodnotili jsme i podíl pacientů se souběžným výskytem frontotemporální demence v souladu diagnostickými kritérii dle Stronga z r. 2009 (Strong MJ. et al., 2009).

Ze záznamů ze zdravotnické dokumentace jsme určili region iniciální manifestace (bulbární, spinální) a dle dokumentovaného objektivního neurologického, resp. EMG nálezu byli pacienti kategorizováni do jedné ze tří podskupin: ALS-SMN (izolovaně léze spinálního  $\alpha$ -motoneuron;  $n = 15$ ), ALS-klasická (kortikální a spinální  $\alpha$ -motoneuronu v min. jednom regionu;  $n = 36$ ) a ALS-bulbární (iniciální léze bulbárního  $\alpha$ -motoneuronu a/nebo kortikobulbární dráhy;  $n = 20$ ).

Dále byl soubor pacientů s ALS rozdělen podle ne-/přítomnosti radiologického nálezu, suspektního z komprese radixů, nebo míchy. Kritéria suspektního radiologického nálezu (MRI) byla stanovena jako (1) spondylogenní cervikální myelopatie (2) index cervikální komprese (CCI) stupeň 3 (Lee SH. et al., 2010) (3) nález foraminostenózy ve  $\geq 2$  etážích, korespondujících s distribucí neurologického deficitu (4) průřezová plocha durálního vaku  $< 100 \text{ mm}^2$  (Schönström N. a Willén J., 2001). Diagnóza ALS byla stanovena na základě pečlivé korelace elektrofyzilogických a radiologických nálezů, resp. klinického průkazu progresu motorických deficitů mimo regiony dokumentované komprese. Skupina ALS pacientů se suspektním radiologickým nálezem byla označena jako



ALS-komprese (n = 18). U zbylých pacientů souboru nebyla naplněna kritéria suspektního radiologického nálezu (ALS-non-komprese, n = 53).

U všech pacientů bylo stanoveno skóre na klinimetrické škále ALSFRS-R v čase odběru likvoru a rovněž doba (v měsících) od první manifestace do lumbální punkce. Rychlost progresu deficitů byla kalkulována pomocí tzv.  $\Delta$ FS skóre (Kimura F. et al., 2006); následně byl soubor rozdělen na pomalé ( $\Delta$ FS < 0,3, tzn. 25. percentil; n = 20), středně rychlé - intermediární ( $\Delta$ FS v rozmezí hodnot 0,3 – 1; n = 30) a rychlé progresory ( $\Delta$ FS > 1; 75. percentil v souboru ALS; n = 21).

Zbylých 93 pacientů celého souboru mělo jinou finální diagnózu než ALS. První kohortu tvořili pacienti se spondylogenní cervikální myelopatií (akutní i chronické formy), pluriradikulopatií v důsledku lumbální spinální stenózy nebo více-etážové foraminostenózy, nebo pacienti s monoradikulární lézí v důsledku disko- nebo spondylogenní komprese (n = 30). Zdravotnická dokumentace u každého z těchto pacientů po dobu minimálně jednoho roku od lumbální punkce vylučovala rozvoj nových motorických deficitů, suspektních z ALS. Další kohortou byly neurologické kontroly (n = 63), s postižením periferního nervového systému v důsledku několika různých etiologických jednotek – chronické zánětlivé demyelinizační polyneuropatie (n = 23), chronické axonální idiopatické polyneuropatie (n = 19), polyneuropatického syndromu v důsledku přesně definované etiologie (např. diabetická polyneuropatie, paraproteinemická polyneuropatie, aj.; n = 6), myasthenia gravis (n = 5), myopatie (n = 4), resp. funkční poruchy hybnosti (n = 6) (Tab. 5).

U všech pacientů (71 pacientů s ALS a 93 pacientů s ostatními diagnózami) byl vyšetřen likvor ke kvantifikaci hladin p-NfH a NfL; u 62 pacientů s ALS a dalších 62 pacientů s ostatními diagnózami (26 pacientů s myelo-/radikulopatií a 36 neurologických kontrol) byla provedena rovněž kvantifikace hladin p-NfH v séru. Hladiny obou Nf v likvoru a p-NfH v séru byly stanoveny komerčně dostupnými ELISA soupravami, certifikovanými pro *in vitro* diagnostiku (pro NfL: kit No. 10-

7001 CE od UmanDiagnostics AB; pro p-NfH kit No. EQ 6561-9601, resp. EQ 6562-9601 od Euroimmun AG) v souladu s instrukcemi výrobce. Likvor i párový vzorek séra byly odebrány standardní procedurou lumbální punkce/venepunkce, následně centrifugovány, rozděleny na alikvoty a následně v intervalu maximálně do dvou hodin od odběru hluboce zmrazeny na teplotu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Při této teplotě byly vzorky uchovány až do provedení vyšetření ELISA soupravou. V likvoru byla u všech vzorků stanovena celulizace, koncentrace albuminu a celkové bílkoviny.

Statistická analýza a tvorba tabulek byla provedena pomocí IBM SPSS Statistics 28 a konstrukce ROC křivek pomocí R 4.2 (pROC a ROCit balíčky) softwaru. Pro neparametricky rozložená data byl použit Kruskal-Wallisův test, s post-hoc analýzou pomocí oboustranného Mann-Whitney U testu v případě statisticky významného rozdílu, s Bonferonniho korekcí pro vícečetná srovnání. Demografické a klinické údaje byly zhodnoceny jako kovarianty modelem mnohonásobné lineární regrese. Kategorické proměnné byly porovnány Pearsonovým chi-kvadrát testem nebo Fischerovým exaktním testem (u rozdílně velkých soubory, nebo  $<5$  členů v jedné kategorii). Korelační analýza dat byla realizována pomocí Kendallova korelačního testu (pro častý výskyt hodnot stejného, tzv. „svázaného pořadí“ a malý datový soubor). Diagnostická síla p-NfH (v likvoru i v séru) a NfL byla stanovena kalkulací plochy pod křivkou (AUC – area under the curve) na základě konstrukce křivek ROC (receiver operating characteristics) analýzy. Diagnostická mez byla stanovena podle 3 nezávislých kritérií: (1) nejvyšší hodnota Youdenova J-indexu; (2) pro cílovou senzitivitu 90 % (screening); (3) pro cílovou specificitu 90 % (konfirmační test). Následně byly kalkulovány hodnoty senzitivity, specificity, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty včetně jejich 95 % intervalů spolehlivosti (IS).

### 3.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS

Do této průřezové studie jsme zařadili 88 českých pacientů; u 9 se jednalo o familiární (fALS, výskyt u alespoň jednoho dalšího přímého příbuzného), u 79 o sporadickou formu nemoci (sALS). Zařazeni byli pacienti z Neurologické kliniky 2. LF Univerzity Karlovy a FN Motol, Praha (n = 71) a Neurologické kliniky FN Brno a Masarykovy Univerzity Brno (n = 17). Diagnóza ALS byla stanovena po exkluzi alternativních diagnóz v souladu s kritérii z roku 2015 (Ludolph A. et al., 2015). Diagnóza frontotemporální demence byla stanovena v souladu s diagnostickými kritérii dle Stronga z r. 2009 (Strong MJ. et al., 2009). U všech pacientů jsme určili demografické ukazatele (věk, pohlaví) a klinický fenotyp (region prvních projevů - spinální, bulbární, FTD). Studie sestával ze dvou kohort pacientů: první, s prospektivním nábořem mezi 2015 až 2020 na Neurologické klinice 2.LF UK a FN Motol (n=52); molekulárně genetické vyšetření v laboratoři Ústavu lékařské genetiky a biologie 2. LF UK a FN Motol, Praha. Druhá kohorta byla retrospektivní (n = 36; 19 FN Motol; 17 FN Brno); molekulárně genetické vyšetření bylo indikováno v rámci rutinní klinické konzultace (fALS, věk <45 let při rozvoji ALS, komorbidní FTD). Analýza všech vzorků druhé kohorty proběhla v laboratoři Centra molekulární biologie a genetiky, Interní hematologické kliniky FN Brno a Masarykovy Univerzity.

DNA izolace, analýza DNA k detekci HRE v genu *C9orf72*, resp. přípravy DNA knihoven, zpracování dat a anotace DNA sekvencí se mezi oběma laboratořemi lišily. Finální zhodnocení patogenicity detekovaných variant bylo realizováno podle identických kritérií. Geny, asociované s patogenezi ALS, resp. typ jejich dědičnosti byly převzaty z databáze expertního panelu Genomics England Panel App v.1.69 (<http://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/263/>) a databáze GeneReview (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1450/>) (Tab. 1).

V prospektivní kohortě byla genomová DNA získána z periferní krve soupravou Genra Puregen Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Délka HRE v G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>

v *C9orf72* (expanze >60 G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) byla zhodnocena pomocí repeat-primed PCR metody dle DeJesus-Hernandesové (DeJesus-Hernandez M. et al., 2011) a následně kapilární elektroforézy v DNA analyzátoru ABI3730. Poté byl u každého vzorku sekvenován klinický, nebo celý exom (HiSeq 2500 nebo NovaSeq 6000, Illumina, USA; sekvenační chemie HiSeq Rapid Cluster kit v2 a Rapid SDS Kit v.2, nebo NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5). DNA knihovny byly připraveny pomocí tří odlišných souprav, podle aktuální dostupnosti v laboratoři (1. TruSight One kit, Illumina Inc, San Diego, CA, USA, n = 18 vzorků; 2. SureSelect Focused Exome kit, Agilent, Santa Clara, CA, USA, n = 22 vzorků; 3. SeqCap EZ MedExome kit, Roche, Madison, WI, USA, n = 12). Data ve formátu fastq byla po kontrole kvality čtení mapována na referenční sekvenci lidského genomu hg19/GRCh37 (Novoalign v4.02.03 nebo BWA v4.02.03) v souladu s doporučením dle GATK (Genome Analysis Toolkit). Konverze formátů (SAM do BAM) a vyřazení duplicit proběhlo v softwaru Picard Tools. Nástroj GATK 3.8 byl použit pro lokální alignment (přiřazení) kolem indelů, rekalibraci bází, rekalibraci variant a genotypizaci. Analýza variability počtu kopií nebyla v prospektivní kohortě prováděna. Anotaci variant realizoval software SnEff4.3T a Ensembl v.75; protříděné údaje byly zaneseny do databáze GEMINI (0.30.2).

V retrospektivní kohortě byla genomová DNA izolována z leukocytů periferní krve standardní vysolovací metodou. HRE v *C9orf72* byla zhodnocena pomocí certifikované sestavy AmpliX<sup>®</sup> PCR/CE *C9orf72* Kit (Asuragen, USA) v souladu s instrukcemi výrobce. K identifikaci genových variant byla využita souprava KAPA HyperChoice (Roche, USA) s následným sekvenováním na přístroji NextSeq 500 (Illumina, USA) s chemií NSQ 500/550 Mid Output KT v2.5. Individuální sekvence DNA byly seřazeny podle referenční humánní genomové sekvence hg19/GRCh37 a varianty byly vyvolány za využití software CLC Genomics Workbench (QIAGEN). Analýza byla navržena k detekci krátkých variant i rozsáhlých delecí a duplikací pomocí zhodnocení variability počtu kopií.

V obou kohortách byly vyloučeny varianty s frekvencí: (1)  $> 0,1\%$  v databázi The Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1) (2)  $> 0,5\%$  v České databázi genetických variant (3) intronové a synonymní varianty (4) pravděpodobně/benigní v databázi ClinVar (23/05/2023). Zbylé varianty byly srovnány s ClinVar, Human Gene Mutation Database (HGMD Professional 2023.4), gnomAD a dalšími populačními databázemi (dbSNP 156 a 1000 Genomes) k rozšíření informací. Jednotlivé varianty byly klasifikovány v souladu s kritérii American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards S. et al., 2015), pomocí softwaru Alamut Visual Plus v.7.1 a nástrojů VarSome (<https://varsome.com>) a Franklin (<https://franklin.genoox.com>); zohledněno bylo i skóre prediktivních nástrojů pro missense varianty (PolyPhen-2, SIFT a CADD), resp. pro sestřihové varianty (SpliceAI) (Alamut; The Varsome; Franklin). Rozhodující pro finální klasifikaci varianty byla kritéria ACMG, typ dědičnosti a význam konkrétního genu pro patogenezi ALS. Získané údaje byly kontrolně ověřeny a srovnány s údaji z expertního panelu ([www.clinicalgenome.org](http://www.clinicalgenome.org)) a z dostupné literatury. Všechny kauzální varianty byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním pomocí soupravy BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit na přístroji ABI 3130xl Genetic Analyzer (oba Applied Biosystems, USA).

Asociace klinických, resp. demografických znaků s frekvencí záchytu kauzálních variant byla zhodnocena oboustranným Fisherovým exaktním testem, s úrovní významnosti  $p < 0,05$ .

**Tab. 1** Vybrané geny, asociované s ALS, vyšetřené v našem souboru

<p><i>ALS2, ANG, ANXA11, AR, C9orf72, CHCHD10*, CHMP2B, DAO**, DCTN1, ERBB4, FIG4, FUS, HNRNPA1, KIF5A, MAPT, MATR3, NEFH, NEK1, OPTN, PFN1, SCFD1**, SETX, SIGMAR1, SLC52A2, SLC52A3, SOD1, SPAST, SPG11, SQSTM1, TARDBP, TBK1, TUBA4A* UBQLN2, UNC13A*, VAPB, VCP</i></p>
---

Geny, které nebyly pokryty ve všech jednotlivých soupravách pro přípravu DNA knihoven (soupravy neobsahovaly sondy pro daný konkrétní gen) a tedy nebyly analyzovány jsou označeny \* – nebyly analyzovány v soupravách TrusightOne a Focus Exome \*\* – nebyly analyzovány v soupravách TrusightOne, Focus Exome ani KAPA HyperChoice

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

Hladiny p-NfH v likvoru i séru, resp. NfL v likvoru byly signifikantně vyšší u kohorty ALS, než u myelo-/radikulopatií, resp. neurologických kontrol ( $p < 0,001$  obě Nf v likvoru,  $p = 0,038$  p-NfH v séru). Kohorta myelo-/radikulopatií vykazovala vyšší hladiny NfL ( $p < 0,001$ ) i p-NfH v likvoru ( $p = 0,003$ ) proti neurologickým kontrolám. Model mnohonásobné lineární regrese confirmoval v celé studijní populaci ( $n = 164$ ) signifikantní efekt věku (nárůst s věkem) a také pohlaví (vyšší u mužů) na hladiny NfL a p-NfH v likvoru ( $p < 0,001$  pro p-NfH i NfL i pro obě kovarianty), ovšem pouze pro obě kontrolní kohorty, nikoliv u ALS ( $p = 0,654$ ;  $p = 0,223$ ). U myelo-/radikulopatií jsme pozorovali nejvyšší hladiny p-NfH a NfL v likvoru u akutních (2185, resp. 4895 pg/ml), nejnižší pak u chronických myelopatií (261, resp. 550 pg/ml) (všechna srovnání  $p < 0,001$ ).

Skupina ALS-komprese ( $n = 18$ ) měla nižší hladiny NfL ( $p = 0,049$ ), ale nikoliv p-NfH v likvoru, resp. ani v séru proti ostatním ALS ( $n = 53$ ), resp. vyšší hladiny NfL ( $p = 0,048$ ) a rovněž p-NfH v likvoru ( $p = 0,007$ ) (Obr. 1), ale ne p-NfH v séru ( $p = 0,164$ ) proti myelo-/radikulopatiím. Podskupina ALS-SMN měla signifikantně nižší hladiny NfL i p-NfH v likvoru než ALS-spinální ( $p = 0,003$ ;  $0,008$ ) resp. pro NfL i než ALS-B ( $p = 0,003$ ), ale ne pro p-NfH ( $p = 0,027$ , NS po Bonferroniho korekci) (Obr. 2). Hladiny p-NfH v séru se nelišily ( $p = 0,347$ ). V podskupině ALS-SMN byly významně nižší hladiny NfL ( $p = 0,002$ ) a p-NfH ( $p = 0,008$ ) v likvoru pozorovány u pacientů s pomalou progresí ( $\Delta FS < 0,03$ ,  $n = 8$ ) oproti zbytku ALS-SMN ( $n = 7$ ). U 8 (jiných) pacientů došlo v dalším průběhu nemoci k manifestaci postižení kortikospinální dráhy; u těchto pacientů nebyl pozorován rozdíl v hladinách p-NfH ( $p = 0,95$ ), resp. NfL ( $p = 0,68$ ) v likvoru oproti zbytku ALS-SMN. Hladina NfL a p-NfH v likvoru byla u ALS-SMN vyšší, než u neurologických kontrol ( $p < 0,001$ ), ale nikoliv než u kohorty myelo-/radikulopatií ( $p = 0,178$ ;  $p = 0,393$ ).

V pohledu kritéria rychlosti progresu vykazovali rychlí progresoři nejvyšší a pomalí progresoři nejnižší hladiny NfL ( $p < 0,001$ ) resp. p-NfH v likvoru ( $p = 0,002$ ); pro p-NfH v séru nebyl mezi podskupinami rozdíl ( $p = 0,054$ ).

Hladiny NfL a p-NfH v likvoru významně, silně a pozitivně korelovaly v celém souboru ( $\tau_b = 0,684$ ;  $p = 0$ ). Hladiny p-NfH v likvoru a séru rovněž korelovaly silně v celém souboru ( $\tau_b = 0,357$ ;  $p = 0$ ), ale významně méně, proti korelaci mezi p-NfH a NfL v likvoru. Hladiny NfL v likvoru významně silně korelovaly s rychlostí progresu ( $\Delta$  FS) ( $\tau_b = 0,390$ ); resp. významně negativně, středně silně s délkou přežití ( $\tau_b = -0,285$ ). Mezi  $\Delta$  FS a délkou přežití byla prokázána významná negativní silná korelace ( $\tau_b = -0,375$ ).

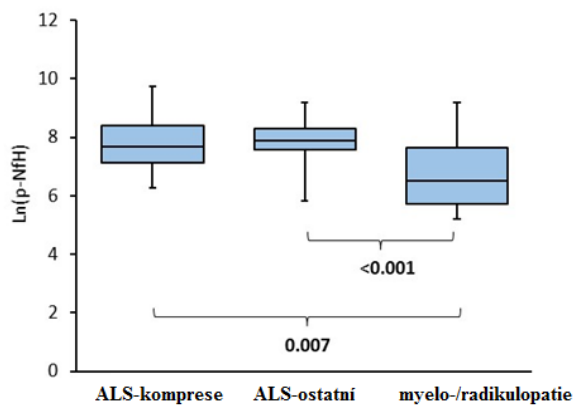
V celém souboru byla diagnostická síla NfL i p-NfH v likvoru pro diskriminaci ALS od ostatních dvou kohort na základě hodnoty plochy pod křivkou velmi dobrá (p-NfH: AUC 0,885; NfL: AUC 0,892) (Obr. 3, 4); resp. pro obě neurofilamenta stejná (srovnání 2 ROC křivek:  $p = 0,723$ ). V situaci, kdy byla z analýzy vyřazena kohorta myelo-/radikulopatií, pozorovali jsme signifikantní nárůst diagnostické síly p-NfH i NfL v likvoru (ale nikoliv p-NfH v séru) (srovnání AUC 2 ROC křivek: NfL v likvoru  $p = 0,014$ ; p-NfH v likvoru  $p = 0,044$ ). Pro p-NfH v séru byla diagnostická síla pouze dostatečná (AUC 0,650) a signifikantně nižší oproti oběma Nf v likvoru (p-NfH v likvoru x p-NfH v séru:  $p < 0,001$ , NfL x p-NfH v séru:  $p < 0,001$ ). Pro p-NfH v séru byla maximální dosažitelná senzitivita 61,3 % při specificitě 64,5 %, pozitivní prediktivní hodnotě 63,3 %, resp. negativní 62,5 %.

Diagnostická síla hladin p-NfH v likvoru při odlišení skupiny ALS-komprese ( $n = 18$ ) od kohorty myelo-/radikulopatií ( $n = 30$ ), byla dobrá (AUC 0,733; Obr. 5) a zároveň nebyla signifikantně nižší, než pro odlišení ALS-ostatní ( $n = 53$ ) od myelo-/radikulopatií (AUC 0,774; srovnání AUC 2 ROC křivek:  $p = 0,341$ ). Hladiny p-NfH v séru (AUC 0,627) a NfL v likvoru (AUC 0,672) dosahovaly pouze dostatečné diagnostické síly. Pro odlišení ALS-komprese od prostých myelo-/radikulopatií jsme nebyly schopni docílit optimální diagnostické meze bez

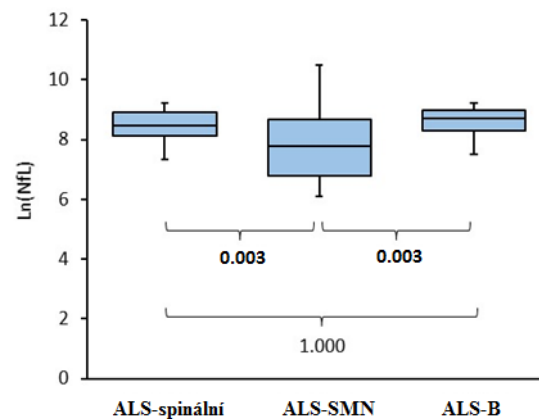
významné ztráty senzitivity, nebo specificity na základě aplikace ani jednoho ze tří kritérií (pro p-NfH v likvoru: /1/ Youdenův J-index 607,5 pg/ml se senzitivitou 94,4 % a specificitou 50 % /2/ pro cílovou senzitivitu 90% při mezi 702 pg/ml specificita 50% /3/ pro cílovou specificitu 90% mez 5014 pg/ml a senzitivita pouze 22,2 %; pro NfL obdobná situace). Aplikovali jsme proto diagnostické meze, stanovené v rámci celého souboru (p-NfH v likvoru: 1205 pg/ml, NfL v likvoru: 2180pg/ml); výsledkem ovšem bylo 9 (30%; p-NfH), resp. 11 (36,7 %; NfL) falešně pozitivních pacientů ze skupiny myelo-/radikulopatií. Sedm těchto pacientů, označených jako falešně pozitivní, podstoupilo úspěšnou chirurgickou dekompresi (z celkového počtu 10 v rámci kohorty myelo-/radikulopatií). Na druhou stranu, 2 z 5 pacientů ze skupiny ALS-komprese, operovaných na základě nesprávné indikace pro suspektní kompresivní etiologii, by na základě stanovených hladin neurofilament v likvoru byli označeni jako falešně negativní.

Při odlišení podskupiny ALS-SMN od neurologických kontrol vykazoval v likvoru p-NfH (AUC 0,848) i NfL (AUC 0,838) velmi dobrou diagnostickou sílu, ovšem pro NfL významně nižší, než pro odlišení ostatních ALS (n = 56) od neurologických kontrol (AUC 0,995; srovnání AUC dvou ROC křivek: p = 0,032), pro p-NfH nebyl rozdíl signifikantní (AUC 0,968; srovnání: p = 0,064). Na základě hladin p-NfH v séru nebylo možné, odlišit pacienty z ALS-SMN od neurologických kontrol (AUC 0,457). S ohledem na fakt, že 7 (46,6 %) pacientů ALS-SMN podskupiny mělo suspektní radiologický nález (ALS-komprese), analyzovali jsme diagnostickou efektivitu pro diskriminaci pacientů z ALS-SMN vůči oběma kontrolním kohortám (AUC 0,776; resp. 0,754, Obr. 6). Dosažené diagnostické meze vedly k neakceptovatelné ztrátě senzitivity, nebo specificity, resp. k neakceptovatelným pozitivním prediktivním hodnotám (vždy < 50%). Aplikovali jsme tedy diagnostické meze, získané při analýze celého souboru; při daných mezích bylo na základě hladin p-NfH, resp. NfL v likvoru označeno 8 (53,3 %), resp. 6 (40 %) pacientů ze skupiny ALS-SMN jako falešně negativní.

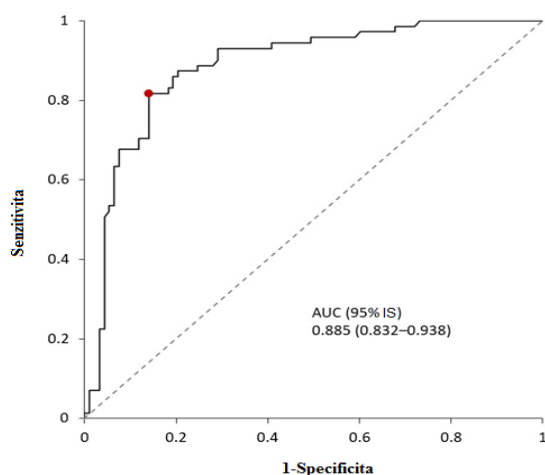




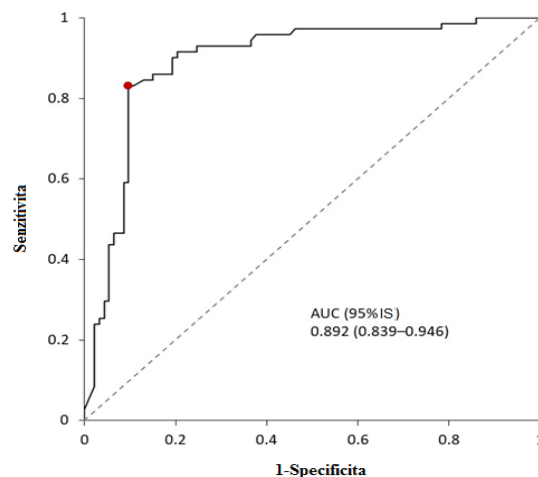
**Obr. 1** Srovnání log hodnot p-NfH (likvor) mezi ALS-komprese (n = 18), ALS-ostatní (n = 53) a myelo-/radikulopatie (n = 30)



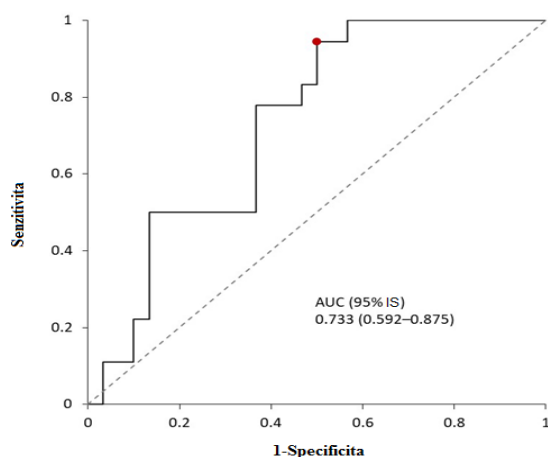
**Obr. 2** Srovnání log hodnot NfL (likvor) mezi ALS-spinální (n = 36), ALS-SMN (n = 15) a ALS-B (n = 20)



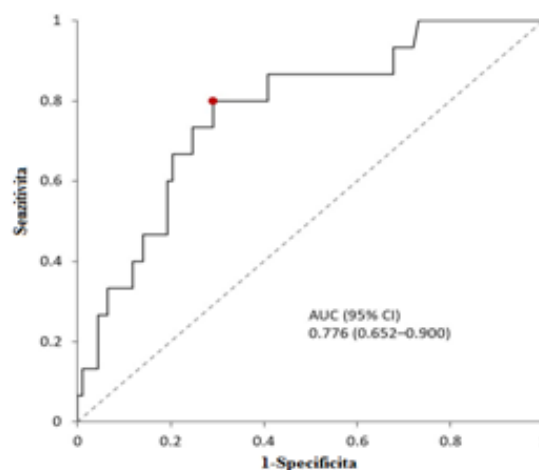
**Obr. 3** ROC křivka p-NfH (likvor; pg/ml): ALS x myelo-/radikulopatie + neurologické kontroly



**Obr. 4** ROC křivka NfL (likvor; pg/ml): ALS x myelo-/radikulopatie + neurologické kontroly



**Obr. 5** ROC křivka p-NfH (likvor; pg/ml): odlišení ALS-komprese od prostých kompresí (myelo-/radikulopatií)



**Obr. 6** ROC křivka p-NfH (likvor; pg/ml): odlišení ALS-SMN od neurol. kontrol + prostých kompresí (myelo-/radikulopatií)

## 4.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS

Zachytili jsme 15 patogenních variant u 15 pacientů, nejčastěji HRE v *C9orf72* (12/88; 6 mužů, 13,5 %); u 6 šlo o fALS (6/9; 66,7%), u dalších 6 nebyl průkazný rodinný výskyt (6/79; 7,55% sALS). U dalších 3 pacientů jsme detekovali (heterozygotní) varianty ve *FUS*: p.(Arg521Cys) *TARDBP*: p.(Ala382Thr) a *TBKI* (splice donor c.540+1G>T). Obě varianty ve *FUS* a *TARDBP* již byly opakovaně popsány a jsou dokumentovány v databázi ClinVar jako patogenní, resp. pravděpodobně patogenní bez rozporujících nálezů; obě byly detekovány u fALS pacientů našeho souboru. V souhrnu jsme detekovali patogenní variantu u 8 z 9 fALS případů (88,9%). Varianta v *TBKI*, nalezená u sALS pacienta našeho souboru, rovněž byla zaznamenána v rámci jedné studie, ale bez popisu fenotypu pro tuto konkrétní variantu (Cirruli ET. et al., 2015).

V rámci skupiny s časným věkem rozvoje (24/88, 27,3% souboru) jsme zaznamenali dva fALS pacienty s HRE v *C9orf72* (8,33% podskupiny), u ostatních pacientů této podskupiny (22 sALS) nebyla detekována kauzální varianta. Mezi pacienty se standardním věkem rozvoje sALS jsme kauzální variantu detekovali u 7 z 57 (12,3 %) jedinců. Rozdíl v zachytu patogenních mutací mezi těmito dvěma podskupinami nebyl statisticky významný ( $p = 0,181$ ). Dále jsme pak mezi sALS pacienty pozorovali významně častěji bulbární, nežli spinální region rozvoje u nosičů kauzálních variant (bulbární 5/17, 29,4%; spinální 2/62, 2,55%;  $p = 0,004$ ); resp. významnou asociaci HRE v *C9orf72* s bulbárním regionem rozvoje (7/12 /58,3 %/ vs. 13/76 /17,1 %/ u ostatních,  $p = 0,005$ ). V rámci celého souboru naplnilo 7 pacientů diagnostická kritéria FTD (všichni sALS); u 3 ze 7 (42,9 %) jsme detekovali HRE v *C9orf72*. Přítomnost FTD byla mezi sALS pacienty ( $n = 79$ ) signifikantně asociována se zachytem patogenní varianty (3/7 vs. 4/72,  $p = 0,013$ ).

Dále jsme detekovali 16 vzácných variant u 15 pacientů (všichni sALS, 18,9 % podskupiny) (Obr. 7). Formou literární rešerše jsme konfirmovali, zda se jedná o novou, resp. již popsanou variantu.

V rámci našeho souboru jsme detekovali 7 nových, dosud nepopsaných variant (všechny v heterozygotním stavu) u 6 pacientů se sALS. Varianta v genu *NEK*: p.(Glu254\*) byla mutace typu nonsense (tvorba předčasného STOP-kodonu), vedoucí ke ztrátě funkce (loss-of-function/ LoF). Význam LoF variant v tomto genu je ale nadále předmětem intenzivní vědecké debaty a proto jsme námi nalezenou variantu (při nemožnosti provést segregáční či funkční analýzu) klasifikovali jako nejasného významu. Dále jsme našli dvě nové varianty v genu *SETX*: p.(Phe1599Ser) a p. (Ser2289Pro) u 2 pacientů (z toho pacientka s časným věkem rozvoje ALS). Obě varianty byly typu missense. Další nové varianty jsme poté identifikovali v genech *SPAST*: p.(Ser3Phe) a *TBK1*: p.(Met690Thr). Na základě *in silico* predikce, resp. nedostupnosti segregáční, nebo funkční analýzy k dalšímu detailnějšímu posouzení potenciální patogenicity jsme tedy všechny tyto varianty klasifikovali jako nejasného významu.

U jedné pacientky souboru s časným věkem rozvoje a fenotypem PMA jsme detekovali dvě nové varianty nejasného významu současně: p. (Asp126Glu) v *SOD1* a p. (Val57Ile) v *TARDBP*. Provedli jsme segregáční analýzu, která prokázala, že variantu v *SOD1* zdědila pacientka od svého nepostiženého otce, zatímco variantu v *TARDBP* od své nepostižené matky.

Dále jsme pak v souboru detekovali 9 dříve popsaných variant v ostatních genech, asociovaných s patogenezí ALS (Obr. 7). Pozoruhodný byl nález u dvou příbuzných pacientek – matky s bulbárním regionem rozvoje v 64 letech a s přidruženou FTD; a dcery, rovněž s bulbárním regionem rozvoje ve 41 letech (pouhé 2 roky s odstupem od diagnózy u matky), bez průkazné FTD. U obou pacientek byla detekována HRE v *C9orf72* a zároveň již dříve popsaná varianta v genu *OPTN*: p.(Ser262\*), v heterozygotním stavu (dosud popsán pouze autozomálně recesivní typ dědičnosti) (Pottier C. et al., 2018).

Charakteristika pacientů	Gen	Typ dědičnosti	Referenční sekvence	DNA varianta	Změna proteinu	Allelická frekvence gnomAD v2.1.1	dbSNP	ACMG kritéria	ACMG klasifikace	ClinVar	PolyPhen-2	SIFT	CADD	Splice AI				
Pohlaví	Věk při rozvoji ALS	Subtyp ALS	fALS															
Ž	59	spinální	Ne	FIG4 <sup>L</sup>	AD	NM_014845.6	c.122T>C	p.(Ile41Thr)	1.0 e <sup>-3</sup>	rs121908287	PM3 <sup>str</sup> , PS3 <sup>sup</sup> , PM2 <sup>mod</sup>	Patogenní	Patogenní	D (1)	D (0)	25,8	B (0)	
M	29	spinální	Ne	FIG4 <sup>L</sup>	AD	NM_014845.6	c.2096C>T	p.(Arg699Cys)	3.54 e <sup>-5</sup>	rs764799053	PM2 <sup>mod</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Nejistý	Nejistý	U (0.96)	D (0)	33	B (0.01)	
Ž	59	Spinální + FTD	Ne	KIF5A	AD	NM_004984.4 NG_088155.1	c.291+5G>A g.18635G>A c.1084-	N/A	1.2 e <sup>-5</sup>	rs775732465	PM2 <sup>mod</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Nejistý	Nejistý	N/A	N/A	N/A	M (0.33)	
M	50	Bulbární	Ne	NEFH <sup>S</sup>	AD	NM_021076.4 NG_008404.1	3C>G g.10529C>G	N/A	1.2 e <sup>-5</sup>	rs1347201784	PM2 <sup>mod</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Nejistý	Nejistý	-	N/A	N/A	N/A	S (0.55)
M	59	Bulbární	Ne	NEK1 <sup>S</sup>	AD	NM_001199397.3	c.760G>T	p.(Glu254*)	0	-	PVS1 <sup>mod</sup> , PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	Nejistý	-	N/A	N/A	N/A	S (0.55)
Ž*	64	Bulbární + FTD	Ne	OP7N	AR	NM_001008212.2	c.785C>A	p.(Ser262*)	1.42 e <sup>-5</sup>	rs750571210	PM3 <sup>str</sup> , PVS1 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0)
Ž*	41	Bulbární	Ano	OP7N	AR	NM_001008212.2	c.785C>A	p.(Ser262*)	1.42 e <sup>-5</sup>	rs750571210	PM3 <sup>str</sup> , PVS1 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0)
Ž	38	Spinální	Ne	SETX <sup>L</sup>	AD	NM_015046.7	c.4796T>C	p.(Phe1599Ser)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	Nejistý	-	D (0.99)	D (0)	26,8	B (0)
M	64	Spinální	Ne	SETX <sup>L</sup>	AD	NM_015046.7	c.6865T>C	p.(Ser2289Pro)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	Nejistý	-	D (0.99)	U (0.025)	24,5	B (0)
Ž**	37	Jen α-MN	Ne	SOD1	AD/AR	NM_000454.5	c.378C>G	p.(Asp126Glu)	0	-	PM1 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PM5 <sup>sup</sup> , PP3 <sup>sup</sup>	Pravděpod. patogenní	Pravděpod. patogenní	-	D (0.99)	D (0)	25,5	B (0.03)
Ž	57	Spinální	Ne	TARDBP	AD	NM_007375.4	c.169G>A	p.(Val57Ile)	0	-	PM2 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup>	Nejistý	Nejistý	-	B (0.03)	B (0.7)	21	B (0)
M	64	Bulbární	Ne	SPAST	AD	NM_014946.4	c.8C>T	p.(Ser3Phe)	0	-	PM2 <sup>mod</sup> , PP2 <sup>sup</sup>	Nejistý	Nejistý	-	D (0.98)	D (0)	23,4	B (0.03)
M	60	Jen α-MN	Ne	SPG11	AR	NM_025137.4	c.2757_2775 del	p.(Leu920Trpfs*10)	0	rs1595888828	PVS1 <sup>str</sup> , PM3 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	Pravděpod. patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0)
M	29	Spinální	Ne	TBK1	AD	NM_013254.4	c.2069T>C	p.(Met690Thr)	2.79 e <sup>-5</sup>	rs312262752	PVS1 <sup>str</sup> , PM3 <sup>str</sup> , PM2 <sup>mod</sup> , PP1 <sup>sup</sup> , PP5	Patogenní	Patogenní	Patogenní	N/A	N/A	N/A	B (0.06)
Ž	70	Bulbární	Ne	UBQLA2	XLD	NM_013444.4	c.1481C>T	p.(Pro494Leu)	0	-	PM2 <sup>mod</sup>	Nejistý	Nejistý	-	D (0.9)	D (0.1)	24,9	B (0.02)

Všechny uvedené varianty jsou v heterozygotním stavu; \* označuje 2 příbuzné jedince, matku a dceru – matka byla klasifikována jako sporadická forma ALS v době zařazení do prospektivní kohorty (ad hoc) u dcery se ALS rozvinula až s odstupem 2 let; \*\* označuje jednotlivou pacientku, u které byly detekovány současně 2 varianty (v SOD1 a TARDBP); jen α-MN – fenotyp s izolovaným postižením spinálních motoneuronů; fALS – familiární forma ALS (alespoň 1 přímý příbuzný s ALS ar nebo FTĐ, Gen – pro daný gen jsou pouze omezené důkazové asociace s ALS; Gen<sup>S</sup> – gen zvýšené susceptibilitě k ALS (nikoliv kauzální); AD – autozomálně dominantní; AR – autozomálně recesivní; XLD – X-vázaný, dominantní typ; Allelické frekvence v gnomAD v2.1.1 ukazují agregovanou frekvenci, uvedenou v databázi „The Genome Aggregation Database“; dbSNP – databáze „Single Nucleotide Polymorphism Database“ – uvedeno je identifikační číslo dané varianty v této databázi; ACMG kritéria - ACMG, „The American College of Medical Genetics and Genomics“ (Americká společnost pro lékařskou genetiku a genomiku); ClinVar – veřejná databáze záznamů o vztahu variant v humánní DNA a příslušných pozorovaných fenotypů, včetně důkazů; PolyPhen-2 – automatický predikční nástroj, odhadující dopad příslušné změny aminokyseliny na strukturu a funkci daného humánního proteinu; SIFT – algoritmus „The Sorting Intolerant from Tolerant“ (Třídění tolerantního od netolerantního) predikuje efekt exonových variant na funkci proteinu; CADD – nástroj „The Combined Annotation Dependent Depletion“ (Kombinovaná anotace v závislosti na deplici) kvantifikuje míru škodlivosti jednotlivých polymorfismů, resp. vícečetných změn nukleotidů a rovněž posunových mutací typu delece i inserce v humánním genu; čím nižší skóre, tím benignější varianta; SpliceAI – algoritmus predikce sesifhových variant mRNA na základě strojového učení umělé inteligence; D – deleterious (škodlivý); U – uncertain (nejistého významu); B - benigní; N/A – nelze aplikovat; ACMG kritéria: úroveň zhodnocení patogenicity: vsf - very strong (velmi silná úroveň důkazu), str - strong (silná úroveň), sup - supporting (podporující), mod - moderate (střední úroveň důkazu).

Obr. 7 Varianty nejasného významu (pro rozvoj ALS) v našem souboru

## 5. DISKUZE

### 5.1. Využití neurofilament jako biomarkerů u ALS

V rámci celé studijní populace byla diagnostická síla hladin p-NfH i NfL v likvoru pro odlišení kohorty všech pacientů s ALS od pacientů z ostatních dvou kohort velmi dobrá. Po vyřazení kohorty myelo-/radikulopatií dále signifikantně vzrostla a dosahovala vynikajících a zároveň velmi podobných hodnot, jako u jiných studií (De Schaepdryver M. et al., 2018). Kohorta pacientů s kompresivní myelo-/radikulopatií vykazovala signifikantně vyšší hladiny obou neurofilament v likvoru oproti neurologickým kontrolám, což lze pravděpodobně nejlépe vysvětlit větším rozsahem a významně rychlejší dynamikou obecné axonální léze u kompresivní etiologie. Tuto hypotézu klíčového vlivu rozsahu a dynamiky axonální léze podporuje naše vlastní pozorování signifikantně vyšších hladin obou neurofilament v likvoru u akutních vs. chronických myelopatií, což je rovněž v souladu s pozorováním ostatních autorů (Ohya Y. et al., 2015). Tyto poznatky poté akcentují význam skladby kontrolních kohort pro výsledné hodnoty jak diagnostické efektivity, tak i diagnostických mezí (Witzel S. et al., 2022).

Vyšetření z krve představuje méně invazivní a všeobecně dostupnou alternativu k vyšetření likvoru; na druhou stranu, likvorový kompartment pravděpodobně lépe odráží patofyziologické děje v CNS. Naším cílem bylo proto zhodnotit korelaci hladin p-NfH v séru a v likvoru, resp. nakolik lze sérovou hladinu využít jako zástupný ukazatel. Ačkoliv existuje metoda s cca. 100x vyšší senzitivitou pro detekci hladin NfL, resp. p-NfH v séru ve srovnání s ELISA metodou (SiMoA), vysoká pořizovací i provozní cena a zároveň certifikace pouze pro výzkumné účely významně limituje její obecnou dostupnost. Zvolili jsme tedy komerčně dostupnou ELISA soupravu jako široce dostupné řešení pro rutinní laboratorní diagnostiku. Zároveň jsme cílili na replikaci nálezů jiné studie, využívající identickou ELISA soupravu (De Schaepdryver M. et al., 2018). Pozorovaná korelace hladin p-NfH v séru a likvoru byla významná a v celém souboru silná ( $\tau_b = 0,357$ ), ale ve

srovnání s korelací mezi hladinami p-NfH a NfL v likvoru ( $\tau_b = 0,684$ ) významně nižší. Diagnostická síla hladin p-NfH byla statisticky významně nižší, než pro p-NfH, resp. NfL v likvoru a celkově byla pouze dostatečná a zároveň nižší, než u obdobných průřezových studií (De Shaepdryver M. et al., 2018; Halbgebauer S. et al., 2022), s pozitivní, resp. negativní prediktivní hodnotou 63,5 %, resp. 62,5 %. Pravděpodobným vysvětlení je jednak odlišná skladba kontrolních kohort v našem souboru, jednak odlišná struktura naší ALS kohorty co do délky trvání nemoci, protože s narůstající délkou trvání nemoci vede protilátkově zprostředkovaná agregace p-NfH k snižování jeho hladin v krvi (Lu CH. et al., 2015). Průřezové měření p-NfH v séru hodnotíme tedy jako nedostatečně spolehlivé.

Sekundárními cíli naší práce bylo zhodnotit klinické determinanty hladin neurofilament. V obou kontrolních kohortách, ale nikoliv u pacientů s ALS, byl prokázán významný, nezávislý efekt věku, resp. mužského pohlaví, v souladu s daty ostatních studií (Bridel C. et al., 2019). V kohortě ALS se jako dvě klíčové determinanty hladin NfL a p-NfH v likvoru jeví: (1) klinický fenotyp (izolované postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu s nižšími hladinami) (2) rychlost progresu nemoci ( $\Delta$  FS), opět v souladu s nálezy ostatních studií (Gaiani A. et al., 2017). Ačkoliv více než polovina pacientů s izolovaným postižením spinálního  $\alpha$ -motoneuronu (ALS-SMN) manifestovala v dalším průběhu onemocnění postižení kortikospinální dráhy, hladiny žádného z neurofilament se u těchto pacientů nelišily od zbytku skupiny ALS-SMN, pravděpodobně v důsledku podobné rychlosti progresu mezi oběma podtypy.

Při analýze prognostické hodnoty hladin neurofilament jsme pozorovali silnou pozitivní korelaci mezi NfL a parametrem  $\Delta$  FS. Jak hladina NfL, tak parametr  $\Delta$  FS významně negativně korelovaly s délkou přežití; v případě  $\Delta$  FS byla ovšem tato korelace silnější. Stanovení hladiny NfL v rámci predikce prognózy je tak spíše komplementární, ale nikoliv superiorní vůči již existujícím nástrojům.

Diagnostická efektivita obou neurofilament v likvoru při odlišení pacientů s izolovaným postižením  $\alpha$ -motoneuronů (ALS-SMN) od neurologických kontrol byla v případě NfL v likvoru statisticky významně, pro p-NfH nevýznamně nižší, než při obdobném odlišení ostatních pacientů s ALS. Ačkoliv z perspektivy statistické analýzy byla diagnostická efektivita nadále velmi dobrá, podrobná analýza odhalila problematické aspekty z klinického úhlu pohledu. Pacienti ze skupiny ALS-SMN, označeni jako falešně negativní (5/15, 33,3 % pro p-NfH v likvoru; 6/15, 40% pro NfL v likvoru) byli zároveň pomalí progresori. U těchto pacientů byla správná diagnóza určena až pomocí extenzivního diferenciálně diagnostického vyšetřovacího procesu, resp. klinického monitorování progresu onemocnění v čase. Dále v rámci skupiny ALS-SMN 46,6 % pacientů naplnilo kritéria radiologického nálezu, suspektního z kompresivní etiologie. Veškeré hodnoty diagnostických mezí, dosažené při odlišení ALS-SMN od obou kontrolních kohort, vedly k pozitivním prediktivním hodnotám < 50 %, resp. k vysoké proporci (40 % pro p-NfH; 53,3 % pro NfL) falešně negativních pacientů, přičemž u 4 falešně negativních pacientů byl pozorován suspektní radiologický nálezu. To činí dle našeho názoru v této specifické situaci test v podstatě nepřínosný.

Při odlišení pacientů s ALS a současnou kompresí od prostých kompresí dosahovala hladina p-NfH v likvoru dobrou, hladina NfL v likvoru a p-NfH v séru pouze dostatečnou diagnostickou sílu. Významný překryv hodnot mezi oběma kohortami vedl ovšem k významné proporci falešně negativních pacientů s prostou kompresí. Zaměřili jsme se rovněž na klinické implikace těchto výsledků: 70% pacientů s prostou kompresí, kteří podstoupili úspěšnou chirurgickou dekompresi, test označil jako falešně pozitivní, tzn. nesprávně jako ALS. Využití testu by tedy zvyšovalo riziko kontraindikace, popř. zbytečného oddálení efektivní léčby. S ohledem na podstatně vyšší prevalenci jednotek s kompresivním postižením nervových struktur v populaci, než ALS, hodnotíme stanovení hladin neurofilament pro daný diferenciálně diagnostický scénář jako nepřínosné.

## 5.2. Profil genetických mutací u pacientů se sALS i fALS

Familiární formy ALS byly v našem studijním souboru pravděpodobně nad-representovány (10,1 %) proti reálné situaci v populaci. Jednalo se záměr, pro očekávanou větší pravděpodobnost detekce kauzálních mutací u této skupin, jak následně potvrdil průkaz patogenních variant u 8 z 9 pacientů (88 %). Tato míra detekce je vyšší, než u řádově větších kohort (Zou ZY. et al., 2017), tzn. pravděpodobně nereflektuje proporcionálně situaci v celé české populaci. Na druhou stranu, detekce kauzálních variant v našem souboru sALS (7/79; 8,9 %) koresponduje s nálezy recentní, rozsáhlé studie (van Daele SH. et al., 2023) a mohla by adekvátně reprezentovat situaci v české populaci.

Nejčastější kauzální mutací byla expanze hexanukleotidových repetitiv (HRE) v genu *C9orf72*, detekovaná u 12 pacientů (13,5 %) souboru; resp. u 6 sporadických pacientů (7,6 % sALS), souhlasně s ostatními evropskými kohortami (Van Daele SH. et al., 2023). Jde tedy o predominantní genetickou etiologii i u českých pacientů s ALS. Pacienti s HRE v *C9orf72* vykazovali signifikantně častější rozvoj v bulbárním regionu (7/12, 58,3 %), než zbytek souboru, souhlasně s většími evropskými kohortami (Chió A. et al., 2012). Jako klinický prediktor byl bulbární region rozvoje, resp. přítomnost FTD u sALS pacientů signifikantně častěji asociovány s detekcí kauzální mutace ve srovnání se spinálním regionem, resp. absencí FTD. Malý datový soubor (malá statistická síla) ovšem limitují zevšeobecnitelnost těchto závěrů.

Skupina pacientů s časným rozvojem ALS byla v našem souboru rovněž záměrně disproporčně velká (27,3 % vs. 10 % dle literatury, Turner MR. et al., 2012), neboť jsme - na základě literárních údajů (Chió A. et al., 2018) - očekávali vyšší záchyt kauzálních mutací i u této podskupiny. V rozporu s tímto očekáváním jsme v této podskupině detekovali pouze HRE v *C9orf72* u 2 pacientů s fALS a 5 variant nejasného významu u 4 pacientů se sALS. Spekuluje nad vysvětlením v podobě kauzálních genetických faktorů, nedekovaných dostupnými metodami genetického vyšetření; k této hypotéze nás vede studie s obdobnými nálezy, jako v našem



souboru, která ovšem navíc analyzovala výskyt variant v genech, kódujících RNA-vázající proteiny, dosud neklasifikované jako kauzální pro patogenezi ALS, ale jednoznačně zapojené v procesech, asociovaných s patofyziologií ALS (Cooper-Knock J. et al., 2017). Tuto hypotézu považujeme za racionální východisko další studie k objasnění míry genetické etiologie u podskupiny pacientů s časným rozvojem ALS.

Kromě 2 patogenních variant u 2 pacientů s fALS - p.(Arg521Cys) ve *FUS* a p.(Ala382Thr) v *TARDBP* - jsme detekovali u pacientky s časným věkem rozvoje sALS novou, nepopsanou variantu v *TARDBP*: p.(Val57Ile) nejasného významu v heterozygotním stavu; identickou variantu nesla nepostižená matka. U pacientky jsme však detekovali druhou novou (missense) variantu v heterozygotním stavu: p.(Asp126Glu) v genu *SOD1*, kterou daná pacientka zdědila od nepostiženého otce. Ačkoliv segregáční analýza vyloučila kauzální roli obou jednotlivých variant samostatně, spekulovali jsme na základě literárních důkazů (Jeon GS. et al., 2019; Gentile G et al. 2021) ohledně možného synergistického efektu těchto variant v případě, kdy se souběžně vyskytnou u jednoho jedince zároveň.

V našem souboru jsme nezachytili žádnou, jednoznačně kauzální variantu v genu *SOD1* u sALS ani fALS pacientů, nejpravděpodobněji pro celkově malý počet pacientů v souboru, resp. nerovnoměrné zastoupení všech regionů ČR (a tím pádem, např. nezařazení regionálního clusteru fALS pacientů).

V průběhu poslední dekády řada studií zkoumala význam oligogenní dědičnosti v patogenezi ALS (van Blitterswijk M. et al., 2012). Nejčastěji je tento jev pozorován u HRE v *C9orf72* (van Daele SH. et al., 2023). Někteří autoři argumentují proti významu nálezu přidružených variant u případů, podmíněných HRE v *C9orf72*, a dokazují, že tyto varianty nemodifikují významně projevy, ani průběh onemocnění (Keogh MJ. et al., 2018). V našem souboru jsme, kromě pacientky s variantami v *SOD1* a *TARDBP*, dále pozorovali současný výskyt patogenní varianty p.(Ser262\*) v genu *OPTN* v heterozygotním stavu současně s HRE v *C9orf72* u dvou příbuzných pacientek (matka a dcera). Pro tuto variantu v

*OPTN* byl prokázán pouze autozomálně recesivní typ dědičnosti (Pottier C. et al., 2018). Odlišný fenotyp těchto pacientek ale nelze vysvětlit genetickými faktory při detekci identických variant (v *C9orf72i* v *OPTN*).

Pro zachycenou novou variantu v genu *NEK1*: p.(Glu254\*) *in silico* analýza predikuje efekt ztráty funkce (LoF – loss-of-function); někteří autoři hodnotí LoF varianty jako přímo patogenní (Brenner D. et al., 2016), jiní argumentují, že se jedná pouze o faktor zvýšené susceptibility a spekulují stran nutnosti oligogenní interakce s jinými vzácnými genovými variantami (Lattante S. et al., 2021). Variantu jsme konzervativně klasifikovali jako nejasného významu.

Detekovali jsme rovněž dvě varianty v genu *TBKI* u dvou pacientů se spinálním rozvojem sALS, bez současně přítomné FTD. U první varianty se jednalo o již zaznamenanou, pravděpodobně patogenní variantu typu splice-donor c.540+1G>T (Cirruli ET. et al., 2015), s narušením sestřihového místa a haploinsuficiencí exprimovaného enzymu jako patogenním mechanismem. Druhá variant byla nová, dosud nepopsaná substituce typu missense, p.(Met690Thr); dle *in silico* predikce nejasného významu. Mechanizmy, kterými missense mutace mohou vést k patogenezi ALS, nadále nejsou uspokojivě objasněny (Gurfinkel Y. et al., 2022). Dvě nové, dosud nepopsané missense varianty v genu *SETX* u dvou pacientů našeho souboru jsme rovněž klasifikovali jako nejasného významu. Varianty v tomto genu jsou asociovány s AD familiární formou ALS (typ 4), s časným věkem rozvoje a velmi pomalou progresí bez postižení ventilačních nebo bulbárních svalů (Bennet CL. et al., 2018); fenotyp pacientů z našeho souboru v tomto ohledu nekorespondoval a pro nemožnost provedení segregáční analýzy, resp. funkčních důkazů jsme nebyli schopni jednoznačně zhodnotit patogenicitu těchto dvou variant.

## 6. ZÁVĚR

Stran implementace neurofilament jako diagnostických, popř. prognostických biomarkerů u ALS lze konstatovat, že u pacientů s jasně vyjádřeným klinickým obrazem nemoci a bez suspektního radiologického nálezu vykazuje jejich elevace dobrou diagnostickou efektivitu k odlišení od alternativních diagnóz a lze je využít jako oporu definitivní diagnózy. Diagnostická síla obou neurofilament v likvoru byla v našem souboru srovnatelná. Vždy je ovšem nutné přihlížet k jejich nespecifické povaze (reflektují pouze rozsah a dynamiku obecného axonálního poškození). V otázce prognostického významu jsme pozorovali nejvyšší korelaci mezi prognózou a hladinami NfL v likvoru; stávající predikční nástroj, kalkulovaný z všeobecně dostupné a rozšířené klinimetrické škály ALS-FRS-R ( $\Delta$ FS), koreloval ovšem s prognózou ještě těsněji.

Na druhou stranu, prokázali jsme, že faktory, podmiňující inkompletně vyjádřený klinický nálezh ALS (izolované postižení spinálního  $\alpha$ -motoneuronu, pomalá progresse nemoci) jsou zároveň asociovány s nižšími hladinami obou neurofilament v likvoru. Pro tyto varianty ALS je diagnostický přínos stanovení hladin neurofilament významně nižší. Ani pro odlišení pacientů s ALS a radiologickým nálezem, suspektním z komprese, od jednotek s prostou kompresí nervových struktur, není elevace hladin neurofilament spolehlivým diskriminačním nástrojem, navíc s vysokým rizikem falešné positivity u akutních prostých kompresí, což jsou zároveň pacienti, nejvíce profitující z chirurgické léčby.

Nakonec, ačkoliv měření p-NfH ze séra s využitím ELISA soupravy představuje preferované, méně invazivní řešení, nízká senzitivita, resp. specificita testu k detekci pacientů s ALS nepodporuje jeho využití ani jako skríninkového nástroje. V době, kdy jsou k dispozici zcela superiorní metody detekce (SiMoA) neurofilament v krvi, nevyváží dostupnost a nízká cena nedostatečnou diagnostickou efektivitu testů na bázi ELISA soupravy.

Na základě poznatků z další naší studie, zaměřené na detekci variant v genech, asociovaných s ALS, resp. na definování klinických prediktorů kauzálních mutací, lze konstatovat, že frekvence HRE v C9orf72 je mezi českými pacienty s ALS velmi podobná, jako v ostatních evropských populacích. Zároveň naše pozorování naznačuje určité konzistentní fenotypové znaky (bulbární region rozvoje, nebo fenotyp s predominantním bulbárním postižením; přítomnost FTD), které jsou i mezi sporadickými pacienty asociovány s větší pravděpodobností detekce HRE v C9orf72. I s ohledem na nejvyšší prevalenci této varianty je tak z našeho pohledu racionálním prvním krokem molekulárně genetického vyšetření, provést vyšetření expanze hexanukleotidových repetitiv v C9orf72, obzvláště u pacientů s uvedeným fenotypem.

Patogenní, resp. pravděpodobně patogenní varianty ve *FUS*, *TARDBP* a *TBK1*, které jsou nalézány u ostatních evropských kohort, jsou přítomny i v populaci českých pacientů s ALS. Na druhou stranu, v našem souboru jsme nenalezli žádnou prokazatelně kauzální variantu v *SOD1*. V rozporu s původním záměrem, na základě kterého jsme cíleně zařadili disproporčně velký počet pacientů s časným věkem rozvoje ALS, jsme u této skupiny pozorovali nízkou míru detekce patogenních, resp. pravděpodobně patogenních variant. Na druhou stranu, tento poznatek implikuje možnost existence relevantních variant v genech, které dosud nebyly definovány jako kauzálně asociované s ALS a proto nebyly ani v našem souboru vyšetřeny. Domníváme se, že další extenzivní výzkum by se měl prioritně zaměřit právě na tuto kohortu pacientů. Ačkoliv jsme detekovali řadu variant nejasného významu, z nichž některé byly zcela nové, nebylo možné definitivně zhodnotit jejich patogenicitu. V tomto ohledu bude nutná nezávislá detekce v dalších kohortách, optimálně s možností segreganční analýzy a vyšetření funkčního dopadu varianty (modely pro transgenní expresi, modely s indukovanými pluripotentními buňkami aj.).

## 7. SOUHRN (SUMMARY)

ALS je (klinicky i patofyziologicky) heterogenní soubor neurodegenerací motorického systému; nárůst poznání a pochopení genetické etiologie (byť velice komplexní) nese příslib cílené, efektivnější terapie. Klinická heterogenita vede často k chybné diagnóze, s řadou nežádoucích jevů (neindikovaná chirurgická, resp. farmakologická léčba). Tato dizertační práce chce jednak upozornit na možnosti a problematiku správné a včasné diagnózy; jednak zhodnotit profil genetických variant u českých pacientů s ALS, protože tato data dosud zcela chybí. Prvním hlavním cílem práce bylo posoudit možnost implementace diagnostických testů, stanovujících hladiny lehkých (NfL) a fosforylovaných těžkých (p-NfH) řetězců neurofilament v likvoru a séru, hlavně u diagnosticky obtížných situací. Vedlejším cílem bylo určit determinanty hladin neurofilament. Druhým z hlavních cílů byla pilotní analýza frekvence genetických variant u sporadických i familiárních forem ALS v ČR. Vedlejším cílem bylo určit klinické prediktory záchytu kauzální mutace. Naše výsledky prokázaly, že u pacientů s typickým obrazem ALS dosahují obě neurofilamenta v likvoru velmi dobrou a srovnatelnou diagnostickou efektivitu a mohou být využita jako podpůrné diagnostické kritérium. Na druhou stranu, varianty s neúplně vyjádřeným fenotypem ALS, nebo s pomalou progresí jsou asociovány s nižšími hladinami neurofilament. Naopak u relevantních alternativních diagnóz (komprese nervových struktur) vede rozsáhlé axonální poškození k jejich výrazné elevaci, což limituje jejich využití v diagnosticky obtížných situacích. Studie, hodnotící zastoupení genetických variant u českých pacientů prokázala nejvyšší frekvenci HRE v *C9orf72*, tak jako v ostatních evropských kohortách. Bulbární region rozvoje, resp. komorbidní FTD jsou u sporadických pacientů asociovány s větší pravděpodobností detekce této varianty. Ačkoliv jsme dále detekovali řadu variant nejasného významu, z nichž některé nebyly dosud popsány, k posouzení jejich patogenicity bude nutná nezávislá detekce v dalších kohortách, optimálně s možností segregační analýzy, popř. s provedením cílených vyšetření k určení jejich funkčního dopadu.

ALS is a (clinically and pathophysiologically) heterogeneous group of neurodegeneration of the motor system; the expanding understanding of its genetic aetiology (although very complex) holds the promise of targeted, more effective therapies. Clinical heterogeneity often leads to misdiagnosis, with some consequent adverse effects (unwarranted surgical or pharmacological treatment). This thesis seeks to highlight the possibilities and problems of correct and early diagnosis; on the other hand, to evaluate the profile of genetic variants in Czech ALS patients, as these data are still lacking. The first main objective of the thesis was to assess the possibility of implementing diagnostic tests, based on measurement of the levels of light (NfL) and phosphorylated heavy (p-NfH) neurofilament chains in cerebrospinal fluid and serum, especially in clinically difficult-to-distinguish situations. In addition, we aimed to evaluate the factors influencing neurofilament levels. The second main objective was a pilot study, estimating the frequency of genetic variants in sporadic and familial forms of ALS in the Czech Republic. A secondary objective was to find clinical predictors of a causal mutation. Our results showed that in a cohort of patients with typical ALS, neurofilament levels in the CSF achieve very good and comparable to each other diagnostic performance and can be used to support the diagnosis. On the other hand, variants with incomplete ALS phenotype or slow progression are associated with lower neurofilament levels. Conversely, in relevant alternative diagnoses (compression of nerve roots or myeloma), extensive axonal damage leads to their marked elevation, limiting their use in difficult-to-distinguish situations. The study on genetic variants in Czech patients showed the highest frequency of HRE in C9orf72, as in other European cohorts. Bulbar region of development or comorbid FTD is associated with a higher probability of detecting this variant in sporadic patients. Furthermore, although we detected several variants of unclear significance, some of which were novel, independent detection in other cohorts will be required to assess their pathogenicity, optimally including segregation analysis or targeted testing to determine their functional impact.

## 8. LITERATURA

1. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012 Nov 1;491(7422):56-65. doi: 10.1038/nature11632
2. Agosta F, Altomare D, Festari C, Orini S, Gandolfo F, Boccardi M et al. (2018). Clinical utility of FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 45(9), 1546–1556. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4033-0>
3. Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, et al. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 81(12), 1324–1326. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.207464>
4. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol*. 2013 Nov;9(11):617-28. doi: 10.1038/nrneurol.2013.203.
5. Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat Rev Neurol*. 2017 Feb;13(2):96-104. doi: 10.1038/nrneurol.2016.182
6. Benatar, M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V & Malaspina A (2018). Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Annals of neurology*, 84(1), 130–139. <https://doi.org/10.1002/ana.25276>
7. Bennett CL, Dastidar SG, Ling SC, Malik B, Ashe T, WadhwaM, et al. Senataxin mutations elicit motor neuron degeneration phenotypes and yield TDP-43 mislocalization in ALS4 mice and human patients. *Acta Neuropathol*. 2018 Sep;136(3):425-443. doi: 10.1007/s00401-018-1852-9
8. Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
9. Brenner D, Müller K, Wieland T, Weydt P, Böhm S, Lulé D, et al. NEK1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*, Volume 139, Issue 5, May 2016, Page e28, <https://doi.org/10.1093/brain/aww033>
10. Bridel C, van Wieringen WN, Zetterberg, H, Tijms BM, Teunissen CN, and the NFL Group et al. (2019). Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light
11. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000 Dec;1(5):293-9. doi: 10.1080/146608200300079536.

12. Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S & Hodges JR (2011). Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*, 134(Pt 9), 2582–2594. <https://doi.org/10.1093/brain/awr195>
13. Cellura, E., Spataro, R., Taiello, A. C., & La Bella, V. (2012). Factors affecting the diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*, 114(6), 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2011.11.026>
14. Cooper-Knock J, Robins H, Niedermoser I, Wyles M, Heath PR, Higginbottom A, et al. Targeted Genetic Screen in Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Novel Genetic Variants with Synergistic Effect on Clinical Phenotype. *Front Mol Neurosci*. 2017 Nov 9;10:370. doi: 10.3389/fnmol.2017.00370
15. Cooper-Knock J, Harvey C, Zhang S, Moll T, Timpanaro IS, Kenna KP, et al. Advances in the genetic classification of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2021 Oct 1;34(5):756-764. doi: 10.1097/WCO.0000000000000986.
16. Cordts I, Wachinger A, Scialo C, Lingor P, Polymenidou M, Buratti E et al. (2023). TDP-43 Proteinopathy Specific Biomarker Development. *Cells*, 12(4), 597. <https://doi.org/10.3390/cells12040597>
17. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):245-56. Doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011.
18. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Apr;89(4):367-373. doi: 10.1136/jnnp-2017-316605
19. Dreger M, Steinbach R, Otto M, Turner MR, Grosskreutz J. Cerebrospinal fluid biomarkers of disease activity and progression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 Apr;93(4):422-435. doi: 10.1136/jnnp-2021-327503.
20. Elamin M, Bede P, Byrne S, Jordan N, Gallagher L, Wynne B, et al. (2013). Cognitive changes predict functional decline in ALS: a population-based longitudinal study. *Neurology*, 80(17), 1590–1597. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828f18ac>
21. Galvin M, Ryan P, Maguire S, Heverin M, Madden C, Vajda A, et al. The path to specialist multidisciplinary care in amyotrophic lateral sclerosis: A population-based study of consultations, interventions and costs. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179796.
22. Gaiani A, Martinelli I, Bello L et al. Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Neurofilament Light Chain Levels in Definite Subtypes of Disease. *JAMA Neurol*. 2017 May 1;74(5):525-532. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.5398



23. Gentile G, Perrone B, Morello G, Simone IL, Andò S, Cavallaro S, Conforti FL. Individual Oligogenic Background in p.D91A-SOD1 Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Genes (Basel)*. 2021 Nov 23;12(12):1843. doi: 10.3390/genes12121843
24. Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, Uryu K, Neumann M, Brandmeir NJ, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol*. 2009 Feb;66(2):180-9. doi: 10.1001/archneurol.2008.558.
25. Gurfinkel Y, Polain N, Sonar K, Nice P, Mancera RL, Rea SL. Functional and structural consequences of TBK1 missense variants in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2022 Nov;174:105859. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105859.
26. Halbgebauer S, Steinacker P, Verde F, Weishaupt J, Oeckl P, von Arnim C et al. (2022). Comparison of CSF and serum neurofilament light and heavy chain as differential diagnostic biomarkers for ALS. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 93(1), 68–74. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2021-327129>
27. Hannaford A, Pavey N, van den Bos M, Geevasinga N, Menon P, Shefner JM, et al. Diagnostic Utility of Gold Coast Criteria in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*. 2021 May;89(5):979-986. doi: 10.1002/ana.26045.
28. Chiò A, Borghero G, Restagno G, Mora G, Drepper C, Traynor BJ et al. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain*. 2012 Mar;135(Pt 3):784-93. doi: 10.1093/brain/awr366
29. Chiò A, Mazzini L, D'Alfonso S, Corrado L, Canosa A, Moglia C, et al. The multistep hypothesis of ALS revisited: The role of genetic mutations. *Neurology*. 2018 Aug 14;91(7):e635-e642. doi: 10.1212/WNL.0000000000005996.
30. Izenberg A. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Diseases. *Continuum (Minneapolis)*. 2023 Oct 1;29(5):1538-1563. doi: 10.1212/CON.0000000000001345.
31. Jagaraj CJ, Shadfar S, Kashani SA, Saravanabavan S, Farzana F, Atkin JD. Molecular hallmarks of ageing in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Mar 2;81(1):111. doi: 10.1007/s00018-024-05164-9.
32. Jeon GS, Shim YM, Lee DY, Kim JS, Kang MJ, Ahn SH, et al. Pathological Modification of TDP-43 in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Mol Neurobiol*. 2019 Mar;56(3):2007-2021. doi: 10.1007/s12035-018-1218-2.
33. Keogh MJ, Wei W, Aryaman J, Wilson I, Talbot K, Turner MR et al. Oligogenic genetic variation of neurodegenerative disease genes in 980 postmortem human brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Aug;89(8):813-816. doi: 10.1136/jnnp-2017-317234.

34. Kimura F, Fujimura C, Ishida S, Nakajima H, Furutama D, Uehara H, et al. (2006). Progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis predicts survival time in ALS. *Neurology*, 66(2), 265–267.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000194316.91908.8a>
35. Lattante S, Doronzio PN, Conte A, Marangi G, Martello F, Bisogni G et al. Novel variants and cellular studies on patients' primary fibroblasts support a role for NEK1 missense variants in ALS pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 2021 Mar 25;30(1):65-71. doi: 10.1093/hmg/ddab015.
36. Lu CH, Petzold A, Topping J, Allen K, Macdonald-Wallis C, Clarke J, et al. (2015). Plasma neurofilament heavy chain levels and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: insights from a longitudinal study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 86(5), 565–573.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307672>
37. Ludolph A, Drory V, Hardiman O, Nakano I, Ravits J, Robberecht W, Shefner J; WFN Research Group On ALS/MND. A revision of the El Escorial criteria - 2015. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2015;16(5-6):291-2. doi: 10.3109/21678421.2015.1049183.
38. Marin B, Logroscino G, Boumédiène F, Labrunie A, Couratier P, Babron MC et al. Clinical and demographic factors and outcome of amyotrophic lateral sclerosis in relation to population ancestral origin. *Eur J Epidemiol*. 2016 Mar;31(3):229-45. doi: 10.1007/s10654-015-0090-x. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26458931.
39. Menon P, Higashihara M, van den Bos M, Geevasinga N, Kiernan MC, Vucic S. (2020). Cortical hyperexcitability evolves with disease progression in ALS. *Annals of clinical and translational neurology*, 7(5), 733–741.  
<https://doi.org/10.1002/acn3.51039>
40. Murphy NA, Arthur KC, Tienari PJ, Houlden H, Chió A, Traynor BJ. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. *Sci Rep* 7, 2116 (2017).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02364-1>
41. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3. doi: 10.1126/science.1134108.
42. Neuwirth C, Barkhaus PE, Burkhardt C, Castro J, Czell D, de Carvalho M et al. (2017). Motor Unit Number Index (MUNIX) detects motor neuron loss in pre-symptomatic muscles in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 128(3), 495–500.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.11.026>
43. Ohya J, Chikuda H, Kato S, Hayakawa K, Oka H, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Elevated levels of phosphorylated neurofilament heavy subunit in the cerebrospinal fluid of patients with lumbar spinal stenosis: preliminary findings. *Spine J*. 2015 Jul 1;15(7):1587-92. doi: 10.1016/j.spinee.2015.03.013

44. Phukan J, Elamin M, Bede P, Jordan N, Gallagher L, Byrne S, et al. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jan;83(1):102-8. doi: 10.1136/jnnp-2011-300188.
45. Pinto S, Swash M, de Carvalho M (2014) Does surgery accelerate progression of amyotrophic lateral sclerosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85(6):643–646. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-305770>
46. Poesen K, Van Damme P. Diagnostic and Prognostic Performance of Neurofilaments in ALS. *Front Neurol*. 2019 Jan 18;9:1167. doi: 10.3389/fneur.2018.01167
47. Pottier C, Rampersaud E, Baker M, Wu G, Wu J, McCauley JL et al. Identification of compound heterozygous variants in OPTN in an ALS-FTD patient from the CReATe consortium: a case report. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2018 Aug;19(5-6):469-471. doi: 10.1080/21678421.2018.1452947.
48. Reyes-Leiva D, Dols-Icardo O, Sirisi S, Cortés-Vicente E, Turon-Sans J, de Luna N, et al. Pathophysiological Underpinnings of Extra-Motor Neurodegeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Insights From Biomarker Studies. *Front Neurol*. 2022 Jan 18;12:750543. doi: 10.3389/fneur.2021.750543.
49. Richards D, Morren JA, Piore EP. Time to diagnosis and factors affecting diagnostic delay in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 2020;417:117054.
50. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
51. Riggs JE. Longitudinal Gompertzian analysis of amyotrophic lateral sclerosis mortality in the U.S., 1977-1986: evidence for an inherently susceptible population subset. *Mech Ageing Dev*. 1990 Sep;55(3):207-20. doi: 10.1016/0047-6374(90)90149-a.
52. Shahim P, Norato G, Sinaii N, Zetterberg H, Blennow K, Chan L et al. (2024). Neurofilaments in Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genes*, 15(4), 496. <https://doi.org/10.3390/genes15040496>
53. Shatunov A, Al-Chalabi A. The genetic architecture of ALS. *Neurobiol Dis*. 2021 Jan;147:105156. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105156.
54. Schönström N, Willén J. Imaging lumbar spinal stenosis. *Radiol Clin North Am*. 2001 Jan;39(1):31-53, v. doi: 10.1016/s0033-8389(05)70262-1

55. Srinivasan J, Scala S, Jones HR, Saleh F & Russell JA. (2006). Inappropriate surgeries resulting from misdiagnosis of early amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve*, 34(3), 359–360. <https://doi.org/10.1002/mus.20555>
56. Strong MJ, Grace GM, Freedman M, Lomen-Hoerth C, Wooley S, Goldstein LH, et al. Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009;10:3, 131-146, DOI: 10.1080/17482960802654364
57. Turner MR, Barnwell J, Al-Chalabi A, Eisen A. Young-onset amyotrophic lateral sclerosis: historical and other observations. *Brain*. 2012 Sep;135(Pt 9):2883-91. doi: 10.1093/brain/aws144
58. van Blitterswijk M, van Es MA, Hennekam EA, Doojies D, van Rheenen W, Medic J et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012 Sep 1;21(17):3776-84. doi: 10.1093/hmg/dds199.
59. Van Daele SH, Moisse M, van Vugt JJFA, Zwamborn RAJ, van der Spek R, van Rheenen W, et al. Genetic variability in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2023 Sep 1;146(9):3760-3769. doi: 10.1093/brain/awad120.
60. van Es MA, Goedee HS, Westeneng HJ, Nijboer TCW, van den Berg LH. Is it accurate to classify ALS as a neuromuscular disorder? *Expert Rev Neurother*. 2020 Sep;20(9):895-906. doi: 10.1080/14737175.2020.1806061.
61. van Rheenen W, Shatunov A, Dekker AM, McLaughlin RL, Diekstra FP, Pulit SL, et al. Genome-wide association analyses identify new risk variants and the genetic architecture of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*. 2016 Sep;48(9):1043-8. doi: 10.1038/ng.3622.
62. Vasta R, Chia R, Traynor BJ, Chiò A. Unraveling the complex interplay between genes, environment, and climate in ALS. *EBioMedicine*. 2022 Jan;75:103795. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103795.
63. Visser J, van den Berg-Vos RM, Franssen H, van den Berg LH, Wokke JH, de Jong JM et al. Disease course and prognostic factors of progressive muscular atrophy. *Arch Neurol*. 2007 Apr;64(4):522-8. doi: 10.1001/archneur.64.4.522. PMID: 17420313.
64. Westeneng HJ, Walhout R, Straathof M, Schmidt R, Hendrikse J, Veldink JH, van den Heuvel MP, van den Berg LH. Widespread structural brain involvement in ALS is not limited to the C9orf72 repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Dec;87(12):1354-1360. doi: 10.1136/jnnp-2016-313959.
65. Westeneng HJ, Debray TPA, Visser AE, van Eijk RPA, Rooney JPK, Calvo A, et al. Prognosis for patients with amyotrophic lateral sclerosis: development and validation of a personalised prediction model. *Lancet Neurol*. 2018 May;17(5):423-433. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30089-9.
66. Witzel S, Mayer K, Oeckl P. (2022). Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Current opinion in neurology*, 35(5), 699–704. doi:10.1097/WCO.0000000000001094.

67. Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, Zhan S, Wang S. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. 2020 Apr;267(4):944-953. doi: 10.1007/s00415-019-09652-y.
68. Zamani A, Thomas E, Wright DK. Sex biology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ageing Res Rev*. 2024 Mar;95:102228. doi: 10.1016/j.arr.2024.102228.
69. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Jul;88(7):540-549. doi: 10.1136/jnnp-2016-315018.

## PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

### 1. Původní vědecké práce, které jsou podkladem této disertační práce

#### a) s IF

1. **Baumgartner D**, Mazanec R, Hanzalová J. Diagnostic utility of neurofilament markers for MND is limited in restricted disease phenotype and for differentiation from compressive myeloradiculopathies. *J Neurol*. 2023 Mar;270(3):1600-1614. doi: 10.1007/s00415-022-11504-1. **IF<sub>2023</sub> = 4,8**
2. **Baumgartner D**, Mušová Z, Zídková J, Hedvičáková P, Vlčková E, Joppeková L, Kramářová T, Fajkusová L, Stránecký V, Geryk J, Votýpka P, Mazanec R. Genetic Landscape of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Czech Patients. *J Neuromuscul Dis*. 2024 Jul 25. doi: 10.3233/JND-230236. **IF<sub>2024</sub> = 3,2**

#### b) bez IF

3. **Baumgartner D**. ALS jako TDP43-proteinopatie: kognitivní poruchy u ALS, ALS Plus. *Neurol. praxi*. 2016;17(6):366-369 | DOI: 10.36290/neu.2016.077

### 2. Původní vědecké práce s, které nejsou podkladem disertační práce

#### a) s IF

1. Potockova V, Mala S, Hoskovcova L, Capek V, Nedelka T, Riedlbauchova L, **Baumgartner D**, Mensova L, Mazanec R. Thermal quantitative sensory testing as a screening tool for cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *Brain Behav*. 2022 Mar;12(3):e2506. doi: 10.1002/brb3.2506. **IF<sub>2021-2022</sub> = 2,078**
2. Potočková V, Malá Š, Tomek A, **Baumgartner D**, Mazanec R. Význam testování termických prahů v detekci neuropatie tenkých vláken u diabetiků 1. typu. *Cesk Slov Neurol N*. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(6): 692-697. **IF<sub>2016</sub> = 0,368**

3. **Baumgartner D**, Marusič P, Mazanec R. Kmenové buňky v léčbě amyotrofické laterální sklerózy – přehled současných klinických zkušeností. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 27-33. doi: 10.14735/amcsnn201727 **IF<sub>2017</sub> = 0,508**
4. Mensová L, **Baumgartner D**, Potočková V, Mazanec R. Pletencové svalové dystrofie. *Minimonografie. Cesk Slov Neurol N* 2022; 85(6): 435-448 <https://doi.org/10.48095/cccsnn2022435> **IF<sub>2022</sub> = 0,5**

**b) bez IF**

1. kolektivní monografie Vondra V, Vízek M, Doušová T, Pohunek P, Drábková J, Chlumský J, Kölbel F, Fila L, Koblížek V, Neumannová K, Charvát J, Stejskal R, Hoffmann R, Magerová H, **Baumgartner D**, et al.. *Dušnost : problém mnoha oborů . Praha: Mladá fronta, 2017, 262 s. ISBN 978-80-204-4610-7.*
2. Mazanec R, Neupauerová J, **Baumgartner D**, Potočková V, Laššuthová P, Šafka-Brožková D, Seeman P. Hereditární motorické neuropatie. *Neurol. praxi.* 2016;17(6):354-358 | DOI: 10.36290/neu.2016.074
3. Mazanec R, **Baumgartner D**, Potočková V. Toxické neuropatie. *Neurol. praxi.* 2017;18(1):20-24 | DOI: 10.36290/neu.2017.059
4. Mazanec R, Mensová L, **Baumgartner D**, Potočková V, Zámečník J. Diagnostický algoritmus u svalových dystrofií. *Neurol. praxi.* 2019;20(3):190-194 | DOI: 10.36290/neu.2019.017
5. Mensová L, **Baumgartner D**. Muž, který se nemohl ponořit – kazuistika pacienta s typickým průběhem pozdní formy Pompeho nemoci. *Neurol. praxi.* 2024;25(1):74-78 | DOI: 10.36290/neu.2024.003

**3. Přednášky, plakátová sdělení na odborných akcích**

IX. Neuromuskulární kongres, Brno, 6.5.2016; Ústní přednáška: „Amyotrofická laterální skleróza jako proteinopatie TDP-43“, **Baumgartner D**, Potočková V, Mazanec R

31. Český a slovenský neurologický sjezd, Brno, 23.11.2017; Ústní prezentace původní práce: Guillan – Barré syndrom: vybrané aspekty diagnostiky a léčby na vlastním souboru pacientů Neuromuskulárního Centra Neurologické kliniky 2.LF UK a FN Motol“, **Baumgartner D**, Potočková V, Tomek A, Mazanec R

24. Podkrušnohorské elektrofyzilogické dny, Jirkov u Chomutova, 16.3.2018; Ústní prezentace: „Respirační insuficience u pacientů s MND – diagnostika a management“, Baumgartner D

XI. Neuromuskulární kongres, Brno, 10.5.2018; Ústní prezentace: „Paraneoplastické neurologické projevy malobuněčného karcionomu plic – dvě kazuistiky“. **Baumgartner D**, Potočková V, Mensová L, Mazanec R

32. slovenský a český neurologický zjazd, Martin, Slovenská republika, 29.11.2018; Ústní prezentace: "Využití neurofilament v diagnostice onemocnění motoneuronů: retrospektivní studie na 144 pacientech"; **Baumgartner D**, Mazanec R, Hanzalová J

XII. Slovenský a český Neuromuskulární kongres, Bratislava, Slovenská Republika, 26.5.2019; Ústní prezentace s názvem: „Analýza klinického exomu a expanzních genů C9orf72 a ATXN2 v souboru pacientů s onemocněním motoneuronů“; **Baumgartner D**, Mušová Z, Hedvičáková P, Stánecký V, Mazanec R

33. Český a Slovenský neurologický sjezd, Praha, 28.11.2019; Vyzvaná ústní přehledová přednáška "ALS - aktualizace pro rok 2019"; **Baumgartner D**

13. Neuromuskulární kongres, Brno, 10.9.2020 ; Ústní přednáška: "Využití neurofilament v diagnostice onemocnění motoneuronů: retrospektivní studie na 164 pacientech“; **Baumgartner D**, Hanzalová J, Mazanec R

34. Český a slovenský neurologický sjezd, 31.3.2022; Ústní přednáška s názvem: "Analýza genů asociovaných s ALS – zkušenosti z Neuromuskulárního centra FN Motol", **Baumgartner D**, Mušová Z, Hedvičáková P, Mazanec R

15. Neuromuskulární kongres, Brno, 13.5.2022; Ustní prezentace kazuistiky a literárního přehledu geneticky podmíněných distálních myopatií: "Mladý muž s asymetrií lýtek", **Baumgartner D**, Mazanec R



16. Slovenský a český neuromuskulární kongres, 27.4.2023; Ústní prezentace dvou kazuistik a literárního přehledu problematiky autoimunitních nervosvalových onemocnění, resp. idiopatické myozitidy s inkluzními tělísky „Neuromyozitida“ a „Tenká předloktí – úzká stehna“, **Baumgartner D**

9th Congress of the European Academy of Neurology in Budapest, Hungary, 1. července 2023; e-Poster s názvem: "Limited utility of neurofilaments for diagnosis of restricted MND phenotypes and differentiation from compressive radiculopathies", **Baumgartner D**

Symposium: Základy multidisciplinární péče u pacienta s ALS, 17.1.2024, 2. Lékařská fakulta UK a FN Motol; Ústní prezentace: „Standardy péče o pacienty s ALS – jak si vedeme v reálné praxi“, **Baumgartner D**

Vejvalkovi myastenické dny, Neurologická klinika 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a VFN, Praha, 17.1.2024; Ústní prezentace: „Význam single-fiber EMG pro diagnostiku myasthenia gravis“, **Baumgartner D**

Školení primářů neurologie I 2024, Liberec, 24.4.2024; Ústní prezentace: „Péče o pacienty s onemocněním motoneuronů“, **Baumgartner D**

17. Neuromuskulární kongres, Brno, 19.4.2024; Ústní prezentace kazuistiky a literárního přehledu: „Nečekaná příčina motorické neuropatie“, týkající se neurologických, imunitně zprostředkovaných komplikací glutenové senzitivity

