

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



**RNDr. Jana Neupauerová**

**Vyšetření genů *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* a *SOD1* u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu**

**Examination of the genes *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* and *SOD1* among Czech patients with hereditary neuropathy axonal type**

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Petra Laššuthová, Ph.D.

Konzultant: Prof. MUDr. Pavel Seeman, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 04. 11. 2018

RNDr. Jana Neupauerová

Identifikační záznam:

NEUPAUEROVÁ, Jana.

Vyšetření genů *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* a *SOD1* u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu (Examination of the genes *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* and *SOD1* among Czech patients with hereditary neuropathy axonal type).

Praha, 2018. 109 stran, 3 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie.

Školitel: MUDr. Petra Lašuthová, Ph.D.

Konzultant: Prof. MUDr. Pavel Seeman, Ph.D.

**Klíčová slova:** Charcot-Marie-Tooth neuropatie, *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4*, *SOD1*, epilepsie, Sangerovo sekvenování, masivně paralelní sekvenování, celoexomové sekvenování

**Keywords:** Charcot-Marie-Tooth neuropathy, *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4*, *SOD1*, epilepsy, Sanger sequencing, massively parallel sequencing, whole exome sequencing

## Poděkování

Touhle cestou bych chtěla poděkovat lidem, kteří mi pomohli, podpořili mě a motivovali při psaní dizertační práce a během celého mého studia.

Moje poděkování patří především mé rodině a příteli, školitelce MUDr. Petře Laššuthové, Ph.D. za neustálou podporu a motivaci při studiu, konzultantovi Prof. Pavlu Seemanovi, Ph.D., oběma za vysoce odborné rady a připomínky a celému kolektivu DNA laboratoře za týmovou práci a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## Obsah

Souhrn.....	13
Summary.....	16
1 Vyšetření genů <i>DNM2</i> , <i>GARS</i> , <i>MORC2</i> , <i>TRPV4</i> a <i>SOD1</i> u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu.....	19
1.1 Úvod.....	19
1.1.1 Charcot-Marie-Tooth neuropatie.....	19
1.1.2 Klinické příznaky .....	19
1.1.3 Klasifikace .....	20
1.2 Cíle .....	30
1.3 Pacienti.....	31
1.4 Metodika .....	31
1.4.1 Izolace vzorků z biologického materiálu.....	31
1.4.2 Klasické Sangerovo sekvenování .....	31
1.4.3 Metodika MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) .....	41
1.4.4 Masivně paralelní sekvenování (MPS).....	42
1.5 Výsledky .....	45
1.5.1 <i>GARS</i> .....	45
1.5.2 <i>TRPV4</i> .....	46
1.5.3 <i>DNM2</i> .....	48
1.5.4 <i>MORC2</i> .....	50
1.5.5 <i>SOD1</i> .....	52
1.6 Diskuze.....	56
1.6.1 Mutace p.Met692Val v <i>GARS</i> .....	57
1.6.2 Mutace p.Arg186Gln v <i>TRPV4</i> .....	57
1.6.3 Mutace p.Glu368Lys a p.Arg465Trp v <i>DNM2</i> .....	58
1.6.4 Mutace p.Arg190Trp v <i>MORC2</i> .....	58
1.6.5 Mutace p.His47Arg v <i>SOD1</i> .....	59
1.7 Závěr .....	60
1.7.1 <i>GARS</i> .....	60
1.7.2 <i>TRPV4</i> .....	60
1.7.3 <i>DNM2</i> .....	61
1.7.4 <i>MORC2</i> .....	62

1.7.5 <i>SOD1</i> .....	63
2 Přehled výsledků vlastních prací .....	64
2.1. Přehled v číslech.....	64
2.2. Ostatní publikace s tematikou dědičných neuropatií.....	65
2.2.3 <i>MFN2</i> gen.....	65
2.3 Ostatní publikace s tematikou epileptických encefalopatií .....	70
2.3.1 <i>SETBP1</i> gen.....	74
2.3.2 <i>CDKL5</i> gen.....	79
3 Seznam vybraných prací přiložených v plném rozsahu (seznam příloh): .....	83
Použitá literatura .....	85
Internetové zdroje .....	105
Seznam vybraných publikací autorky.....	106
Životopis .....	108

## Seznam obrázků

OBRÁZEK 1: TYPICKÁ DEFORMITA NOHY „PES CAVUS“ U PACIENTŮ S CMT	20
OBRÁZEK 2: PŘEKRYV FENOTYPŮ HSP, ALS, HMN A SMA (UPRAVENO PODLE JAMES A TALBOT 2006).	22
OBRÁZEK 3: DOMÉNY <i>GARS</i> GENU (UPRAVENO PODLE MOTLEY ET AL. 2010)	25
OBRÁZEK 4: DOMÉNY <i>MORC2</i> GENU (UPRAVENO PODLE DOUSE ET AL. 2018)	27
OBRÁZEK 5: DOMÉNY <i>DNM2</i> GENU (UPRAVENO PODLE ECHANIZ-LAGUNA ET AL. 2007)	28
OBRÁZEK 6: POSTUP METODY MLPA (PŘEVZATO Z WWW.MLPA.CZ)	42
OBRÁZEK 7: RODOKMEN RODINY S MUTACÍ V <i>GARS</i> GENU.	45
OBRÁZEK 8: RODOKMEN PACIENTKY III:6 S MUTACÍ P.ARG186GLN V <i>TRPV4</i> GENU (RODOKMEN POUŽIT V ČLÁNKU MAZANEC ET AL. 2016)	47
OBRÁZEK 9: PES CAVUS U PACIENTKY (OBRÁZKY POUŽITY V ČLÁNKU MAZANEC ET AL. 2016)	47
OBRÁZEK 10: BODOVÁ MUTACE C. 557G>A (P.ARG186GLN) V EXONU 3 GENU <i>TRPV4</i>	48
OBRÁZEK 11: FENOTYP PACIENTKY S MUTACÍ P.GLU368LYS (FOTO LASKAVĚ POSKYTNUTO MUDR. HABERLOVOU).	49
OBRÁZEK 12: PACIENT S VARIANTOU V <i>MORC2</i> GENU (PŘEVZATO Z ČLÁNKU LAŠŠUTHOVÁ ET AL. 2016)	50
OBRÁZEK 13: RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ PCR PRODUKTŮ POMOCÍ <i>HpaII</i> ENZYMU.	51
OBRÁZEK 14: RODOKMEN RODINY SE <i>SOD1</i> MUTACÍ	53
OBRÁZEK 15: WILD TYPE SEKVENCE A SEKVENCE S MUTACÍ P.HIS47ARG	55
OBRÁZEK 16: DOMÉNY <i>MFN2</i> GENU (UPRAVENO Z ENGELFRIED ET AL. 2006)	65
OBRÁZEK 17: RODOKMEN RODINY S MUTACÍ P.HIS361TYR V <i>MFN2</i> GENU (POUŽITO Z NEUPAUEROVÁ ET AL. 2016)	67
OBRÁZEK 18: MUTACE P.GLY870SER V <i>SETBP1</i> GENU	76



## Seznam tabulek

TABULKA 1: SLOŽKY MASTERMIXU PRO PCR REAKCI	32
TABULKA 2: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>GARS</i>	34
TABULKA 3: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>TRPV4</i>	35
TABULKA 4: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>DNM2</i>	36
TABULKA 5: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>MORC2</i>	38
TABULKA 6: PROTOKOL RESTRIKČNÍHO ŠTĚPENÍ	39
TABULKA 7: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>SOD1</i> GEN	40
TABULKA 8: NEUROLOGICKÉ OBTÍŽE V RODINĚ S MUTACÍ V <i>SOD1</i> GENU54	
TABULKA 9: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>MFN2</i> (PŘEVZATY Z ZÜCHNER ET AL. 2004).	67
TABULKA 10: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>MFN2</i> NOVÉ BEZ SNP	67
TABULKA 11: SEKVENCE PRIMERŮ PRO <i>SETBP1</i> GEN	75
TABULKA 12: FENOTYPY PACIENTŮ S <i>CDKL5</i> MUTACEMI	82

## Seznam použitých zkratk

ACMG Genomics	American College of Medical Genetics and Genomics
BAM	Binary alignment map
CA	Cerebelární ataxie
CDSMA	Congenital distal spinal muscular atrophy (Kongenitální distální spinální muskulární atrofie)
CHN	Congenital hypomyelination neuropathy (Kongenitální hypomyelinizační neuropatie)
CMAP	Compound muscle action potential (Sumační svalový akční potenciál)
CMT	Charcot-Marie-Tooth neuropatie
CNM myopatie)	Centronuclear myopathy (Centronukleární myopatie)
CNV	Copy Number Variants
CV	Conduction velocity (Rychlost vedení)
dHMN	Distal hereditary motor neuropathy (Distální hereditární motorická neuropatie)
DK	Dolní končetiny
DNA kyselina)	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)
dSMA	Distal spinal muscular atrophy (Distální spinální muskulární atrofie)
ECD	Enrichment control DNA

EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
EMG	Electromyography (Elektromyografické vyšetření)
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FALS	Familiar amyotrophic lateral sclerosis (Familiární amyotrofická laterální skleróza)
HGMD	Human Gene Mutation Database
HK	Horní končetiny
HMN	Hereditary motor neuropathy (Hereditární motorické neuropatie)
HMSN	Hereditary motor and sensory neuropathy (Hereditární motoricko-senzorické neuropatie)
HNA	Hereditary neuralgic amyotrophy (Hereditární neuralgická amyotrofie)
HpaII	Haemophilus influenzae
HSAN	Hereditary sensory neuropathy (Hereditární senzorická neuropatie)
MCV	Motor conduction velocity (Motorická rychlost vedení)
MNCV	Motor nerve conduction velocity (Rychlost vedení motorickými vlákny)
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MPS	Massively parallel sequencing (Masivně Paralelní Sekvenování)

NGS	Next Generation Sequencing (Sekvenování nové generace)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce)
SAM	Sequence alignment map
SGS	Schinzel-Giedion syndrome
SNCV	Sensory nerve conduction velocity (Rychlost vedení senzitivními vlákny)
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SPG	Hereditární spastická paraplegie
SPSMA	Scapuloperoneal spinal muscular atrophy (Skapuloperoneální spinální muskulární atrofie)
UCSC browser	University of California Santa Cruz browser
VCF	Variant call format
WES sekvenování)	Whole exome sequencing (Celoexomové
WGS sekvenování)	Whole genome sequencing (Celogenomové

## Souhrn

### Vyšetření genů *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* a *SOD1* u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu

V dizertační práci jsem se zaměřila na diagnostiku axonální formy dědičné neuropatie, protože v té době byla u pacientů s axonální formou CMT výrazně nižší objasnitelnost metodami klasické molekulární genetiky než u pacientů s demyelinizačními typy CMT. Pro další vyšetření u pacientů bez objasněné příčiny axonální formy CMT byly zvoleny geny *DNM2*, *GARS* a *TRPV4*. Cílem bylo zjistit spektrum a frekvenci mutací v těchto genech jako příčiny CMT2 u českých pacientů. Dále jsme v průběhu řešení projektu přidali vyšetření genů *MORC2* a *SOD1*. Kauzální varianty v těchto dvou genech byly prokázány u našich pacientů pomocí celoexomového sekvenování. Proto jsme následně vyšetřili i větší skupinu pacientů na přítomnost variant v těchto dvou genech, s cílem zjistit, jak časté jsou tyto varianty v české populaci.

Klasickým Sangerovým sekvenováním jsem vyšetřila reprezentativní soubor pacientů s CMT2 na přítomnost variant v genech: *DNM2* (37 pacientů), *GARS* (10 pacientů), *TRPV4* (24 pacientů) a *SOD1* (43 pacientů). Metodou RFLP jsem vyšetřila 161 pacientů na přítomnost varianty p.Arg190Trp v genu *MORC2*. Soubor pacientů s CMT2 (50 pacientů) jsme podrobili také analýze metodou MLPA pomocí kitu na detekci duplikací a delecí pro geny *RAB7A*, *GARS*, *HSPB1*, *HSBP8* a *SPTLC1* (kit P406-A1 CMT2). Nenašli jsme žádnou odchylku v počtu kopií (CNV). V té době docházelo k rozvoji masivně paralelního sekvenování (MPS) a po zvážení finanční náročnosti klasického sekvenování versus MPS jsme se rozhodli geny *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* a *SOD1* zařadit do panelu 97 genů v současnosti spojovaných s dědičnými neuropatiemi.

Pomocí MPS jsme vyšetřili 217 pacientů. Vedlo to k následujícím zjištěním a objevům u CMT2.

1. Byla nalezena varianta NM\_002047.2(GARS):c.2074A>G (p.Met692Val) v *GARS* genu, která je nejspíše nepatogenní, resp. není příčinou CMT2 v rodině, nesegreguje s onemocněním v rodině.
2. U pacientky s časným začátkem neuropatie v dětství, skoliózou a dušností, MPS objasnilo příčinu onemocnění a to v důsledku kauzální varianty NM\_021625.4(TRPV4):c.557G>A (**p.Arg186Gln**) v exonu 3 *TRPV4* genu. Mutace již byla popsána jako patogenní (Landoure et al. 2010). Naši kazuistiku jsme publikovali v časopise Neurologie pro praxi (Mazanec et al. 2016).
3. V *DNM2* genu jsme pomocí celoexomového sekvenování zachytili 2 varianty u 2 nepříbuzných pacientů, jednak: NM\_001005360.2(DNM2):c.1102G>A (**p.Glu368Lys**) v heterozygotním stavu a dále NM\_001005360.2(DNM2):c.1393C>T (**p.Arg465Trp**), obě varianty byly již popsány jako příčina centronukleární myopatie (Bitoun et al. 2005) a fenotyp našich pacientů této diagnóze odpovídá.
4. MPS nám umožnilo detekovat i jiné varianty a rozšířit tak spektrum mutací spojovaných s axonální CMT a HMN. Příkladem je *MORC2* gen, kde byla pomocí WES nalezena varianta NM\_014941.2(MORC2):c.568C>T (**p.Arg190Trp**) v heterozygotním stavu u pacienta s obtížnou chůzí, svalovou slabostí a progresí onemocnění, varianta je popisována jako mutační hotspot. Restrikční analýzou navrženou na štěpení wild type alely v souboru 161 pacientů jsme danou variantu našli ještě u jednoho nepříbuzného pacienta.
5. U velké české rodiny s klinickým fenotypem pomalu progredující familiární ALS (FALS) a s výskytem celkem v 5 generacích, jsme pomocí celoexomového

sekvenování našli kauzální mutaci NM\_000454.4(SOD1):**c.140A>G (p.His47Arg)**. Všichni postižení členové rodiny nesou v exonu 4 *SOD1* genu mutaci **c.140A>G (p.His47Arg)** v heterozygotním stavu. Tato mutace byla již popsána jako patogenní a příčina HMN v článku Ostern et al. 2012.

## Summary

### **Examination of the genes *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* and *SOD1* among Czech patients with hereditary neuropathy axonal type**

For my PhD thesis I chose to work with patients with axonal form of CMT, because at that time axonal forms were less likely to be clarified by classical methods of molecular genetics. For further examination in patients with unclear cause of the axonal CMT, the genes *DNM2*, *GARS* and *TRPV4* were selected. The aim was to determine the significance of pathogenic mutations in these genes as the cause of CMT2 in Czech patients.

In the course, we identified causal variants in the genes *MORC2* and *SOD1* with WES. Therefore, we have tested additional CMT2 patients for the presence of these variants.

Using Sanger sequencing, I examined a representative set of patients for the *DNM2* (37), *GARS* (10) and *TRPV4* (24) genes without finding a causal mutation, then we investigated genes *SOD1* (43 patients) and *MORC2* (161 patients). The cohort (50 patients) was also subjected to MLPA analysis using a P406-A1 CMT2 duplication and deletion detection kit for genes *RAB7A*, *GARS*, *HSPB1*, *HSBP8* and *SPTLC1* (kit P406-A1 CMT2). At that time, massively parallel sequencing (MPS) was becoming important. We compared the cost of classical sequencing versus MPS, and accordingly, we decided that the genes *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* and *SOD1* would now be included in the panel of 97 genes associated with hereditary neuropathies. We examined 217 patients with MPS. This led to several interesting findings. In the CMT2 cohort the most important were:



1. Finding the NM\_002047.2(GARS):c.2074A>G (p.Met692Val) mutation in the *GARS* gene, which is probably non-pathogenic, respectively is not the cause of CMT2 in the family, not segregate with the disease in the family.
2. In a patient with early onset neuropathy in childhood, scoliosis and dyspnoea, MPS helped to identify the cause of the disease as a result of the causal mutation NM\_021625.4(TRPV4):c.557G>A (**p.Arg186Gln**) in exon 3 of the *TRPV4* gene. Mutation has already been described as pathogenic (Landouere et al. 2010). We have published our case report in Neurologie pro praxi (Mazanec et al. 2016).
3. In the *DNM2* gene, MPS sequencing revealed variant NM\_001005360.2(DNM2):c.1102G>A (**p.Glu368Lys**) in heterozygous state and NM\_001005360.2(DNM2):c.1393C>T (**p.Arg465Trp**) which is associated with centronuclear myopathy (Bitoun et al. 2005) and the phenotype of our patients is explainable by the mutation.
4. MPS has allowed us to detect other variants to extend the spectrum of mutations associated with axonal CMT and HMN. For example variant in the *MORC2* gene NM\_014941.2(MORC2):c.568C>T (**p.Arg190Trp**) in exon 10 was found in a heterozygous state in a patient with difficulty with walking, muscle weakness and disease progression, the variant being described as a mutation hotspot. Restriction analysis, designed to digest the mutant allele, in a group of 161 patients has found the variant in one other patient.
5. In a large Czech family with a clinical phenotype of slowly progressive familial ALS (FALS) and occurring in a total of 5 generations, WES analysis found that members of the family carry in exon 4 of the *SOD1* gene a mutation of

NM\_000454.4(SOD1):c.140A>G (**p.His47Arg**) in heterozygous state. It has already been described as pathogenic in Ostern et al. 2012.

# 1 Vyšetření genů *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* a *SOD1* u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu

## 1.1 Úvod

### 1.1.1 Charcot-Marie-Tooth neuropatie

Hereditární neuropatie jsou klinicky a geneticky velmi heterogenní skupinou. Charcot-Marie-Tooth (CMT) onemocnění, jiným názvem také hereditární motorická a senzitivní neuropatie (HMSN), se vyskytuje s prevalencí 1:1214-1:2500 (Braathen 2012; Dyck and Lambert 1968; Skre 1974) a je nejčastějším hereditárním neuromuskulárním onemocněním. Pojmenování je podle dvou francouzských neurologů Jean-Martin Charcota, Pierre Marie (Charcot et al. 1886) a Angličana Henry Tootha (Tooth 1886). Neuropatie jsou známy všemi typy mendelovské dědičnosti (Rossor et al. 2012). U pacientů jsou postiženy periferní nervy, kterými jsou svaly zásobovány. Postiženy mohou být i senzitivní nervy, které zprostředkují vnímání dotyku, bolesti, vibrací a tepla. CMT nezkracuje normální délku života, ale ovlivňuje jeho kvalitu.

### 1.1.2 Klinické příznaky

Charakteristickými příznaky pro CMT jsou slabost distálních svalů dolních končetin a následně distální atrofie svalů obvykle spojená s distální senzoricou ztrátou, i deformity nohou, pes cavus s kladívkovitými prsty (Obrázek 1), a oslabení nebo absence šlachookosticových reflexů (Harding and Thomas 1980a). Začátek onemocnění bývá na přelomu 1. a 2. dekády (Haberlová and Seeman 2010). Pacienti mají problémy s chůzí, během, výstupem do schodů a s jemnou motorikou prstů.

Propadnutá klenba nohy způsobuje zakopávání, zvedají proto vysoko kolena - tzv. čápvitá chůze.



**Obrázek 1: Typická deformita nohy „pes cavus“ u pacientů s CMT**

### 1.1.3 Klasifikace

**1.1.3.1 Klasifikace podle klinických kritérií** - klasifikace hereditárních neuropatií podle klinického nálezu dle Dycka a Lamberta (Dyck and Lambert 1968):

#### 1.1.3.1.1 Hereditární motorické a senzitivní neuropatie (HMSN = CMT)

Nejčastější typ dědičných neuropatií (asi 90 %), postiženy jsou jak motorické, tak senzitivní nervy. U pacientů je typická progresivní svalová atrofie (Vance 1991). HMSN byly v roce 1968 klasifikovány dle Dycka a Lamberta (Dyck and Lambert 1968) na 7 skupin (HMSNI-VII). V současnosti je pojem a klasifikace HMSN na 7 skupin používán již méně.

#### 1.1.3.1.2 Hereditární motorické neuropatie (HMN)

HMN jsou hereditární neuropatie, u kterých se jedná o dominantní postižení motorických neuronů. Postihují asi 10 % pacientů s hereditární neuropatií (Zhao et al.

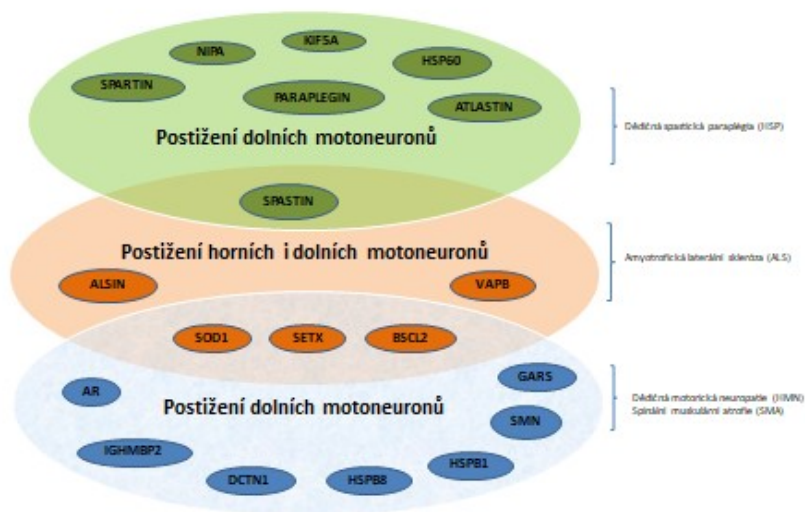
2014) a postihují primárně periferní motoneuron. Mají různý věk nástupu, různý typ dědičnosti a kauzální mutace v různých genech. Charakteristická je distální svalová slabost a později atrofie na dolních končetinách s nástupem nejpozději ve 3. dekádě, postižení periferního motoneuronu, chronicko-progresivní vývoj nemoci (Bansagi et al. 2017). Reflexy L5/S2 jsou obvykle vyhaslé, ale reflexy L2/4 mohou být v iniciální fázi výbavné, nicméně postupně vyhasínají (Mazanec et al. 2016). Mají progresivní průběh, nemocní kolem 50. roku věku jsou většinou upoutaní na lůžko, jehlová EMG prokazuje ojedinělé fibrilace nebo pozitivní ostré vlny a redukovanou náborovou křivku potenciálů motorických jednotek (Mazanec et al. 2016). Některé HMN se odlišují od klasického fenotypu.

#### 1.1.3.1.2.1 *SOD1 (Superoxide dismutase 1) gen*

Protein kódovaný genem *SOD1* se váže ke  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  iontům a je jedním ze dvou izoenzymů zodpovědných za zničení volných superoxidových radikálů v těle (Rosen 1993).

Mutace v *SOD1* genu lokalizovaném na chromozomu 21q22.11 jsou nejčastější (asi 10 %) příčinou FALS charakterizované pozdním začátkem, poměrně rychlou progresí příznaků a elektromyografickým vyšetřením (EMG), které potvrdí poruchu periferního motoneuronu v předních rozích míšních (Gros-Louis et al. 2006; Hadano et al. 2001; Kurland and Mulder 1955).

V některých případech může dojít k překrývání se klinických fenotypů familiární amyotrofické laterální sklerózy (FALS), pro které je charakteristické postižení současně centrálního a periferního motoneuronu s dědičnou motorickou neuropatií (HMN) nebo axonální formou Charcot-Marie-Tooth (James and Talbot 2006)(Obrázek 2).



**Obrázek 2: Překryv fenotypů HSP, ALS, HMN a SMA (upraveno podle James a Talbot 2006).**

Je známo, že mutace v *SOD1* genu jsou velmi vzácnou příčinou HMN onemocnění (Hoyer et al. 2014; Ostern et al. 2012). Identický klinický fenotyp byl popsán u několika rodin v Japonsku a rozvětvené norské rodiny, ale nikoliv v rámci ČR.

#### 1.1.3.1.3 Hereditární senzitivní a autonomní neuropatie (HSN/HSAN)

U hereditární senzitivní neuropatie zvané též hereditární senzitivně autonomní neuropatie jsou výrazněji postiženy senzitivní neurony (Nicholson et al. 1996). Pacienti mají většinou těžkou poruchu citlivosti pro bolest, teplo, dotyk, často nehojící se poranění na nohou, která mohou vést až k amputacím (Dyck 1993).

### **1.1.3.2 Klasifikace podle elektrofyziologických kritérií**

#### 1.1.3.2.1 Demyelinizační neuropatie (HMSN I / CMT1)

Tato forma je charakterizována redukovanou motorickou kondukční rychlostí na horních končetinách (MCVs) n.medianus nebo n.ulnaris (<38 m/s)(Laura et al. 2007). Primárně postihuje Schwannovy buňky, sekundárně i axon (Meyer zu Horste and Nave 2006). Nejčastější formou demyelinizačních neuropatií asi u 70 % pacientů jsou mutace a alterované dávky genu *PMP22* - typ označovaný jako *CMT 1A* (Berger, Young and Suter 2002).

#### 1.1.3.2.2 Axonální neuropatie (HMSN II /CMT2)

CMT2 postihuje primárně axony a při EMG vyšetření je normální motorická kondukční rychlost (>38 m/s), ale redukováná amplituda akčního potenciálu (Harding and Thomas 1980a; Reilly et al. 2011). Nejčastějším typem CMT 2 je CMT2A v důsledku mutací *MFN2* genu (Zuchner et al. 2004). Patogenní mutace jsou obvykle dominantní, ale byly popsány i recesivní mutace a rodiny. Byly definovány 2 klinické podskupiny pacientů CMT2A: větší skupina pacientů s časným nástupem a vážným průběhem onemocnění a menší skupina pacientů s pozdějším nástupem a mírnějším průběhem (Brockmann et al. 2008; Zuchner et al. 2004). CMT2A patří mezi nejrozšířenější typy axonální dominantní dědičné neuropatie v České republice a podobná situace je i v ostatních populacích (Brozkova et al. 2013; Cartoni and Martinou 2009; Zuchner et al. 2006). CMT2 je poruchou periferních nervů, u kterých je motorický systém více postižen než sensorický (Pareyson and Marchesi 2009). Typické jsou problémy s chůzí-čapí chůze a atrofie (Feely et al. 2011a; Stuppia et al. 2015).

Zatímco více než 90 % pacientů s demyelinizační formou CMT dosáhne přesnou molekulární diagnostiku onemocnění, u axonální formy je objasnitelnost výrazně nižší (25 %)(Fridman et al. 2015; Murphy et al. 2012; Saporta et al. 2011; Sivera et al. 2013).

Dizertační práce byla více zaměřena na skupinu axonálních, motorických hereditárních neuropatií a intermediárních neuropatií, a to konkrétně na geny *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *SOD1* a *TRPV4*. První pacienty jsme vyšetřili klasickým Sangerovým sekvenováním. Následně v období rozvoje masivně paralelního sekvenování jsme diagnostiku rozšířili o panel genů, do kterého byly geny *GARS*, *DNM2*, *MORC2*, *SOD1* a *TRPV4* již začleněny.

#### **1.1.3.2.2.1 *GARS* (glycyl-tRNA syntetáza) gen**

Poprvé spojitost mutací v *GARS* genu s fenotypem CMT2D (MIM 600287) a distální hereditární motorické neuropatie typu V (MIM 600794) popsal Antonellis (Antonellis et al. 2003). Je to autosomálně dominantně dědičná forma dHMNV. První příznaky začínají svalovými atrofiemi na horních končetinách distálně většinou ve 2. dekádě života. Typické jsou tedy slabost a atrofie svalů rukou, specificky thenaru a interoseálních svalů (Kumaraswamy et al. 2005). U některých pacientů je také přítomna skolióza. dSMA se odlišuje přítomností sensorických deficitů.

*GARS* je členem rodiny aminoacyl tRNA syntetáz (Ge et al. 1994). Glycyl-tRNA syntetáza sehrává významnou roli při proteinové syntéze. Katalyzuje připojení (esterifikaci amino skupiny) glycinu na 3'konec příslušné tRNA (Cader et al. 2007).

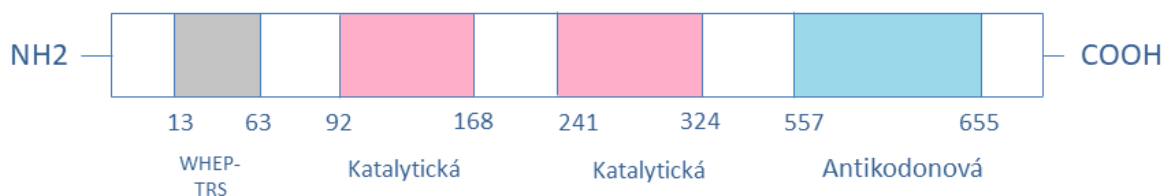
Děje se to ve 2 krocích:

1. Navázání a aktivace aminokyseliny za pomoci ATP



2. Konjugace aktivované aminokyseliny na 3'konec příslušné tRNA (Antonellis and Green 2008).

GARS je ubikvitně exprimovaný protein, který hraje roli v prvním kroku proteinové translace ve všech buňkách včetně mozku a míchy (Delarue 1995). Má 4 domény (Obrázek 2), je kódován 17 exony na chromosomu 7p14.3, používáme referenční sekvenci NM\_002047. Proč mutace v *GARS* způsobují fenotyp dHMN není úplně jasné, je možné, že dochází k poruše axonálního transportu a mitochondriální dysfunkci.



**Obrázek 3: Domény *GARS* genu (upraveno podle Motley et al. 2010)**

Legenda: WHEP – TRS = enzym konjugační doména, katalytická doména a Gly-tRNA antikodon vážící doména; Čísla 13-655 udávají aminokyselinové pozice.

U pacientů s mutacemi v antikodon-vážící doméně převládá postižení dolních končetin v dětství nebo začátkem druhé životní dekády (James et al. 2006).

#### **1.1.3.2.2.2 *TRPV4* (*Transient receptor potential vanilloid 4*) gen**

Gen *TRPV4* kóduje  $\text{Ca}^{2+}$  propustný kationový kanál. Je lokalizován na chromosomu 12q24.11, používáme referenční sekvenci NM\_021625.4, která má 15 kódujících exonů (Everaerts et al. 2010). Je exprimován v různých typech buněk a tkání.

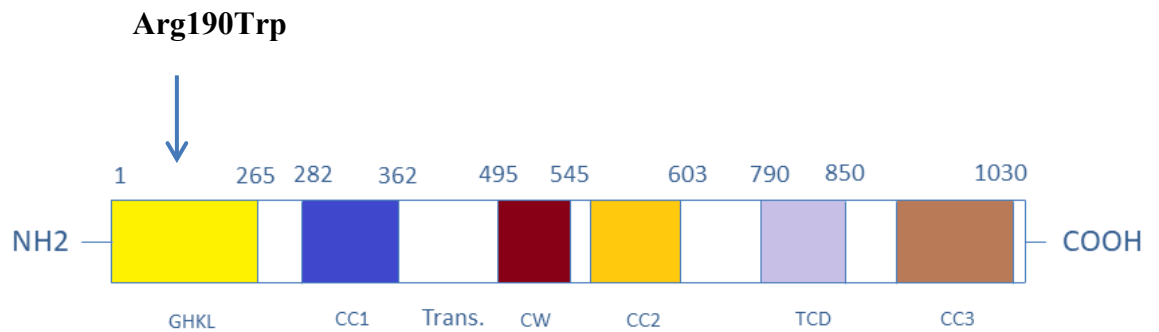
Mutace v genu *TRPV4* jsou spojovány se širokým spektrem nemocí: skapuloperoneální spinální muskulární atrofii (SPSMA), kongenitální distální spinální muskulární atrofii (CDSMA), Charcot-Marie-Tooth typu 2C (CMT2C) a distální hereditární motorickou neuropatií (dHMN) (Auer-Grumbach et al. 2010; Deng et al. 2010; Landouere et al. 2010; McEntagart 2012).

Pro dědičnou neuropatii způsobenou mutacemi v *TRPV4* genu jsou charakteristické pes cavus, oslabení končetin, hlasivkových svalů – chraptot a skolióza. Mutace se vyskytují převážně v ankyrin doméně (Inada et al. 2012; Landouere et al. 2012). Naproti tomu mutace, které způsobují skeletální dysplázii, jsou lokalizovány podél celého proteinu s výjimkou ankyrinové domény (Nilius and Voets 2013).

#### **1.1.3.2.2.3 *MORC2 (MORC FAMILY CW-TYPE ZINC FINGER 2) gen***

Spojitosť variant v genu *MORC2* s neuropatií byla popsána teprve nedávno – v roce 2016. První varianty v *MORC2* genu ve spojení s axonální motorickou a senzickou neuropatií byly identifikovány celoexomovým sekvenováním (Sevilla et al. 2016). U pacientů je přítomná také slabost horních končetin a hypotonie.

Nachází se na chromozomu 22q12.2, má 21 exonů, používáme referenční sekvenci NM\_014941.2. *MORC2* protein je složen ze 4 domén: GHL-ATPase doména na amino-konci, CW-type zinc finger doména, doména pro nukleární lokalizační signál, a coiled-coil doména na karboxy konci (Obrázek 4).



**Obrázek 4: Domény *MORC2* genu (upraveno podle Douse et al. 2018)**

Legenda: GHKL = GHKL ATP-vážíci se doména, CC1 = coiled coil doména, Trans. = transducer-like doména, CW = CW-type zinc finger doména, TCD = tudor-chromodoména, CC3 = coiled coil doména

Čísla 1-1030 udávají aminokyselinové pozice

#### 1.1.3.2.3 Intermediární CMT

Prostřední skupinu tvoří intermediární CMT neuropatie, kde rychlost vedení periferním nervem je v rozsahu 25-45 m/s, elektromyografie často ukazuje zároveň akutní i chronickou denervaci (Vallat et al. 2005). Mohou být asociovány s mechanismem onemocnění postihující Schwannovy buňky i axony.

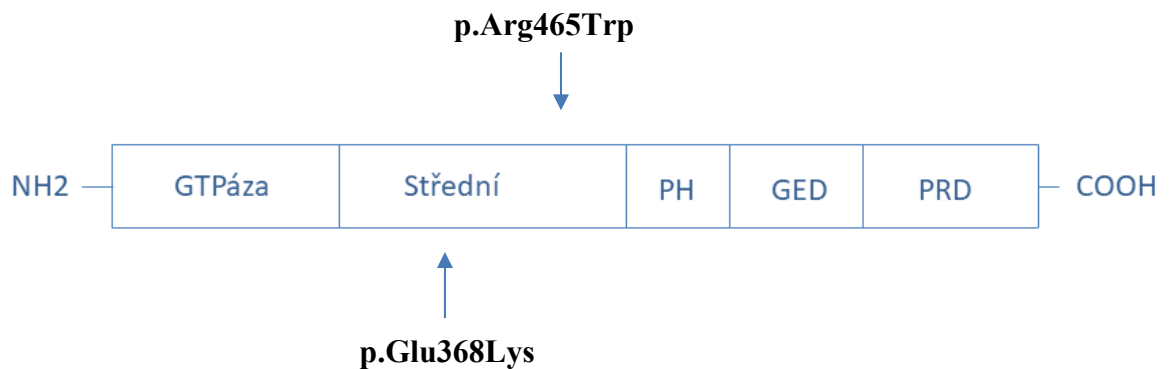
##### 1.1.3.2.3.1 *DNM2* (*dynamin 2*) gen

*DNM2* je lokalizovaný na krátkém ramínku chromozomu 19 (19p13.2), je složený z 22 exonů. Používáme referenční sekvenci NM\_001005360.2 (Zuchner et al. 2005).

*DNM2* je ubikvitně exprimovaný protein zahrnut v důležitých buněčných procesech – endocytóze, sestavení aktínu a centrozómové kohezi (Schafer et al. 2002; Thompson et al. 2004). Je exprimovaný v periferním nervovém systému a také v míše. *DNM2* hraje klíčovou roli při endocytóze – napojí se na buněčnou membránu a formuje klatrinový

váček (Kozlov 1999), který se pak od membrány odpojí. Také neméně důležitou funkci má při organizaci centrozomu (Bitoun et al. 2005).

*DNM2* má guanozín trifosfátovou doménu (GTPáza), střední doménu, pleckstrin homologní (PH) doménu, GTPázovou efektorovou a prolín-bohatou doménu (Zuchner et al. 2005)(Obrázek 5). Mutace v PH doméně kosegregují s intermediární formou CMT a jsou většinou typu „loss-of-function“, kdežto mutace ve střední doméně jsou příčinou autozomálně dominantní centronukleární myopatie (CNM) (Bitoun et al. 2005; Echaniz-Laguna et al. 2007).



**Obrázek 5: Domény *DNM2* genu (upraveno podle Echaniz-Laguna et al. 2007)**

Legenda: GTPáza-guanozín trifosfátová doména, střední, PH-pleckstrin homologní doména, GED-GTPázová efektorová, PRD-prolín-bohatá doména

Na obrázku jsou vyznačeny pozice námi nalezených variant pacientů z naší studie.

Centronukleární myopatie jsou geneticky heterogenní kongenitální myopatie prezentující se v dětství a pubertě, jsou charakterizovány řetězcem centrálně lokalizovaných jader ve velkém množství svalových vláken (Pierson et al. 2005). U většiny pacientů je obličejová slabost, bilaterální ptóza, distální svalová atrofie a pes cavus (Susman et al. 2010). Mutace genu *DNM2* jsou příčinou asi 50 % autozomálně dominantních anebo sporadických forem CNM (Bitoun et al. 2005). Mutace působí

mechanismem „gain-of-function“, protože jsou zodpovědné za zvýšení aktivity dynaminu 2, ovlivňují endocytózu a vedou k desorganizaci struktur podobných mikrotubulům – T tubulů (jsou nezbytné pro normální svalovou tenzi a relaxaci). V důsledku mutací se pak struktura svalových buněk stává abnormální a nemůže kontrahovat a relaxovat normálně, což vede ke svalové slabosti (Bitoun et al. 2005).

U pacientů s některými *DNM2* mutacemi popsány v literatuře se vyvíjejí i neutropenie a/nebo katarakty (Kristl et al. 2009).

#### 1.1.3.2.4 HMSN V a HMSN IV

U dalších dvou typů je periferní neuropatie v kombinaci s poškozením centrálního motoneuronu. Jedná se o HMSN typ V (CMT s pyramidálními znaky)(Harding and Thomas 1980b) a HMSN typ VI (periferní neuropatie s atrofií optiku)(Voo et al. 2003; Vucic et al. 2003).

#### **1.1.3.3 V současnosti se uvažuje nad možností klasifikace dědičných neuropatií podle Magy (Magy et al. 2018) na základě 3 navržených kroků (3 modulů):**

1. podle způsobu dědičnosti – AD (autosomálně dominantní), AR (autosomálně recesivní), Spo (sporadický), XL (X-vázaný), Mit (mitochondriální)
2. podle fenotypu: CMT, dHMN, HSAN, SPG (spastické paraplegie), CA (cerebelární ataxie). Každá z těchto skupin by mohla být rozdělena na: De (demyelinizační), Ax (axonální) a In (intermediární) typ.
3. podle přesné indikace názvu genu

Tato klasifikace byla navržena, nějakou dobu potrvá, než bude přijata vědeckou komunitou, nicméně více odpovídá současnému stavu poznání.

## 1.2 Cíle

Cílem dizertační práce bylo:

- 1.) S využitím sekvenování a metody MLPA analyzovat geny *DNM2*, *GARS* a *TRPV4* v reprezentativním souboru alespoň 50 pacientů s axonálním typem dědičné neuropatie.
- 2.) Zjistit spektrum variant v těchto genech u českých pacientů s CMT2.
- 3.) Z výsledků určit spektrum fenotypů pacientů s kauzálními mutacemi v daných genech.
- 4.) Ze zjištěných údajů zhodnotit přínos analýzy vyšetřených genů v rámci budoucí rutinní analýzy a vypracovat optimální diagnostické schéma.
- 5.) Na základě nových poznatků o kauzalitě variant v genu *MORC2*, vyšetřit reprezentativní soubor pacientů (minimálně 100) na přítomnost nejčastější mutace p.Arg190Trp v genu *MORC2*.
- 6.) V případě průkazu varianty p.Arg190Trp u dalších pacientů, upřesnit fenotyp pacientů s CMT2 na podkladě mutací v genu *MORC2*.
- 7.) Na základě průkazu kauzální varianty v genu *SOD1* u velké české rodiny s fenotypem CMT2 vybrat další CMT2 pacienty a zjistit, zda mutace v genu *SOD1* jsou častou příčinou axonální neuropatie u českých pacientů.

## **1.3 Pacienti**

Z databáze pacientů v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FNM, která má shromážděn soubor pacientů od roku 1997, jsme pro analýzu genů *DNM2*, *GARS* a *TRPV4* původně vybrali skupinu 50 pacientů. Kritériem byl axonální typ dědičné neuropatie a dominantní typ přenosu v rodině nebo sporadické případy, u kterých doposud nebyla objasněna příčina CMT.

## **1.4 Metodika**

### **1.4.1 Izolace vzorků z biologického materiálu**

#### **1.4.1.1 Izolace z periferní krve**

V naší laboratoři jsem na izolaci DNA z periferní krve využívala přístroj iPrep™ PureLink® gDNA Blood Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Umožňuje automatickou purifikaci vysoko kvalitní DNA. Na izolaci je potřeba 350 µl periferní krve odebrané do antikoagulačního činidla EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová).

#### **1.4.1.2 Izolace ze slin**

DNA ze slin pochází z ústních epitelálních buněk a bílých krevních buněk nalezených v ústní dutině. Odběr se provádí do speciálních kontejnerů Oragene®-DNA OG-500/510 kitu (DNA Genotek, USA). Sliny odebrané do těchto kontejnerů jsou stabilní při teplotě místnosti několik měsíců.

### **1.4.2 Klasické Sangerovo sekvenování**

a) Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je založena na opakovaných cyklech tepelné denaturace úseku DNA, annealingu oligonukleotidových primerů (fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech) a extenzi (Mullis et al. 1986).

Pro PCR reakci jsem využívala univerzální pracovní postup přidávání jednotlivých reagensů podle Tabulky 1., **PPP mix** a **Combi PPP mix** jsou dodávány od firmy Top Bio, s.r.o. (Praha, ČR).

**Tabulka 1: Složky Mastermixu pro PCR reakci**

<b>Master mix</b>	<b>Objem na 1 vzorek (μl)</b>
genomová DNA (100 ng)	0,5-1
Forward (F) primer (10 uM)	0,5
Reverse (R) primer (10 uM)	0,5
2 x PPP mix / Combi mix	7,5
PCR voda	doplnit objem 5,5-6
<b>Celkový objem</b>	<b>15</b>

#### b) Klasické Sangerovo sekvenování

Po proběhnutí PCR vybraného úseku DNA je DNA sekvenována, jednotlivé fáze jsou: denaturace, nasednutí primeru a extenze. Na jednořetězcovou DNA nasedá sekvenační



primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa. Dále probíhá syntéza DNA navázáním dNTP a jednoho z dideoxynukleotidů (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP-každý nese svou fluorescenční značku). Dideoxynukleotidy jsou v porovnání s jednotlivými nukleotidy v reakci zastoupeny jen v relativně malém množství. Dideoxynukleotidy se náhodně začlení do řetězce místo dNTP. V důsledku toho, že ddNTP nemají OH skupinu, po jejich přidání do syntetizovaného řetězce se syntéza zastaví (Slatko et al. 2001).

### c) Analýza

Přečištěný produkt po sekvenační reakci jsem analyzovala na automatickém kapilárním genetickém analyzátoru ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Sekvence jsem vyhodnotila pomocí softwaru Sequencing Analysis (Applied Biosystems, USA) a Mutation Surveyor (Soft Genetics, USA).

#### **1.4.2.1 *GARS***

Všech 17 kódujících exonů a přilehlých intronových sekvencí *GARS* genu jsem sekvenovala ve 14 PCR reakcích metodou dle Sangera jako test první volby za použití primerů z Tabulky 2.

**Tabulka 2: Sekvence primerů pro *GARS***

Exon	Forward	Reverse
1	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTA CGC GGC GAT TTC ATC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAG GAG GGA AGG ATG ACC AG
2	TGTAAAACGACGGCCAGTCGCTTAAAAACACATTC	CAGGAAACAGCTATGACCTCCCATCCAAGAAATTAAGA
3	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTATGGCTTCTATTGTTTTAACC	CAGGAAACAGCTATGACCGCAAGCCATGTTCTT
4	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GAG GGA TTT GCA TTG TTG AC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC AAC AGG AAG GAC AAA CAC AAT C
5,6	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGA AGG AAG AAT GTG GGA GAG G	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TGG GCT GAA ATA AAG GGT TAG TCA C
7	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAC AGT GAC TAT ATG AGT TTT AGG TCC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCA GCA ATA AGT TCA ACG GC
8	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGA TTT GTA TCT AGA ATT TCA GGA TT	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ACA GCA AGC TTT CAT T
9,10	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA GTT GAA AAT AGA GGC CTT G	CAG GAA ACA GCT ATG ACC AAA AGG CAG GAG GCA ACT G
11	TGTAAAACGACGGCCAGTCCATCACACCCAGATCAGTG	CAGGAAACAGCTATGACCCAACATTGAGTGGGCACAC
12	TGTAAAACGACGGCCAGTATCAGCATAAACAGGATCTGGA	CAGGAAACAGCTATGACCTGGCTGGACAAGTCTCTTTG
13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCA GCA GGC CTA TTT CTG AC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTT TGC CAA AGA AGA CAG GG
14	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CGC AGC TGG TGA ATT GTT TAG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATA ACA CAG GAA ACT GGT TTG TC
15,16	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT TTT GGT TTG GGA TAT TAG C	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CAA AAT CCA ACA CAA ATC AGT AAG
17	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGC ATG ACA TTG TTT GGC TC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GAA GAT AAA ATA CGG TCC CTG G

Program amplifikace:

96 °C.....5 min

96 °C.....30 sec

52-68 °C.....30 sec

72 °C.....40 sec

35 cyklů

72 °C.....10 min

10 °C.....∞

### 1.4.2.2 TRPV4

Všech 15 kódujících exonů a přilehlých intronových sekvencí *TRPV4* genu jsem sekvenovala ve 12 PCR reakcích metodou dle Sangera jako test první volby za pomoci primerů z Tabulky 3.

**Tabulka 3: Sekvence primerů pro *TRPV4***

Exon	Forward	Reverse
<b>2 (1.kódující)</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAC TGC TGC TTG TCC ACG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC AGA TAG AGG GGT GGA TGA TG
<b>3</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTA AGG CCA GGG ACA GTG GG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCC AAA GAA AGA AGC TGA GGG G
<b>4</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGTGTTCTGTACCCCGATGC	CAGGAAACAGCTATGACCCAAGGACAGCGTCTCCATCAG
<b>5</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTAGCCTGGCTAGGTCTCTGC	CAGGAAACAGCTATGACCCGTATCATGCTATCTCCCGCC
<b>6</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTTGCAGGCAGAGTCCAC	CAGGAAACAGCTATGACCCCTCGTGTGTGTGCAGAGG
<b>7</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC TGT TTT CTG GGG AGG CG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGT CCT AGA GGC TGG GGC TG
<b>8,9,10</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTG TCC GGG TGG AGG GTG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCT GGA CGA CCT AGC AGC CC
<b>11,12</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCA AGG CTG CTA TTG TCC CC
<b>13</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCC TCA GCT TTC TCC TCC AGC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC AAG CCA GTC GGG TGG GTC TC
<b>14</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTA GTT CTG GGC CCA CCC TG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTC TTG GGG CCT CAG TGG
<b>15</b>	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AAA TAG GAG GGT GTG CTG GGG	CAGGAAACAGCTATGACCGAAGCAGGACTGCTCAAAGC
<b>16</b>	TGTAAAACGACGGCCAGTGTGGAGTGCCAGTACACAGTAGG	CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCA GAA GGC ACT GCT GAA ATG

Program amplifikace:

96 °C.....5 min

96 °C.....30 sec

66 °C.....30 sec

72 °C.....40 sec

72 °C.....10 min

10 °C.....∞

35 cyklů

### 1.4.2.3 *DNM2*

Všech 21 kódujících exonů a přilehlých intronových sekvencí *DNM2* genu jsem sekvenovala ve 20 PCR reakcích metodou dle Sangera jako test první volby za použití primerů z Tabulky 4.

**Tabulka 4: Sekvence primerů pro *DNM2***

Exon	Forward	Reverse
1	GGG AGC AAC GGC TAC AGA C	GCA AGC GCC GCA GTT AC
2	CAT GTG GTC ACA CTT CCT GC	CAA CTC CTG GCA ACC ACA C
3	AAC AAA GCA TTT CTC CCC G	TGT GAA TGG GCA CAT GAT AC
4	CTG TTT GTG CCT CCC CTC TC	ACT TGG AAC CAA GGA TGC TG
5	GCT GCC AGC TGA TGC TC	AGG CAG GCA GGG AAC AG
6	CAG GTC CAC TTG GCT CAC C	TGA AAC AAG TGC CAG TGA GG
7	GTC TGC CAC TCC CTG GTA TC	CCT GTG GCT GAT GGA AGG
8	TAAACCCTGGCTTGACTTGG	CTTATTGCCTGGGAGGAGG
9	ACA CGT GGG AGA GAA CG	ATT AGG GAC TCA GAG GTG TG
10	AAATTGCTGACCATGCTTTG	TGGGAGCCTGATACCAAAC
11	GTGTGGTTCATGTTGCTTCC	GCACAGAACAGTACACTTGACATTTAC

12	TGT TCT CCT GTC TGG GAA GC	GTT GGC TCT GCC TTC ACC
13	TCT CTG CCT CTA CCT GTG GC	GCC TGG TAC TGA GGC TGT G
14	TTTTGCGCTTGCCGTAG	AGGAAACCAGGAAAACCTGC
15	CTG GCT TCC CAC TGA GCT G	GCA GTG ACT GAG TTC TGC CC
16	ATATACAGCAGCGACCAGCA	TCTCACGTGACTCCCCTTTC
17	CCC TAG AGC CCA TTC CTC TC	CTG CTT CCT CTC CCA GGT G
18	CAGTGGGGCTGTCAGGG	GTGCCTGGCCTCCTTCTC
19-20	CAG TCA CTG TGG GTT CTG GG	CTG GGA GGA AGT GAG ACA GG
21	AGG CCT GCC TCT TGC TC	CCC CAG ACC ACT GAA GCT C

Program amplifikace:

96 °C.....5 min  
 96 °C.....30 sec  
 60-68 °C.....30 sec  
72 °C.....40 sec  
 72 °C.....10 min  
 10 °C.....∞

}  
 }  
 }

35 cyklů

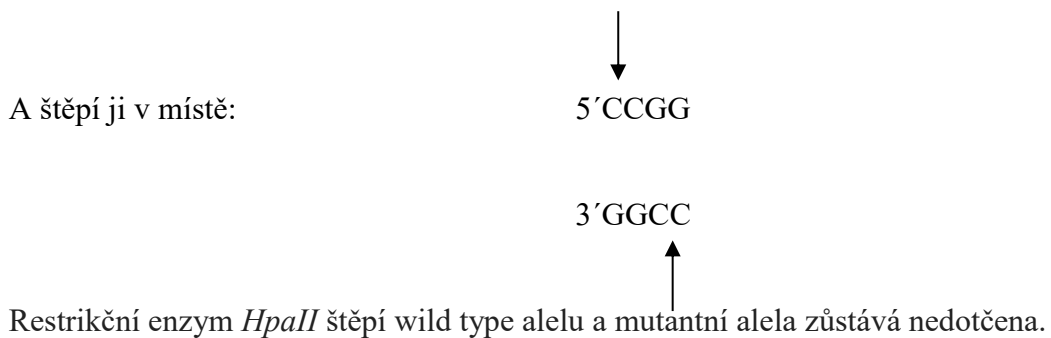
#### 1.4.2.4 MORC2

Navrhli jsme si primery (Tabulka 5) pro mutační hotspot exonu 10 *MORC2* genu, kde se nachází mutace p.Arg190Trp a podle protokolu (Tabulka 6) podrobili pacienty restričnímu štěpení.

Pro analýzu jsme použili *HpaII* restriční enzym získaný z mikroorganismu

*Haemophilus parainfluenzae*, který rozeznává sekvenci: 5'CCGG

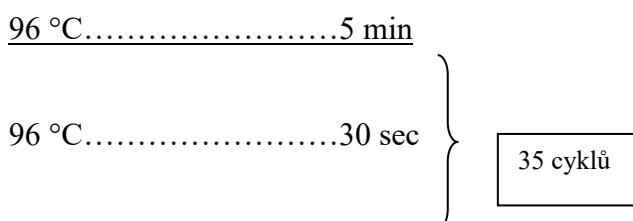
3'GGCC



Tabulka 5: Sekvence primerů pro *MORC2*

Exon	Forward	Reverse
10	CTTGGTCAGGCCTGTTGTG	CCTCTAACAATGCCCCAGAG

Program amplifikace:



60 °C.....30 sec

72 °C.....40 sec

72 °C.....10 min

10 °C.....∞

**Tabulka 6: Protokol restrikčního štěpení**

<b>Master mix</b>	<b>1 vzorek (µl)</b>
FastDigest <i>HpaII</i>	1
Green Buffer 10x	1
PCR produkt	2
H <sub>2</sub> O	6
Celkový objem	10

Program restrikčního štěpení:

37 °C.....1 hod

80 °C .....20 min

4 °C.....∞

### 1.4.2.5 *SOD1*

Všech 5 kódujících exonů a přilehlých intronových sekvencí *SOD1* genu jsem sekvenovala v 5 PCR reakcích metodou dle Sangera za pomoci primerů z Tabulky 7.

**Tabulka 7: Sekvence primerů pro *SOD1* gen**

Exon	Forward primer	Reverse primer
1	Ggttggtttctccacatttcg	Acccgctcctagcaaaggt
2	Tggaggttcactggctagaaa	Aaggctaaggtcagccatgat
3	Gatgcaggtcagcactttctc	Cagcaagttcaaagcaaagg
4	Acgtgaagccttggttgaaga	Gaaaccgcgactaacaatcaa
5	Gggtattgttgggaggaggta	Ttcacaggcttgaatgacaaa

Program amplifikace:

96 °C.....5 min  
 96 °C.....30 sec  
 60 °C.....30 sec  
 72 °C.....40 sec  
 72 °C.....10 min  
 10 °C.....∞

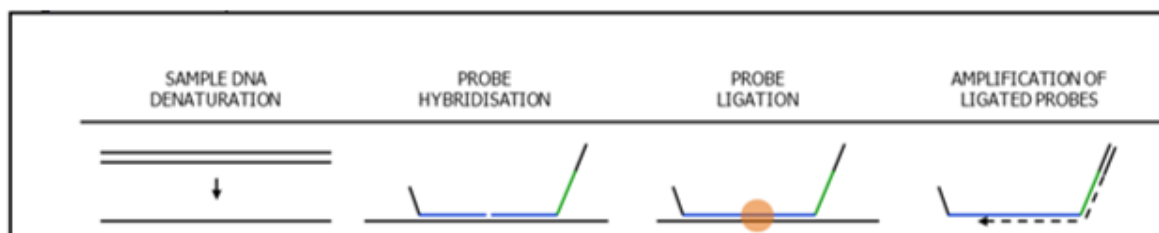
} 35 cyklů



### 1.4.3 Metodika MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

MLPA jako metoda na relativní kvantifikaci různých DNA sekvencí, vyžadující jenom 20 ng DNA, byla poprvé popsána v článku Schouten et al. 2002. Každá MLPA próba obsahuje 2 krátké syntetické oligonukleotidové sekvence, po hybridizaci na cílové místo jsou oligonukleotidy spojeny ligací (Obrázek 6). Následně jsou amplifikovány pomocí klasické polymerázové řetězové reakce za použití jednoho univerzálního páru primerů, každá próba způsobí vznik jedinečně dlouhého produktu o velikosti mezi 130-480 bp (Schouten et al. 2002). Amplifikované PCR produkty jsou rozděleny kapilární elektroforézou na základě jejich různé délky ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)). Je to technika vysoce citlivá, robustní. Metoda MLPA slouží k detekci početních změn, je využívána při diagnostice nejčastější příčiny CMT onemocnění, kterou jsou duplikace a delece genu pro *periferní myelinový protein 22 (PMP22)*, ležícího v oblasti 17p11.2-12 (Paassen et al. 2014). Přibližně 70 % všech CMT1 je způsobeno submikroskopickou duplikací (CMT1A duplikací) o velikosti 1,5 Mb v oblasti genu pro *PMP22*, je tedy nejčastější formou dědičných neuropatií (Nelis et al. 1996). Submikroskopická delece (HNPP delece) v této oblasti je odpovědná za méně komplikovanou formu hereditárních neuropatií se sklonem k tlakovým obrnám (Van de Wetering et al. 2002).

Metodou MLPA jsem za pomoci kitu P406-A1 CMT2 (MRC-Holland, Amsterdam, Holandsko) vyšetřovala duplikace/delece pro CMT2, který zahrnoval próby pro geny *RAB7A*, *GARS*, *HSPB1*, *HSBP8* a *SPTLC1*.



Obrázek 6: Postup metody MLPA (převzato z [www.mlpa.cz](http://www.mlpa.cz))

#### 1.4.4 Masivně paralelní sekvenování (MPS)

Poslední dobou se objevily nové DNA sekvenační technologie a jsou převratem lékařského genetického výzkumu a klinického testování (Mestan et al. 2011; Rabbani et al. 2014). Masivně paralelní sekvenování umožňuje rychlejší genetické testování mnoha genů zároveň za zlomek původní ceny (Grada and Weinbrecht 2013).

##### Příprava knihovny DNA

Pro celogenomové sekvenování (WGS) jsou základem pro knihovnu všechny úseky genomové DNA, pro celoexomové sekvenování (WES) jsou to jenom protein kódující oblasti genů a pro targeted sekvenování jen vybrané úseky.

Nejpodstatnějším krokem pro následné kvalitní sekvenační data je správná příprava knihovny DNA. Počátečním materiálem pro MPS je genomická DNA (gDNA) již v mikrogramech o čistotě 1,8-2,0.

DNA je fragmentována, fragmenty jsou na obou koncích ligovány k adapterům (syntetické molekuly DNA specifické pro platformu) a následně amplifikovány (Ansorge 2009).

MPS sekvenování v této práci bylo provedeno za použití principu metody HaloPlex Target Enrichment System Reagent Kit (Agilent, Santa Clara, USA). Umožňuje vlastní

návrh prób o rozsahu několik tisíc exonů pomocí online aplikace SureDesign (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>). V našem případě HaloPlex Custom Panel Tier 1 umožňuje design v rozsahu 1-500 kb a maximálně 20 000 prób.

Panel pro hereditární neuropatie zahrnuje 97 známých genů: *AARS, AIFM1, ARHGEF10, ATLI, ATP7A, BICD2, BSCL2, CCT5, CHCHD10, COX6A1, CTDP1, DCTN1, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DNMT1, DRP2,DST, DYNC1H1, EGR2, FAM134B, FBLN5, FBXO38, FGD4, FIG4, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, GJB3, GNB4, HARS, HINT1, HK1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, IFRD1, IGHMBP2, IKBKA, INF2, ITPR3, KARS, KIF1A, KIF1B, KIF5A, KLHL13, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MED25, MFN2, MICAL1, MORC2, MPZ, MT-ATP6, MTMR2, MYH14, NDRG1, NEFL, NGF, NTRK1, PDK3, PLEKHG5, PMP2, PMP22, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF1, SBF2, SCN11A, SCN9A, SEPT9, SETX, SH3BP4, SH3TC2, SIGMARI, SLC12A6, SLC18A3, SLC5A7, SOD1, SOX10, SPG11, SPTLC1, SPTLC2, SURF, TFG, TRIM2, TRIM2, TRPV4, TUBB3, VAPB, VCP, WNK1, YARS.*

Analýzu dat je tedy možné rozdělit do 3 fází:

Primární – převedení signálu generovaného sekvenátorem na kód jednotlivých bazí a zhodnocení kvality. Výstupem je v převaze FASTQ soubor (soubor sekvencí jednotlivých readů) s informací o Phred skóre (optimum Q20-40). Je mírou kvality čtení nukleotidů generovaných automatickým DNA sekvenováním (Ewing et al. 1998). Čím je Phred skóre vyšší, tím je přesnost čtení bazí vyšší, tedy nižší chybovost. Počet čtení je vyjádřen hloubkou čtení (počet přečtení 1 báze) nebo pokrytí (hodnota vyjadřující pokrytí analyzované sekvence vzhledem k její délce). Měla by být vyšší než 20-30.

Sekundární – vyfiltrujeme pro ni data s dostatečnou kvalitou. Cílem je alignment (porovnání získaných readů a jejich spojení na základě překryvů) a detekce variant (hledání odchylek mezi získanou a referenční sekvencí).

Terciární – vstupní data jsou BAM a VCF. Sekvenační varianty se filtrují dle zvolených kritérií.



Legenda:

I:1 (1931) - nepostížená matka, která je ale nositelkou varianty p.Met692Val

II:3 (1950) - proband je postižen, nese variantu p.Met692Val

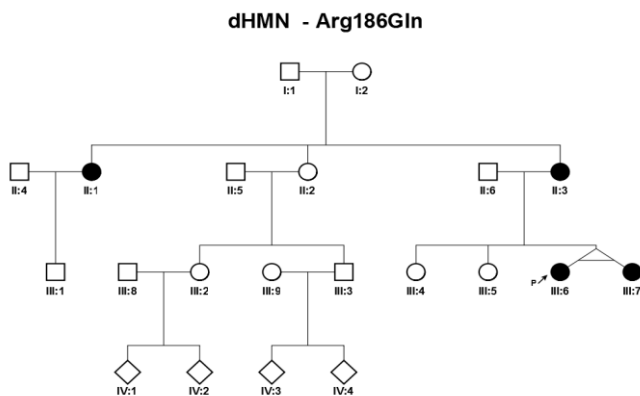
II:5 (1952) - sestra probanda je postižena, nese variantu p.Met692Val

III:3 (1984) - dcera probanda je nepostížená (nebo prozatím se v jejím věku neprojevily klinické příznaky), nese variantu p.Met692Val; III:5 (1978) - dcera sestry probanda je nepostížená (nebo prozatím se v jejím věku neprojevily klinické příznaky), nese variantu p.Met692Val

### **1.5.2 TRPV4**

Klasickým Sangerovým sekvenováním jsme vyšetřili 24 pacientů. MPS sekvenováním *TRPV4* genu jsme vyšetřili 217 pacientů. Patogenní variantu v genu jsme našli u jedné pacientky.

Klinicky byla vyšetřena 30letá pacientka s familiárním výskytem onemocnění v rodině, kde jsou podobné potíže popisovány u matky a sestry probandky (Obrázek 8). Její klinický i EMG nález svědčil pro hereditární motorickou neuropatii (HMN) s časným nástupem v dětství, pozvolnou progresí, skoliózou, dysfonií, dušností, výrazným zkrácením Achillových šlach a pes cavus (Obrázek 9).



**Obrázek 8: Rodokmen pacientky III:6 s mutací p.Arg186Gln v *TRPV4* genu (rodokmen použit v článku Mazanec et al. 2016)**

Legenda: Probandka III:6, její sestra dvojče III:7, jejich matka II:3 a sestra matky II:1 jsou postiženy a nesou variantu p.Arg186Gln

Všichni ostatní v rodokmenu jsou nepostiženi, nenesou variantu p.Arg186Gln



**Obrázek 9: Pes cavus u pacientky (obrázky použity v článku Mazanec et al. 2016)**





celoexomového sekvenování jsme zachytili patogenní mutaci v *DNM2* genu NM\_001005360.2(DNM2):c.1102G>A (p.Glu368Lys) v heterozygotním stavu. Byla již popsána jako příčina centronukleární myopatie.



**Obrázek 11: Fenotyp pacientky s mutací p.Glu368Lys (Foto laskavě poskytnuto MUDr. Haberlovou).**

Následně k nám byla zaslána další pacientka s psychomotorickým opožděním, problémy při běhu, svalová slabost progredovala v 10 letech, těžkosti s chůzí do schodů, ptózou, vysokým patrem, pes cavus, mírně afonickým hlasem. Výsledky svalové biopsie poukázaly na centronukleární myopatii. Molekulárně geneticky jsme jí vyšetřili cíleným sekvenováním *DNM2* genu a našli mutaci NM\_001005360.2(DNM2):c.1393C>T (p.Arg465Trp) v heterozygotním stavu. Varianta byla opakovaně popsána jako příčina centronukleární myopatie (CNM) (Bitoun et al. 2005).

#### 1.5.4 MORC2

Vyšetřovaný pacient je 39letý muž, který je sporadickým případem v rodině. Pacient má deformace nohou (Obrázek 12). První příznaky onemocnění se objevily ve věku 6 let, pacient měl problémy s chůzí, jízdou na kole. Diagnóza axonální Charcot-Marie-Tooth mu byla poprvé stanovena ve věku 10 let. Pacient má deformity nohou, pes cavus, má špatný úchop, problémy s použitím zipů a knoflíků. Když mu bylo 20 let, začal používat hůl, od 27 let je na invalidním vozíku. Vyšetření ve věku 30 let ukázalo progres onemocnění. Byla pozorována celková svalová slabost.

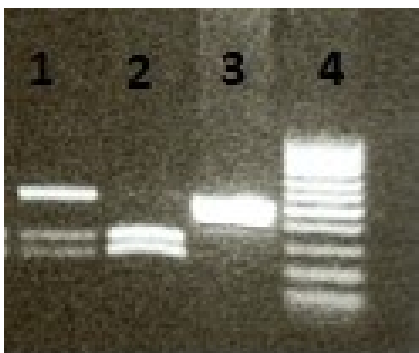


**Obrázek 12: Pacient s variantou v *MORC2* genu (převzato z článku Laššuthová et al. 2016)**

Pacient byl testován na duplikaci / delecii *PMP22*, sekvenováním byly vyšetřeny geny *MPZ*, *MFN2* a *GDAP1*. MPS panelem 72 genů, nebyly nalezeny žádné kauzální varianty, které by mohly vysvětlit příčinu CMT2 u tohoto pacienta. Proto jsme pacienta

zařadili na WES (Agilent SureSelect Human All Exon V5, USA). Po publikování článku Sevilla et al. 2015 se přehodnotily data a byla nalezena mutace NM\_014941.2(MORC2):c.568C>T (p.Arg190Trp). Ověřili jsme jí Sangerovým sekvenováním exonu 10 a segregáční analýza ukázala na *de novo* původ. Mateřství / otcovství bylo testováno sadou 10 mikrosatelitních markerů a nonpaternita byla vyloučena.

Díky tomuto nálezu, 161 pacientů s neznámou příčinou podezření na dědičnou polyneuropatii bylo testováno na přítomnost p.Arg190Trp v genu *MORC2* pomocí PCR restrikční metody. PCR produkty exonu 10 genu *MORC2* byly štěpeny *HpaII*, který štěpí wild type alelu a mutantní alela zůstává nedotčena (Obrázek 13). Ze 161 analyzovaných vzorků DNA byla detekována ještě jedna pacientka s touto mutací. Mutace byla potvrzena sekvenováním. U této pacientky se první příznaky onemocnění objevily ve věku 15 let a to křeče, neschopnost chodit rychle, od 44 let chůze s chodci. Pacientka byla dříve testována na mutace v *PMP22*, *Cx32*, *MPZ*, *HINT1*, *MFN2*, *GDAP1*, *LMNA*, *SH3TC2* sekvenováním bez zjištění kauzální mutace.



**Obrázek 13: Restrikční štěpení PCR produktů pomocí *HpaII* enzymu.**

Legenda:

1-3 proužky na gelu značí přítomnost 3 fragmentů (115 bp, 187 bp a 302 bp), kde je wild type alela naštěpená *HpaII* enzymem a alelu s mutací enzym neštěpí, zůstává intaktní

2-2 proužky (115 bp, 187 bp), normální homozygot

3 – nenaštěpený PCR produkt, kontrola (není štěpená enzymem *HpaII* a vzniká proto jenom jeden fragment)

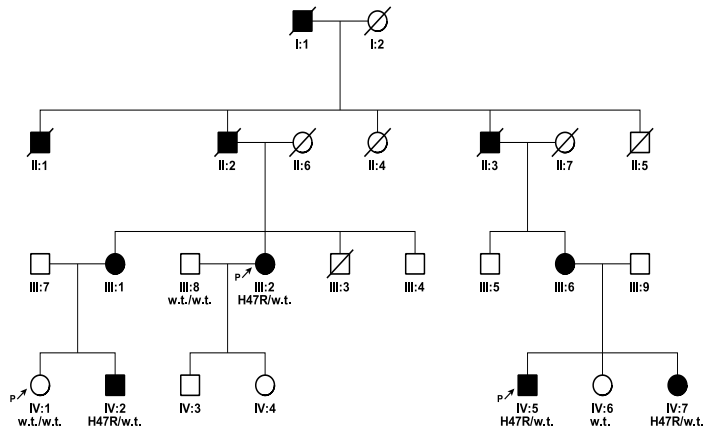
4 – ladder (50 bp Norgen Biotek, Kanada)

### **1.5.5 SOD1**

Vyšetřili jsme rodinu, která má tři větve. Pacienti byli odesláni do naší laboratoře nezávisle z různých pracovišť. Postupně bylo zjištěno, že se jedná o jednu rodinu (Obrázek 14).

Klinicky je v postižené rodině typickým iniciálním příznakem distální slabost a křeče na jedné dolní končetině. Věk začátku obtíží je vysoce variabilní (21 až 60 let). Slabost pozvolna progreduje a šíří se na další končetiny, současně se objevují i známky léze centrálního motoneuronu. Typickým klinickým fenotypem po několika letech průběhu onemocnění je smíšená (nebo periferní) čistě motorická kvadruparéza. Rychlost progresu je variabilní, pacienti byli po cca 10 letech průběhu onemocnění upoutáni na invalidní vozík. Klinické nálezy jsou shrnuty v Tabulce 8.

Rodina HMN - mutace H47R



Obrázek 14: Rodokmen rodiny se *SOD1* mutací

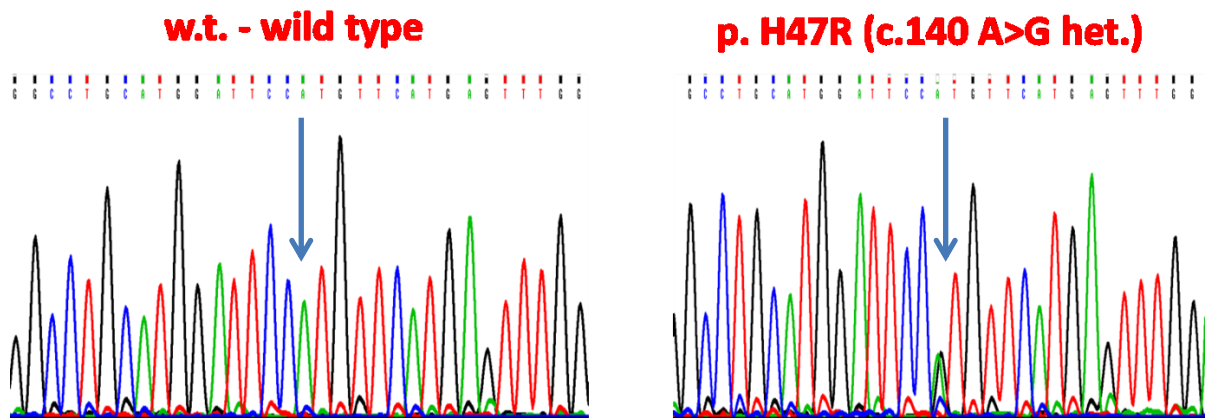
Primárně jsem postižené členy rodiny vyšetřila na nejčastější CMT1A duplikaci/deleci; sekvenování genů *BSCL2*, *GJB1* – bez nálezu kauzální mutace. Následovalo masivně paralelní sekvenování (HaloPlex kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) na panel 64 dosud známých genů spojovaných s dědičnou neuropatií (panel nezahrnoval *SOD1* gen) a to bez nálezu kauzální mutace. Protože se jedná o rodinu s mnohačetným výskytem dědičné neuropatie a s jasným klinickým nálezem, rozhodli jsme se pokračovat v hledání příčiny onemocnění metodou exomového sekvenování. WES bylo provedeno u 3 členů z rodiny – hledání stejných variant u 2 postižených a nepřítomných u zdravé. Vyhodnocení dat bylo provedeno vlastní pipeline pomocí lokální instalace Galaxy ([www.usegalaxy.org](http://www.usegalaxy.org)). Nalezli jsme mutaci NM\_000454.4(*SOD1*):c.140A>G (p.His47Arg) v heterozygotním stavu (Obrázek 15). Vyšetřila jsem celkově 8 dostupných členů rodiny a klasickým Sangerovým sekvenováním potvrdila perfektní segregaci mutace p.His47Arg s onemocněním v rodině. Mutace p.His47Arg byla poprvé popsána ve spojení s FALS ve dvou japonských rodinách (Aoki et al. 1993), interpretujeme jí jako patogenní. Varianta His47Arg byla rovněž popsána s dominantní

formou dědičné motorické neuropatie (Hoyer et al. 2014; Ostern et al. 2012). *SOD1* byl následně vyšetřen u dalších 43 českých pacientů s podobným fenotypem HMN, avšak bez nálezu další mutace.

Varianta p.His47Arg je konzervována mezi druhy. Funkční studie ukazují, že výsledkem je konformační změna proteinu SOD1, což vede k aberantní vazebné aktivitě (Fujisawa et al. 2012).

**Tabulka 8: Neurologické obtíže v rodině s mutací v *SOD1* genu**

Pacienti	Věk/Pohlaví	Věk vzniku obtíží	HK	DK	EMG - zívěr	Současný stav
II:1	zemřel ve věku 60 let / M		-	-	nemáme dostupné informace	-
II:2	zemřel ve věku 51 let / M	40 let	-	-	nemáme dostupné informace	-
II:3	zemřel ve věku 57 let / M	50 let	-	-	nemáme dostupné informace	-
III:1	71 / F	52 let	oslabená abdukce LHK	L5-S2 hyporeflexie, stoj na špičce nesvede	těžká motorická neuropatie na DK, lehká na HK	od 55 let na invalid. vozíku, po operaci katarakty
III:2	69 / F	48 let	C5-8 výbavné reflexy	L2-L4 výbavné, L5-S2 areflexie	motorická neuropatie na DK, zvýšené reflexy na HK	na invalid.vozíku
III:6	63 / F	53 let	C5-8 výbavné reflexy, nezvládne špetku	L5-S2 areflexie	těžká motorická neuropatie na DK, na HK lehčího stupně	od 60 let na invalid. vozíku, katarakta
IV:1	49 / F	zdravá	bez obtíží	stoj a chůze v normě	normální	
IV:2	51 / M	40 let	nezvládne špetku	neschopen chůze po patách	těžká motorická neuropatie na DK	na invalid.vozíku
IV:6	39 / F	zdravá	bez obtíží	stoj a chůze v normě	normální	
IV:5	41 / M	25 let	C5-8 výbavné reflexy, nezvládne špetku	L2-L4 výbavné, L5-S2 hyporeflexie	motorická neuropatie na DK, HK i svalech trupu	od 27 let na invalid. vozíku
IV:7	37 / F	34 let	bez obtíží	L2-L4 výbavné, L5-S2 hyporeflexie, vyšší nárt, kladivkovité prsty	motorická neuropatie na DK	



Obrázek 15: Wild type sekvence a sekvence s mutací p.His47Arg

## 1.6 Diskuze

Pro CMT pacienty úspěšně používáme diagnostické schéma DNA testování závislé na klinické prezentaci, typu neuropatie, způsobu dědičnosti a věku nástupu pro nejčastější případy počínajíc vyšetřením CMT1A/HNPP duplikací/delecí pomocí MLPA metody, následné Sangerovo sekvenování genů: *GJB1*, *MPZ* a *MFN2* v první linii testování. Jestliže tyto testy neodhalí příčinu onemocnění, pokračujeme s MPS specifického panelu genů. MPS je výhodným nástrojem pro vzácné, neobvyklé a atypické případy a typy CMT. Na rozdíl od klasických Sangerových sekvenčních technologií, MPS ve výchozím nastavení rozpozná SNP.

V souladu s předem stanovenými cíli dizertační práce jsme reprezentativní soubor pacientů pro hereditární neuropatie s převážně axonálním typem neuropatie zařadili na klasické Sangerovo sekvenování. Následně jsme tuto metodu nahradili masivně paralelním sekvenováním panelem 97 genů pro neuropatie. Nalezené pravděpodobně patogenní varianty jsme ověřovali klasickým Sangerovým sekvenováním. Tento postup se nám jeví jako nejlepší možný pro nalezení příčiny onemocnění u pacientů.

Zjistili jsme, že nemá význam testovat samostatně geny *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *SOD1* a *TRPV4* u našich pacientů a nejvhodnější je pacienty vyšetřit pomocí panelu genů, který dané geny zahrnuje (Lassuthova et al. 2016).



### **1.6.1 Mutace p.Met692Val v *GARS***

Pomocí Sangerovho sekvenování 37 pacientů a MPS analýzy u 217 pacientů jsme zjistili, že mutace v genu *GARS* u našich pacientů jsou vzácné.

Varianta p.Met692Val v heterozygotním stavu je lokalizována v antikodonové doméně, je vysoce konzervovaná. Nalezená varianta doposud nebyla popsána v EVS a HGMD databázích, ale na základě predikčních programů (PolyPhen), konzervovanosti a segregací analýzy v rodině se může jednat o patogenní mutaci a příčinu dědičné neuropatie u pacienta. U stejně postižené sestry jsme danou variantu také našli. U dvou dětí pacienta jsme hledanou variantu neprokázali, zatímco u dvou dalších údajně zdravých dětí pacienta jsme variantu prokázali a mohlo by to výrazně svědčit proti kauzalitě varianty. Vzhledem k pozdnímu nástupu neuropatických symptomů u otce je však možné, že ve věku 31 let ještě nejsou neuropatické symptomy vyjádřeny ani v subklinické formě.

### **1.6.2 Mutace p.Arg186Gln v *TRPV4***

Mutace p.Arg186Gln byla popsána v Landoure et al. 2010 jako patogenní. Nukleotidová záměna má za důsledek substituci argininu za glutamin na pozici 186 aminokyseliny ve vysoce konzervované oblasti genu. Zajímavé je, že 186. aminokyselina je lokalizována na konvexní straně ankyrin opakující se domény (ARD), tato konvexní strana je spojována s mutacemi pro CMT onemocnění a má zvláštní význam pro funkci TRPV4 v periferním nervovém systému, zatímco konkávní strana je spojována s mutacemi pro skeletální dysplázií (Landouré et al. 2012). Funkční expresní studie v buňkách HEK293 ukázaly, že mutantní protein Arg186Gln vedl ke zvýšení hladiny vápníku a zvýšenému odumírání buněk, což naznačuje abnormální konstitutivní aktivitu *TRPV4* (Landoure et al. 2012).

Tato mutace byla detekována i u matky pacientky, která má podobné neurologické potíže, také u podobně postižené sestry probandky – dvojčete, což výrazně svědčí pro kauzalitu mutace.

### **1.6.3 Mutace p.Glu368Lys a p.Arg465Trp v *DNM2***

Heterozygotní mutace p.Glu368Lys způsobuje substituci kyseliny glutamové za lysin ve střední proteinové doméně *DNM2*, mezi aminokyselinami Glu a Lys je malá fyzicko-chemická odlišnost. Programy SIFT a MutationTaster ji popisují jako deleterious a disease causing, což svědčí pro její patogenicitu. Mutace již byla opakovaně popsána jako příčina centronukleární myopatie (Aghbolaghi and Lechpammer 2017; Bitoun et al. 2005; Catteruccia et al. 2013). Varianta je *de novo* vzniklá, vzhledem k tomu, že rodiče pacientky jsou zdraví a nebyla u nich prokázána tato mutace, předpokládáme její patogenní a kauzální vliv na rozvoj nervosvalového onemocnění u probandky.

Heterozygotní mutace p.Arg465Trp ve střední proteinové doméně způsobuje substituci argininu za tryptofan v pozici 465, je mezi nimi střední fyzicko-chemická odlišnost. SIFT a MutationTaster ji popisují jako deleterious a disease causing, což svědčí pro její patogenicitu. Mutace byla publikována (Aghbolaghi and Lechpammer 2017; Bitoun et al. 2005; Catteruccia et al. 2013). Obě mutace jsou popsány jako mutační hotspot pro *DNM2* gen (Bohm et al. 2012).

### **1.6.4 Mutace p.Arg190Trp v *MORC2***

Pomocí celoexomového sekvenování u jednoho pacienta a restriktivního štěpení u druhého pacienta jsme našli mutaci c.568C>T (p.Arg190Trp) u 2 ze 161 celkově vyšetřených pacientů (u 1,24% pacientů).

Mutace se nachází v GHL-ATP-ázové doméně (Obrázek 4). Záměna způsobuje substituci argininu za tryptofan na kodónu 190 MORC2 proteinu. Argininový zbytek je vysoce konzervovaný a mezi argininem a tryptofanem existuje mírný fyzikálně-chemický rozdíl. SIFT a PolyPhen-2 variantu klasifikují jako disruptivní. Z těchto důvodů byla tato varianta klasifikována jako patogenní. Tato varianta není obsažena v populačních databázích (dbSNP, ESP, ExAC bez frekvence), byla publikována v souvislosti s onemocněním ve více rodinách s CMT2 (Albulym et al. 2016; Sevilla et al. 2016) a ve sporadických případech CMT2 (Lassuthova et al. 2016; Sevilla et al. 2016).

#### **1.6.5 Mutace p.His47Arg v *SOD1***

Mutace p.His47Arg byla poprvé popsána v spojení s FALS ve dvou japonských rodinách (Aoki M et. Al, 1993), interpretujeme jí jako patogenní. Varianta p.His47Arg byla rovněž popsána s dominantní formou dědičné motorické neuropatie (Ostern et al. 2012; Hoyer et al. 2014). Nebyla pozorována u přibližně 6 500 osob evropského a afrického amerického původu v NHLBI Exome Sequencing Project, což naznačuje, že v těchto populacích není běžnou benigní variantou. Varianta p.His47Arg je konzervována mezi druhy. Funkční studie ukazují, že výsledkem je konformační změna proteinu SOD1, což vede k aberantní vazebné aktivitě (Fujisawa et al. 2012).

## 1.7 Závěr

### 1.7.1 *GARS*

Mutace v *GARS* genu nejsou velmi častou příčinou onemocnění u českých pacientů. Z 217 pacientů jsme našli variantu jenom u jednoho pacienta, a to variantu p.Met692Val, kterou považujeme za polymorfismus, protože nesegreguje v rodině (Obrázek 7).

### 1.7.2 *TRPV4*

Nálezem mutace c.557G>A (p.Arg186Gln) v *TRPV4* genu popisujeme zřejmě první pacienty s potvrzenou mutací v genu *TRPV4* v ČR. Z 217 u nás vyšetřených pacientů se jedná o jediný případ mutace v *TRPV4* genu s jasně odlišitelným fenotypem, který odpovídá klinickým příznakům, popsaným v literatuře. U českých pacientů se tedy jedná o vzácnou příčinu dHMN.

Rozlišitelné kritéria pro diagnostiku *TRPV4* genu jsou:

- časný nástup v dětství
- výrazné zkrácení Achillových šlach, pes cavus, distální oslabení končetin
- oslabení hlasivkových svalů (dysfonie) a skolióza

Mutace již byla popsána jako patogenní (Landoure et al. 2012). V rámci souhrnu výsledků doposud u nás vyšetřených pacientů pomocí panelu genů byla zahrnuta do článku:

Lassuthova P, Safka Brozkova D, Krutova M, **Neupauerova J**, Haberlova J, Mazanec R, et al. Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Aug 22;11(1):118.

Kazuistiku pacientky jsme také publikovali v časopise:

Mazanec R, Neupauerova J, Baumgartner D, Potockova V, Lassuthova P, Safka Brozkova D, Seeman P. Hereditární motorické neuropatie. *Neurologie pro praxi*. 2016; 17(6): 354-35

### 1.7.3 *DNM2*

Potvrdili jsme *de novo* mutace p.Glu368Lys a p.Arg465Trp v *DNM2* genu u 2 pacientů ve spojení ne s hereditární neuropatií, ale centronukleární myopatií. Jsou to první dva pacienti s molekulárně genetickým potvrzením centronukleární myopatie.

U mutace p.Glu368Lys změna sekvence nahrazuje kyselinu glutamovou lysinem v kodonu 368 proteinu *DNM2*. Zbytek kyseliny glutamové je vysoce konzervovaný a mezi kyselinou glutamovou a lysinem existuje malý fyzikálně-chemický rozdíl. Tato varianta je přítomna v populačních databázích (rs121909092, ExAC 0,006%). Byla opakovaně popsána v literatuře u jedinců postižených autosomálně dominantní centronukleární myopatií (Bohm et al. 2012; Hanisch et al. 2011; Mori-Yoshimura et al. 2012).

U mutace p.Arg465Trp jde o aminokyselinovou substituci, která mění vysoce konzervovaný zbytek v střední doméně proteinu (Bitoun et al. 2005). Varianta p.Arg465Trp v genu *DNM2* byla dříve popsána ve více rodinách s centronukleární myopatií a je nejčastěji popsanou patogenní variantou *DNM2* (Bitoun et al. 2005; Cowling et al. 2011). Myší modely demonstrují, že mutantní myši Arg465Trp s kloubovým postižením vykazují svalové defekty, progresivní atrofii a změny svalové biopsie podobné změnám pozorovaným u lidí (Durieux et al. 2010). Další funkční

studie ukazují, že p.Arg465Trp zvyšuje aktivitu GTPázy a vede k vysoce stabilnímu dynaminovému komplexu (Cowling et al. 2011).

Rozlišitelná kritéria pro diagnostiku CNM:

- distální slabost dolních končetin
- pes cavus
- u našich pacientů nejsou zaznamenány potíže s dýcháním

Podle shrnutí v článku Haberlová et al. 2011 se doporučuje vyšetřovat *DNM2* gen u pacientů s nejasnou intermediární anebo primárně axonální CMT, s pozdějším nástupem onemocnění a s predominantně distální motorickou periferní neuropatií.

#### **1.7.4 MORC2**

Mutace p.Arg190Trp byla nalezena u pacientů z různých zemí, považuje se za mutační hotspot, což se potvrdilo nálezem stejné varianty i u našich dvou pacientů (ze 161 vyšetřených). Klinický obraz našich pacientů je stejný jako u pacientů v publikovaném článku (Sevilla et al. 2016). Gen byl zařazen do panelu genů.

Rozlišitelná kritéria pro diagnostiku *MORC2* jsou:

- svalová slabost a progresivní onemocnění
- křeče na dolních končetinách, distální slabost a sensorický deficit, přidruží se slabost horních končetin

### 1.7.5 *SOD1*

Potvrdili jsme, že mutace v genu *SOD1* způsobují i dědičnou motorickou neuropatii. Zařadili jsme gen *SOD1* do panelu. Identifikace mutace c.140A>G (p.His47Arg) v *SOD1* pomocí exomového sekvenování nám opět ukázala, že tuto metodiku lze s výhodou použít právě v podobných případech - nález jasně kauzální mutace v genu, který by nebyl býval vyšetřován, protože spojitost mezi obtížemi pacienta a tímto genem nebyla dosud dostatečně známá. Je to zřejmě první zachycená rodina v ČR s autosomálně dominantním typem hereditární motorické neuropatie a se smíšenou poruchou centrálního a periferního motoneuronu v důsledku mutace v *SOD1* genu.

## **2 Přehled výsledků vlastních prací**

### **2.1 Přehled v číslech**

Celkově jsem publikovala 16 článků v časopisech s IF, z toho 3krát jako první autor, 13krát jako spoluautor. Dle databáze Web of Science Core Collection je celkový počet citací 39 (34 bez autocitací). H-index 4.

Z těchto 16 publikací je 9 přímo zaměřených na problematiku dědičných neuropatií. Dále jsem spoluautorkou 2 česky psaných článků bez IF (v recenzovaných časopisech) s tematikou dědičných neuropatií.

V posledních 5 letech jsem se také věnovala genetice epilepsií. S touto tematikou jsem publikovala 4x, z toho 2x jako první autorka.

Proto v dalším textu ve stručnosti okomentuji dva okruhy:

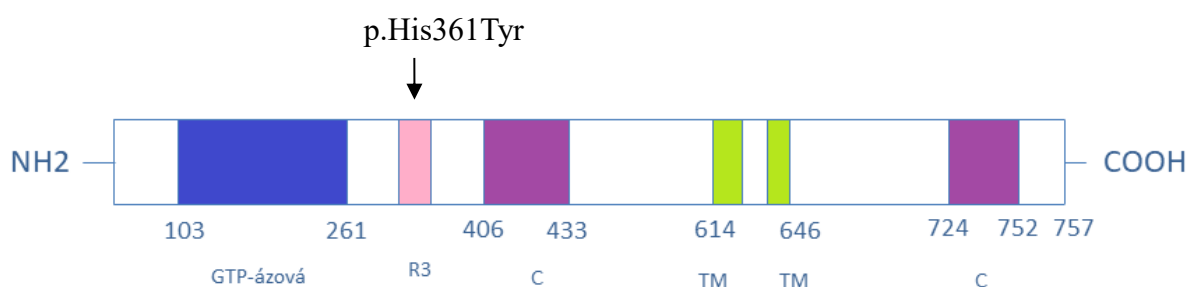
- publikace s tematikou dědičných neuropatií výše neuvedené (kapitola 2.2)
- publikace s tematikou genetiky epilepsií (kapitola 2.3)



## 2.2 Ostatní publikace s tematikou dědičných neuropatií

### 2.2.3 *MFN2* gen

*MFN2* gen je lokalizován na vnější mitochondriální membráně a podílí se na regulaci fúzi mitochondrií (Santel and Fuller 2001). Je lokalizován na chromozomu 1p36.22 (Zuchner et al. 2004), má 19 exonů (17 kódujících)(Casasnovas et al. 2010), referenční sekvenci používáme NM\_014874.3. Domény jsou znázorněny na Obrázku 16. Většina *MFN2* mutací je popisována v GTP-ázové doméně, Coiled-coil doméně a R3 vysoce konzervované doméně (Kijima et al. 2005). Mutace v genu *MFN2* způsobují CMT2A (Kijima et al. 2005; Lawson et al. 2005; Zuchner et al. 2004).



**Obrázek 16: Domény *MFN2* genu (upraveno z Engelfried et al. 2006)**

GTP-ázová doména; R3 doména, C = coiled coil doména; TM = transmembránová doména

Čísla 103-757 popisují pozice aminokyselin

Všech 17 kódujících exonů a přilehlých intronových sekvencí *MFN2* genu jsem sekvenovala metodou dle Sangera jako test první volby. Klasickým Sangerovým sekvenováním jsem u nás v laboratoři vyšetřila 139 pacientů a našla 8 patogenních

mutací. U českých pacientů jsou mutace v *MFN2* nejčastější příčinou CMT2 (Brozková et al. 2013). Výsledky byly shrnuty v práci:

Brožková DŠ, Posádka J, Laššuthová P, Mazanec R, Haberlová J, Sišková D, Sakmaryová I, **Neupauerová J**, Seeman P.: Spectrum and frequencies of mutations in the *MFN2* gene and its phenotypical expression in Czech hereditary motor and sensory neuropathy type II patients. *Mol Med Rep.* 2013 Dec;8(6):1779-84. doi: 10.3892/mmr.2013.1730. Epub 2013 Oct 14.

Zajímavým nálezem byla varianta, kterou Sangerovo sekvenování neodhalilo, ale MPS ano. Pacient k nám byl odeslán s časným nástupem onemocnění (od 3 let) závažného axonálního typu Charcot-Marie-Tooth (CMT2) s dominantní dědičností. Časný nástup a rodinná anamnéza (těžce postižená matka) poukázaly na fenotyp CMT2A. Pacient se dostal na naši kliniku ve věku 4 let. Rodokmen rodiny pacienta je znázorněn na Obrázku 17. První příznaky u pacienta zaznamenali prarodiče, když mu byly 3 roky, pacient měl problémy hlavně s chůzí ze schodů. Neurologické vyšetření ve věku 4 let ukázalo na atrofii lýtek, bilaterálně pes cavus, svalový tonus byl snížený, zatímco reflexy L2-L4 zvýšené. Z anamnézy bylo známo, že matka pacienta trpěla podobným typem neuropatie, její potíže začaly již ve 4 letech, její chůze těsně před porodem byla omezena, bohužel zemřela po porodu. Všechny klinické údaje a časný věk nástupu naznačovaly na závažný typ CMT2A s možnou mutací v *MFN2* genu (Feely et al. 2011).

Použité PCR primery u daného pacienta byly převzaty z publikace (Zuchner et al. 2004a) (Tabulka 9).

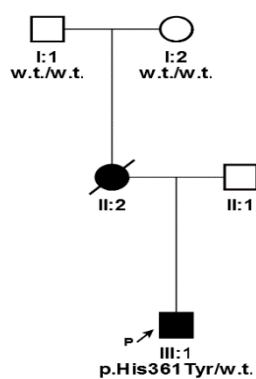
**Tabulka 9: Sekvence primerů pro *MFN2* (převzaty z Züchner et al. 2004).**

Exon	Forward primer	Reverse primer
9	TCTGTGCCTCCCCAGCTC	GGTGGAGCACCCCTTGTCTC

**Tabulka 10: Sekvence primerů pro *MFN2* nové bez SNP**

Exon	Forward primer	Reverse primer
9	GGTTGTAGGCCCCCTGGTG	AAGGCGTGTCCCTAACTGCC

### Family p.His361Tyr



**Obrázek 17: Rodokmen rodiny s mutací p.His361Tyr v *MFN2* genu (použito z Neupauerová et al. 2016)**

U pacienta jsme provedli klasické Sangerovo sekvenování *MFN2* genu kupodivu bez nálezu kauzální varianty. DNA pacienta jsme následně vyšetřili pomocí MPS panelem všech 78 genů popsáných ve spojitosti s dědičnými neuropatiemi (*AARS, ARHGEF10, AT11, ATP7A, BICD2, BSCL2, CCT5, COX6A1, CTDPI, DCTN1, DHTKD1, DNAJB2, DNM2, DNMT1, DYNC1H1, EGR2, FAM134B, FBLN5, FGD4, FIG4, GAN, GARS, GDAP1, GJB1, GNB4, HARS, HINT1, HK1, HSPB1, HSPB3, HSPB8, HSP22, IGHMBP2, IKBKAP, INF2, ITPR3, KARS, KIF1A, KIF1B, KLHL13, LITAF, LMNA, LRSAM1, MARS, MED25, MFN2, MICAL1, MPZ, MTMR2, MYH14, NDRG1, NEFL, NGF, NTRK1, PDK3, PLEKHG5, PMP22, PRPS1, PRX, RAB7A, REEP1, SBF1, SBF2, SEPT9, SETX, SH3BP4, SH3TC2, SLC12A6, SLC18A3, SLC5A7, SOX10, SPTLC1, SPTLC2, TFG, TRIM2, TRPV4, VCP, WNK1, YARS*). Pomocí MPS byla překvapivě nalezena heterozygotní mutace v již vyšetřeném *MFN2* genu NM\_014874.3(MFN2):c.1081C>T (p.His361Tyr) v heterozygotním stavu. Sangerovo sekvenování mutaci neodhalilo v důsledku jednonukleotidového polymorfismu pod sekvencí reverse primeru v 9. kódujícím exonu. Byla provedená nová PCR reakce s novými primery (Tabulka 10) a následné Sangerovo sekvenování pak potvrdilo mutaci v *MFN2* genu.

Heterozygotní mutace p.His361Tyr již byla popsána jako patogenní (Feely et al. 2011; Verhoeven et al. 2006). Nachází se v R3 vysoce konzervované oblasti. V našem případě, kdy klasické Sangerovo sekvenování neodhalilo mutaci, ale MPS ano, jsme chtěli poukázat na to, že výpadek amplifikace jedné alely, tzv. „allele drop-out“ je dobře známá příčina nezachycení mutace v důsledku nerovnoměrné amplifikace heterozygotních alel.

Predikce patogenicity zhodnotila mutaci jako závažnou-deleterious mutaci programem SIFT (<http://sift.jcvi.org>) a onemocnění způsobující mutaci programem MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>). Tato pozice je vysoce konzervovaná. Následně byla testována segregace mutace s onemocněním v rodině. Nepostižený otec nebyl testován, nebyl ochoten přistoupit k DNA testování. Pacientova matka, která byla podobně postižena, je zesnulá a její DNA nebyla k dispozici. Avšak, testovali jsme maternální prarodiče, kteří jsou bez neurologických obtíží, a mutace nebyla detekována, neprokázali jsme, že by šlo o vzácnou nepatogenní variantu. Z toho důvodu předpokládáme, že mutace vznikla *de novo* u postižené matky pacienta; avšak, nebylo to možné dokázat z jejího vzorku DNA.

Mutace v genu *MFN2* byly nalezeny u 8 pacientů ze 139 vyšetřených (tj. 5,8 %). Přehled spektra a frekvence mutací v *MFN2* genu je v článku (Brozkova et al. 2013). Zajímavý případ laboratorní diagnostiky pacienta s axonální formou CMT2 onemocnění, u kterého klasické Sangerovo sekvenování nedetekovalo kauzální mutaci c.1081C>T (p.His361Tyr) v *MFN2* genu z důvodu jednonukleotidového polymorfismu (rs2236057) pod sekvencí PCR primeru jsme publikovali v článku:

**Neupauerova J, Grecmalova D, Seeman P, Lassuthova P. Massively Parallel Sequencing Detected a Mutation in the MFN2 Gene Missed by Sanger Sequencing Due to a Primer Mismatch on an SNP Site, 2016, Ann Hum Genet.;80(3):182-6.**

Plný text článku je v příloze č. 2.

## 2.3 Ostatní publikace s tematikou epileptických encefalopatií

Od roku 2016 ve spolupráci s Klinikou dětské neurologie 2. LF UK a FNM jsme se začali věnovat diagnostice závažných dětských epilepsií a epileptických encefalopatií. Zabýváme se jak jejich vyšetřením pomocí panelu genů, tak i WES a WGS analýzou. Epilepsie je častým neurologickým onemocněním s prevalencí 5-8 na 1000 jedinců (Fiest et al. 2017). Postihuje přibližně 65 milionů lidí na světě (Moshe 2015). Epilepsie je porucha mozku charakterizována trvalou predispozicí ke generování epileptických záchvatů (Fisher et al. 2014).

Současná definice podle ILAE (Fisher et al. 2014) epilepsii popisuje jako:

1. Minimálně dva nevyprovokované záchvaty vyskytující se v intervalu nejméně 24 hodin od sebe.
2. Jeden nevyprovokovaný (nebo reflexní) záchvat a pravděpodobnost dalších záchvatů podobná obecnímu riziku recidivy (nejméně 60 %) po dvou nevyprovokovaných záchvatech, které se vyskytly během následujících 10 let.
3. Součást epileptického syndromu.

Příčiny epilepsie jsou různé – od vývojových vad mozku, metabolických onemocnění, zevních poškození mozku, infekcí, traumat, autoimunitních onemocnění přes genetické příčiny-v poslední době se ukázalo, že velké množství epilepsií má genetický původ.

Klasifikace dle ILAE z roku 2017 (Scheffer et al. 2017) klasifikuje epilepsie podle typu záchvatů (s fokálním, generalizovaným a neznámým nástupem), podle typu epilepsie (fokální, generalizovaná, kombinovaná generalizovaná a fokální, neznámá) a podle epileptického syndromu. Vzácnější jsou genetické epilepsie způsobené mutacemi jednoho genu nebo strukturálními chromozomovými aberacemi (Steinlein 2008).

Epileptické encefalopatie jsou onemocnění, kde kognitivní deficit a vývojový regres je přímým důsledkem přítomnosti záchvatů a epileptické mozkové aktivity (Engel 2001).

Všeobecný postup při genetickém vyšetření je následovný – prvním krokem po základních laboratorních výsledcích a EEG je vyšetření CGH microarrayí. Definitivní diagnóza se tím ale určí u méně než 5 % pacientů (Mercimek-Mahmutoglu et al. 2015). Druhým krokem je testování jednoho konkrétního genu v případě jasných klinických příznaků poukazujících na daný syndrom. Příkladem je Dravetův syndrom, u kterého 80 % pacientů má patogenní variantu v *SCN1A* genu (Marini et al. 2011). Asociace Rettova syndromu s mutacemi v *MECP2* a *CDKL5* genech jsou taky známé (Liyanage and Rastegar 2014; White et al. 2010). Na detekci častých duplikací a delecí v např. genu *SCN1A* je k dispozici kit MLPA (Mulley et al. 2006). Následujícím krokem je testování pomocí panelu genů. Před pár lety bylo známých pouze 12-20 genů spojovaných s epilepsií (Ottman et al. 2010). V současnosti panely genů zahrnují přes 100 genů, některé i 300+ (Chambers et al. 2016) přičemž se objasní přibližně 15-25 % případů (Mercimek-Mahmutoglu et al. 2015). Dalšími kroky jsou použití WES a WGS (Dyment et al. 2015; Helbig et al. 2016; Willig et al. 2015).

Pečlivě vybrané rodiny pacientů, u kterých cílené resekvenování panelu genů neukázalo žádnou kauzální variantu, byly zařazeny jako tria (nepostižení rodiče a proband) na vyšetření pomocí WES s cílem najít *de novo* mutace.

V našem projektu jsme postupovali podle následujícího algoritmu:

Pacienti s klinicky rozpoznatelným fenotypem byli testováni na přítomnost mutací v genech, které jsou nejčastější příčinou (např. *SCN1A*).



V dalším kroku nebo u pacientů s klinicky nezařaditelným fenotypem jsme provedli cílené resekvenování panelem genů (97/112 genů), jejichž mutace způsobují těžké dětské epilepsie a encefalopatie (Staněk et al. 2018).

<b>A</b> DAR	<b>B</b> RAT1	<b>F</b> ASN	<b>G</b> LDC	<b>I</b> QSEC2	<b>M</b> BD5	<b>P</b> ANK2	<b>P</b> SEN1	<b>SCN1B</b>	<b>SLC9A6</b>	<b>T</b> BC1D24
ADCK3	<b>C</b> 10ORF2	FLNA	GNAO1	<b>K</b> CNA2	MECP2	PCDH19	PURA	SCN2A	SPTAN1	TCF4
ADSL	CACNA1A	FOLR1	GPHN	KCNB1	MEF2C	PHF6	<b>Q</b> ARS	SCN8A	SRGAP2	TDP2
ALDH7A1	CASK	FOXG1	GRIN1	KCNC1	MFSD8	PIGQ	<b>R</b> NASEH2A	SCN9A	SRPX2	TPP1
AMT	CDKL5	<b>G</b> ABBR2	GRIN2A	KCNH5	MOCS1	PLCB1	RNASEH2B	SLC12A5	ST3GAL3	TREX1
AP4S1	CLCN4	GABRA1	GRIN2B	KCNJ10	MOCS2	PNKP	RNASEH2C	SLC13A5	ST3GAL5	TSC1
ARHGGEF9	CNTNAP2	GABRB3	<b>H</b> CN1	KCNQ2	MTHFR	PNPO	ROGDI	SLC19A3	STXBP1	TSC2
ARX	<b>D</b> NM1	GABRG2	HDAC4	KCNQ3	MTOR	POLG	RYR3	SLC25A22	SYN1	<b>U</b> BE3A
ASAH1	DOCK7	GAMT	HNRNPU	KCNT1	<b>N</b> EDD4L	PRIMA1	<b>S</b> AMHD1	SLC2A1	SYNGAP1	<b>W</b> DR45
ATP1A3	<b>E</b> EF1A2	GCSH	<b>CH</b> D2	KCTD7	NRXN1	PRRT2	SCN1A	SLC35A2	SZT2	<b>Z</b> EB2



V případě neobjasnění ani vyšetřením panelu dosud spojovaných genů pomocí MPS jsme provedli celoxomové sekvenování-hledání *de novo* variant, spolupráce s EuroEPINOMICS. Exomové sekvenování se jeví jako další úspěšný nástroj v genetice na identifikování nových variant u pacientů s neurovývojovými poruchami (Helbig 2016, Martin et al. 2014). Cílem při dalších objevech nových genů pro epilepsii je sdílení dat a výměna informací a spolupráce na mezinárodní úrovni, do které jsme začleněni.



V případě neobjasnění pomocí WES je možné pokračovat celogenomovým sekvenováním (WGS). WGS může odhalit až o 10-15 % více mutací v exomu a další v nekódující části než WES (m.j. i díky jiné technologii) (Martin et al. 2014). Příprava knihoven byla provedena pomocí kitů SureSelect (Agilent) podle uživatelského



manuálu. Následná sekvenační analýza proběhla na přístroji HiSeq4000 na zahraničních pracovištích (Macrogen Inc., Seoul, Korea). Získaná data byla přiřazena k referenční sekvenci a analyzována. Analýzu dat jsme provedli pomocí NextGENe (Softgenetics), SureCall (Agilent) a naší lokální instalace s vlastním workflow serveru Galaxy (<https://usegalaxy.org>). Varianty nalezené u probandů a nenalezené u nepostižených rodičů jsme hodnotili pomocí softwarů PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), zohlednila jsem frekvenci v populaci (Exome Sequencing Project (ESP), dbSNP 135, 1000 Genomes, ExAC, GnomAD). Dále pro analýzu dat z WES jsem využila přístup do předplacené databáze mutací lidského genomu HGMD Profess. (The database of Human Genome Mutation Data, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) a také Alamut (<http://www.interactive-biosoftware.com/>). Objevené varianty jsem potvrdila klasickým Sangerovým sekvenováním na přístroji ABI 3130 a potvrdila segregaci mutace v rodině vyloučením u obou rodičů.

### 2.3.1 *SETBP1* gen

Missense varianty v *SETBP1* genu, predominantně v exonu 4, byly popsány jako kauzální pro SGS syndrom.

Schinzel-Giedion syndrom (SGS) je extrémně vzácné onemocnění s autosomálně dominantním typem dědičnosti postihující stejně obě pohlaví, prevalence není známá. Celosvětově je zaznamenáno jenom 50 případů. Mezi typické příznaky SGS patří: postnatální růstová retardace, těžké opoždění psychomotorického vývoje, faciální dysmorfie, hypoplazie střední části obličeje, makroglosie, exoftalmus, hirsutismus, a mnohé vrozené malformace, v důsledku, kterých se ne všichni pacienti dožívají dospělého věku (AL-Mudaffer et al. 2008).

Vyšetřovaný pacient je 20letý muž s faciální dysmorfii, farmakorezistentní epilepsií, závažnou intelektuální nedostatečností a poruchou autistického spektra (dle literárního spektra se jedná pravděpodobně o nejstaršího pacienta s touto diagnózou celosvětově). Abnormální psychomotorický vývoj byl zaznamenán od počátku. Jsou u něj přítomny dysmorfické rysy, výrazné acné vulgaris, problémy s příjmem potravy, chybějící řečové schopnosti. Ve věku 4 let byl diagnostikován i autismus. Epilepsie u něj začala ve věku 7 let myoklonickými, myoklonicko-astatickými záchvaty, později tonicko-klonickými. Vyústilo to také ve zhoršení chůze. Ketogenní strava u pacienta snížila intenzitu záchvatů. Magnetická rezonance poukázala na difúzní mozkovou atrofii. Nálezy na elektroencefalografickém vyšetření korelují s Lennox-Gestaut syndromem. U pacienta není přítomen žádný kardiologický defekt.

Pacienta jsme zařadili na panel 97 genů spojovaných s různými formami epilepsií (SureSelect, Agilent, Santa Clara, USA). Po neobjasnění příčiny jsme doplnili

celoexomové sekvenování (SureSelect Human All Exon V5 kit, Agilent Technologies, USA) na přístroji HiSeq4000 (Illumina, California, USA).

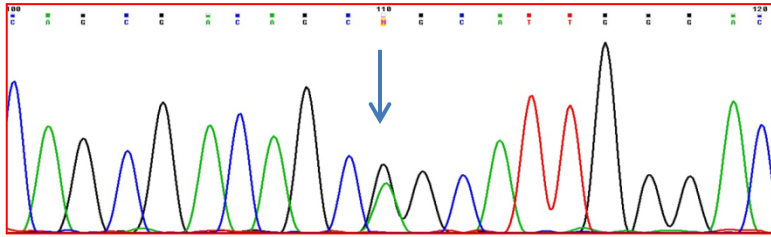
Kandidátní varianty jsme detekovali pomocí naší vlastní pipeline (Galaxy). Data byla analyzována pomocí DeNovoGear (<http://denovogear.weebly.com/>). Vyhodnocením dat z WES byla nalezena heterozygotní varianta v exonu 4 genu *SETBP1* NM\_015559.2(SETBP1):c.2601C>G (p.Ser867Arg). Pro potvrzení nálezu z MPS jsem provedla cílené sekvenování exonu 4, který je mutačním hotspotem za pomoci primerů z Tabulky 11.

**Tabulka 11: Sekvence primerů pro *SETBP1* gen**

<b>Exon</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>4</b>	ACACAGTGG AACCTGGAAGC	AGGCCTACCACGCTTCTTC

Všechny primery jsem navrhovala pomocí programu ExonPrimer na webu UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

Druhou pacientkou je roční dívka s faciální dysmorfíí, mikrocefálií, hypertelorismem, hirsutismem a exoftalmem. Korelace a přehodnocení fenotypu prvního pacienta v dětství s fenotypem dívky byly klíčové k přesné syndromologické diagnostice SGS klinickým genetikem. Tudíž jsme u pacientky provedli přímou analýzu sekvenování exonu 4 *SETBP1* (mutační hotspot). Nalezli jsme heterozygotní variantu c.2608G>A (p.Gly870Ser), znázorněna na Obrázku 18. Byla již publikována jako patogenní. Je *de novo*, oba zdraví rodiče nesou wild type alelu. Mateřství a otcovství bylo testováno u obou pacientů se sadou šesti mikrosatelitních markerů ze tří různých chromozomů.



**Obrázek 18: Mutace p.Gly870Ser v *SETBP1* genu**

Heterozygotní varianta p.Gly870Ser byla nalezena u dvou nepříbuzných thajských pacientů splňujících kritéria SGS (Lehman et al. 2008; Suphapeetiporn et al. 2011). Stejná mutace byla nalezena i u dívky s SGS, která zemřela v 9 letech (Hoischen et al. 2010). Záměna G-A postihuje vysoce konzervovaný nukleotid a vysoce konzervovaný aminokyselinový zbytek v SKI homologní oblasti *SETBP1* genu (Herenger et al. 2015). Je *de novo*, oba zdraví rodiče nesou wild type alelu. Mateřství a otcovství bylo testováno u obou pacientů se sadou šesti mikrosatelitních markerů ze tří různých chromozomů. Hypotéza, že haploinsuficience nebo „loss-of-function“ varianty v *SETBP1* mají mírnější fenotyp, byla též publikována (Filges et al. 2011).

Druhá varianta p.Ser867Arg (podobná substituce odlišující se jenom v záměně bazí C na A, bez změny aminokyselinové substituce) již byla popsána jako příčina syndromu Schinzel-Giedion u pacienta s velmi podobným fenotypem (Carvalho et al. 2015) a proto je vysoce pravděpodobné, že tato varianta je patogenní. Taktéž predikční programy ji hodnotí jako deleterious a disease causing. Mutace je pravděpodobně *de novo*, nenalezli jsme jí u zdravých rodičů.

Mutační hotspot, umístěný v exonu 4 genu *SETBP1*, kde jsou mutace shromážděné, je vysoce konzervovaný mezi různými druhy. Detekce variant v exonu 4 genu *SETBP1* u obou českých SGS pacientů podporují fakt, že exon 4 představuje mutace horkého místa genu *SETBP1*.

*SETBP1* mutace zabraňují ubikvitinaci a ovlivňují stabilitu SETBP1 proteinu, zatímco varianty mimo degron mohou způsobit různé formy SGS s mírnějším fenotypem.

Nálezem mutací p.Gly870Ser a p.Ser867Arg popisujeme první molekulárně-geneticky potvrzené pacienty s SGS v ČR. Náš první pacient (20letý) je zatím nejstarší popsáný

v literatuře, pacienti se v důsledku závažných zdravotních komplikací nedožívají tak vysokého věku.

Publikováno v článku:

**Neupauerová J, Štěrbová K, Komárek V, Gregořová A, Vlčková M, Staněk D, Seeman P, Laššuthová P, Havlovicová M. Schinzel—Giedion Syndrome: First Czech Patients Confirmed by Molecular Genetic Analysis.** Journal of Pediatric Neurology, 2018

Plný text článku je v příloze č. 1

Rozlišitelná diagnostická kritéria jsou:

- faciální dysmorfismus
- makroglosie
- hypertelorismus
- hirsutismus
- exoftalmus
- epileptické záchvaty
- vrozené anomálie

### 2.3.2 *CDKL5* gen

Varianty v X-vázaném *CDKL5* genu (v minulosti zvaném *serine/threonine kináza 9* = *STK9*) byly popsány jako příčina časně epileptické encefalopatie typu 2 (EIEE2) a vyskytují se exkluzivně *de novo*. EIEE2 je charakterizována časným nástupem epilepsie (před 3. měsícem věku), generalizovanými tonickými záchvaty, těžkou hypotonií, poruchou zraku, absencí řeči a závažnou intelektuální nedostatečností (Bahi-Buisson et al. 2008; Fehr et al. 2013). *CDKL5*-encefalopatie je X-vázaným dominantním onemocněním. Klinická závažnost *CDKL5* onemocnění pro obě pohlaví je stejná (Liang et al. 2011). *CDKL5* gen je lokalizován na chromozomu Xp22.13 a zahrnuje 21 exonů. Je to protein exprimovaný ve všech tkáních (Lin et al. 2005; Rusconi et al. 2008).

V *CDKL5* jsme našli 3 zajímavé varianty, kterými jsme objasnili příčinu onemocnění u pacientů.

#### Pacient 1

Pacientkou je 5letá dívka s farmakorezistentní epilepsií, ve věku 6 týdnů u ní byly pozorovány bilaterálně tonické záchvaty. Ve věku 3 let záchvaty na rok vymizely beze změny medikace. Záchvaty se znovu objevily ve věku 4 let. Ketogenní dieta měla uspokojivé výsledky, ale dívka zůstala hypotonická, s absencí řeči, se závažnou intelektuální nedostatečností a motorickým opožděním.

MPS identifikovalo intronovou variantu v intronu 7 *CDKL5* NM\_003159.2(*CDKL5*):c.463+5G>A v heterozygotním stavu. Varianta nebyla nalezena u asymptomatických rodičů. Na agarovém gelu v porovnání s kontrolním vzorkem, při PCR produktu cDNA našeho pacienta byly pozorovány 2 fragmenty (lišící se o 60 nukleotidů, odpovídá to exon skippingu exonu 7) v důsledku formace kratšího aberantního transkriptu. Předpokládali jsme vznik předčasného stop kodonu. Vyšetření

na RNA úrovni prokázalo aberantní sestřih mRNA s vynecháním exonu 7 – exon skipping a vznik proteinu kratšího o 20 aminokyselin. Heterozygotní variantu c.463+5G>A podle ACMG kritérií považujeme za pravděpodobně patogenní.

## Pacient 2

Pacient je 4letý chlapec s farmakorezistentní epilepsií od 4 týdnů věku, sporadický případ v rodině, od počátku opožděn psychomotorický vývoj, oční kontakt špatný, stáčení očních bulbů, za zvukem se neotočí, vokalizuje, po operaci pro Fallotovu tetralogii v 1 roce. Rozvinuly se u něj myoklonické a tonické záchvaty rezistentní vůči léčbě. Ketogenní dieta od dvou do tří let zredukovala časnost záchvatů jenom na pár měsíců. V současnosti se záchvaty opakují přibližně v 3 sériích 20krát za den. Pacient není schopen samostatného sezení, má špatný zrakový kontakt, neotočí se za zvukem, neusmívá se, nemá zájem o hračky.

Před vyšetřením na panel genů byl pacient na jiném pracovišti na Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FNM podroben array-CGH analýze a vyšetření syndromu Di-George s negativním výsledkem.

Zařazením pacienta na panel 112 genů jsme našli nonsense variantu v NM\_003159.2(CDKL5):c.2578C>T (p.Gln860\*) v hemizygotním stavu v exonu 18. Hemizygotní variantu p.Gln860\* považujeme dle ACMG kritérií (Richards et al. 2015) za patogenní. Čtecí rámec je přerušen vytvořením předčasného stop kodonu, který má závažný efekt na funkci proteinu. Varianta je *de novo*, nenalezli jsme ji u zdravých rodičů. Nebyla ještě popsána, není v HGMD databázi, exAC ani EVS.

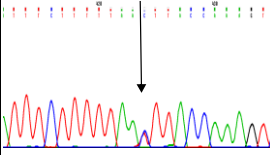
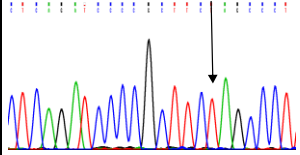
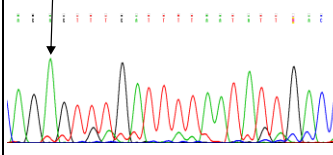


### Pacient 3

Pacient je 3letý chlapec, do 8. měsíců věku zdravý, záchvaty se rozvinuly jako spasmy v sériích, tonické, rezistentní na antiepileptickou léčbu, pacient je hypotonický, má problémy s chůzí, špatný oční kontakt, absenci řeči a závažnou mentální retardaci.

MPS u pacienta prokázalo variantu NM\_003159.2(CDKL5):c.1247-1248del (p.Glu416Valfs\*2) v exonu 12 v heterozygotním stavu, kdy mutovaná alela je ve výrazně nižším zastoupení (cca 10 %), což svědčí nejspíše pro mosaicismus provedenou variantu. Tato varianta již byla popsána (Raymond et al. 2013), ale u dívky a ne v mosaicismu. U heterozygotní varianty p.Glu416Valfs\*2 jde o variantu predikující posun čtecího rámce se vznikem předčasného stop kodonu. Varianta nebyla prokázána u rodičů probanda, je tedy nejspíše *de novo* vzniklá pravděpodobně postzygoticky (mosaicismus). Také v DNA z bukálního stěru jsme našli variantu ve výrazně nižším zastoupení (cca 10-15 %), což svědčí pro somatický mosaicismus. Mosaicismus pro mutaci v *CDKL5* a jeho vliv na fenotyp již byl popsán (Mei et al. 2014), lze předpokládat patogenní a kauzální vliv na fenotyp podobný jako při běžné germinální mutaci.

Fenotypy pacientů jsou shrnuty v Tabulce 12.

	Pacientka 1 (5-letá holčička)	Pacient 2 (4-letý chlapeček)	Pacient 3 (3-letý chlapeček)
Nástup záchvatů	6. týden	4. týden	8. měsíc
Záchvaty	bilaterálně klonické	tonické (2-3 v serii), méně myoklonické	krátké tonické
Farmakorezistentní záchvaty	ano	ano	ano
Psychomotorický vývoj	závažná mentální retardace	opožděný	závažná mentální retardace
Hypotonie	přítomná	přítomná	přítomná
Oční kontakt	špatný	špatný	špatný
Řeč	absence	absence	absence
Chůze	ataktická chůze	neschopný chůze	problémy s chůzí
Cytogenetické vyšetření	bez nálezů kauzální varianty	bez nálezů kauzální varianty	neprovedeno
Varianta nalezena MPS sekvenováním	Intron 7: c.463+5G>A	Exon 18: p.Gln860* (c.*2578C>T)	Ex 12: p.Glu416Valfs*2(c.1247_1248del) v mosaicismu
Ověření Sangerovým sekvenováním			
Segregace v rodině	de novo	de novo	de novo
Patogenicita podle ACMG kritérií	pravděpodobně patogenní	patogenní	patogenní
Predikce	aberrantní splicing	vznik předčasného stop-kodónu	vznik předčasného stop-kodónu

**Tabulka 12: Fenotypy pacientů s *CDKL5* mutacemi**

Závěrem se jedná pravděpodobně o první 3 případy kauzálních variant v *CDKL5* genu u českých pacientů. Všichni naši pacienti mají klinické projevy podobné jako jiní doposud popsání pacienti s mutacemi v *CDKL5* (Fehr et al. 2013). Mutace v *CDKL5* jsou významnou příčinou časně a hlavně těžké farmakorezistentní epilepsie. Kauzální varianty v *CDKL5* genu jsou 4. nejčastější příčinou epilepsie u našich pacientů (u 3 ze 152 vyšetřených).

Publikováno v článku:

Neupauerova J, Sterbova K, Vlckova M, Sebronova Vera, Marikova T, Krutova M, Stanek D, Krsek P, Zaliova Marketa, Seeman P, Lassuthova P. **Two Novel Variants Affecting *CDKL5* Transcript Associated with Epileptic Encephalopathy**; Genet Test Mol Biomarkers; 2017, 21(10): 613-618

Plný text článku je v příloze č. 3.

Rozlišovací diagnostická kritéria jsou:

- časný nástup onemocnění s rezistencí na antiepileptickou léčbu

- hypotonie
- psychomotorické opožďení
- absence řeči a poruchy vidění

### **3 Seznam vybraných prací přiložených v plném rozsahu (seznam příloh):**

Neupauerová J, Štěrbová K, Komárek V, Gřegořová A, Vlčková M, Staněk D, Seeman P, Laššuthová P, Havlovicová M. Schinzel—Giedion Syndrome: First Czech Patients Confirmed by Molecular Genetic Analysis. *Journal of Pediatric Neurology*, 2018

Neupauerova J, Sterbova K, Vlckova M, Sebronova Vera, Marikova T, Krutova M, Stanek D, Krsek P, Zaliova Marketa, Seeman P, Lassuthova P. Two Novel Variants Affecting *CDKL5* Transcript Associated with Epileptic Encephalopathy; *Genet Test Mol Biomarkers*; 2017, 21(10): 613-618

Neupauerova J, Grecmalova D, Seeman P, Lassuthova P. Massively Parallel Sequencing Detected a Mutation in the *MFN2* Gene Missed by Sanger Sequencing Due to a Primer Mismatch on an SNP Site. *Ann Hum Genet.* 2016 May;80(3):182-6.

## **Použitá literatura**

AGHBOLAGHI, A. G. AND M. LEHPAMMER. A rare case of centronuclear myopathy with DNMT2 mutation: genotype-phenotype correlation. *Autops Case Rep*, Apr-Jun 2017, 7(2), 43-48.

AL-MUDAFFER, M., C. OLEY, S. PRICE, I. HAYES, et al. Clinical and radiological findings in Schinzel-Giedion syndrome. *European Journal of Pediatrics*, Dec 2008, 167(12), 1399-1407.

ALBULYM, O. M., M. L. KENNERSON, M. B. HARMS, A. P. DREW, et al. MORC2 mutations cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease with pyramidal signs. *Ann Neurol*, Mar 2016, 79(3), 419-427.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, Apr 2009, 25(4), 195-203.

ANTONELLIS, A., R. E. ELLSWORTH, N. SAMBUUGHIN, I. PULS, et al. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *American Journal of Human Genetics*, May 2003, 72(5), 1293-1299.

ANTONELLIS, A. AND E. D. GREEN The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2008, 9, 87-107.

AOKI, M. et al. Mild ALS in Japan associated with novel SOD mutation. *Nat Genet*, 1993, 5, 323-324.

AUER-GRUMBACH, M., A. OLSCHESKI, L. PAPIC, H. KREMER, et al. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nature genetics*, Feb 2010, 42(2), 160-164.

BAHI-BUISSON, N., A. KAMINSKA, N. BODDAERT, M. RIO, et al. The three stages of epilepsy in patients with CDKL5 mutations. *Epilepsia*, Jun 2008, 49(6), 1027-1037.

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

BENTLEY, D. R., S. BALASUBRAMANIAN, H. P. SWERDLOW, G. P. SMITH, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, Nov 6 2008, 456(7218), 53-59.

BERGER, P., P. YOUNG AND U. SUTER Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics*, Mar 2002, 4(1), 1-15.

BIRD, T.D. et al. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview.

BITOUN, M., S. MAUGENRE, P. Y. JEANNET, E. LACENE, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature Genetics*, Nov 2005, 37(11), 1207-1209.

BOHM, J., V. BIANCALANA, E. T. DECHENE, M. BITOUN, et al. Mutation Spectrum in the Large GTPase Dynamin 2, and Genotype-Phenotype Correlation in Autosomal Dominant Centronuclear Myopathy. *Human Mutation*, Jun 2012, 33(6), 949-959.

BRAATHEN, G. J. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, Nov 2012, 126.

BROCKMANN, K., S. DREHA-KULACZEWSKI, P. DECHENT, C. BONNEMANN, et al. Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *J Neurol*, Jul 2008, 255(7), 1049-1058.

BROZKOVA, D. S., J. POSADKA, P. LASSUTHOVA, R. MAZANEC, et al. Spectrum and frequencies of mutations in the MFN2 gene and its phenotypical expression in Czech hereditary motor and sensory neuropathy type II patients. *Molecular Medicine Reports*, Dec 2013a, 8(6), 1779-1784.

CADER, M. Z., J. S. REN, P. A. JAMES, L. E. BIRD, et al. Crystal structure of human wildtype and S581L-mutant glycyl-tRNA synthetase, an enzyme underlying distal spinal muscular atrophy. *Febs Letters*, Jun 26 2007, 581(16), 2959-2964.

CARTONI, R. AND J. C. MARTINO Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol*, Aug 2009, 218(2), 268-273.

CARVALHO, E., R. HONJO, M. MAGALHAES, G. YAMAMOTO, et al. Schinzel-Giedion syndrome in two Brazilian patients: Report of a novel mutation in SETBP1 and literature review of the clinical features. *Am J Med Genet A*, May 2015a, 167A(5), 1039-1046.

CASASNOVAS, C., I. BANCHS, J. CASSEREAU, N. GUEGUEN, et al. Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *Journal of Medical Genetics*, Apr 2010, 47(4), 249-256.

CATTERUCCIA, M., F. FATTORI, V. CODEMO, L. RUGGIERO, et al. Centronuclear myopathy related to dynamin 2 mutations: Clinical, morphological, muscle imaging and genetic features of an Italian cohort. *Neuromuscular Disorders*, Mar 2013, 23(3), 229-238.

COLLIE, A. M. B., M. L. LANDSVERK, E. RUZZO, H. C. MEFFORD, et al. Non-recurrent SEPT9 duplications cause hereditary neuralgic amyotrophy. *Journal of Medical Genetics*, Sep 2010, 47(9), 601-607.

COWLING, B. S., A. TOUSSAINT, L. AMOASII, P. KOEBEL, et al. Increased Expression of Wild-Type or a Centronuclear Myopathy Mutant of Dynamin 2 in Skeletal Muscle of Adult Mice Leads to Structural Defects and Muscle Weakness. *American Journal of Pathology*, May 2011, 178(5), 2224-2235.

DELARUE, M. Aminoacyl-Transfer-Rna Synthetases. *Current Opinion in Structural Biology*, Feb 1995, 5(1), 48-55.

DENG, H. X., C. J. KLEIN, J. YAN, Y. SHI, et al. Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nature genetics*, Feb 2010, 42(2), 165-169.

DOUSE, C.H. et al. Neuropathic MORC2 mutations perturb GHKL ATPase dimerization dynamics and epigenetic silencing by multiple structural mechanisms. *Nat Commun.*, 2018, 9(1), 651.

DURIEUX, A. C., A. VIGNAUD, B. PRUDHON, M. T. VIOU, et al. A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Human Molecular Genetics*, Dec 15 2010, 19(24), 4820-4836.



DYCK, P.J. Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory and autonomic neurons. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (eds). *Peripheral Neuropathy*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1993, 1065–1093.

DYCK, P. J. AND E. H. LAMBERT Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases with Peroneal Muscular Atrophy .2. Neurologic Genetic and Electrophysiologic Findings in Various Neuronal Degenerations. *Archives of Neurology*, 1968, 18(6), 619-625.

DYMENT, D. A., M. TETREAULT, C. L. BEAULIEU, T. HARTLEY, et al. Whole-exome sequencing broadens the phenotypic spectrum of rare pediatric epilepsy: a retrospective study. *Clinical Genetics*, Jul 2015, 88(1), 34-40.

ECHANIZ-LAGUNA, A., A. S. NICOT, S. CARRE, J. FRANQUES, et al. Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel dynamin 2 gene mutation. *Neuromuscular Disorders*, Dec 2007, 17(11-12), 955-959.

ENGEL, J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, Jun 2001, 42(6), 796-803.

ENGELFRIED, K. et al. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A: novel mutations in the mitofusin 2 gene (MFN2). *BMC Med Genet.*, 2006, 7(1), 53.

EVERAERTS, W., B. NILIUS AND G. OWSIANIK The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Progress in biophysics and molecular biology*, Sep 2010, 103(1), 2-17.

EWING, B., L. HILLIER, M. C. WENDL AND P. GREEN Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, Mar 1998, 8(3), 175-185.

FEELY, S. M., M. LAURA, C. E. SISKIND, S. SOTTILE, et al. MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology*, May 17 2011, 76(20), 1690-1696.

FEHR, S., M. WILSON, J. DOWNS, S. WILLIAMS, et al. The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *European Journal of Human Genetics*, Mar 2013, 21(3), 266-273.

FIEST, K. M., K. M. SAURO, S. WIEBE, S. B. PATTEN, et al. Prevalence and incidence of epilepsy A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, Jan 17 2017, 88(3), 296-303.

FILGES, I., K. SHIMOJIMA, N. OKAMOTO, B. ROTH LISBERGER, et al. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *Journal of Medical Genetics*, Feb 2011, 48(2), 117-122.

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLU, A. BOGACZ, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, Apr 2014, 55(4), 475-482.

FRIDMAN, V., B. BUNDY, M. M. REILLY, D. PAREYSON, et al. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, Aug 2015, 86(8), 873-878.

FUJISAWA, T., K. HOMMA, N. YAMAGUCHI, H. KADOWAKI, et al. A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. *Annals of Neurology*, Nov 2012, 72(5), 739-749.

GE, Q., E. P. TRIEU AND I. N. TARGOFF Primary Structure and Functional Expression of Human Glycyl-Transfer-Rna Synthetase, an Autoantigen in Myositis. *Journal of Biological Chemistry*, Nov 18 1994, 269(46), 28790-28797.

GRADA, A. AND K. WEINBRECHT Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology*, Aug 2013, 133(8), E1-E4.

GROS-LOUIS, F., C. GASPAR AND G. A. ROULEAU Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, Nov-Dec 2006, 1762(11-12), 956-972.

HABERLOVA, J. AND P. SEEMAN Utility of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score in children with type 1A disease. *Pediatr Neurol*, Dec 2010, 43(6), 407-410.

HABERLOVÁ, J. et al. Phenotypic variability in a large Czech family with a dynamin 2-associated Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J.Neurogenetics*, 25(4), 182-188.

HADANO, S., C. K. HAND, H. OSUGA, Y. YANAGISAWA, et al. A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nature Genetics*, Oct 2001, 29(2), 166-173.

HANISCH, F., T. MULLER, A. DIETZ, M. BITOUN, et al. Phenotype variability and histopathological findings in centronuclear myopathy due to DNM2 mutations. *Journal of Neurology*, Jun 2011, 258(6), 1085-1090.

HARDING, A. E. AND P. K. THOMAS The Clinical-Features of Hereditary Motor and Sensory Neuropathy Type-I and Type-II. *Brain*, 1980a, 103(Jun), 259-280.

HARDING, A. E. AND P. K. THOMAS Genetic-Aspects of Hereditary Motor and Sensory Neuropathy (Type-I and Type-2). *Journal of Medical Genetics*, 1980b, 17(5), 329-336.

HELBIG, K. L., K. D. F. HAGMAN, D. N. SHINDE, C. MROSKE, et al. Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genetics in Medicine*, Sep 2016, 18(9), 898-905.

HERENGER, Y., C. STOETZEL, E. SCHAEFER, S. SCHEIDECKER, et al. Long term follow up of two independent patients with Schinzel-Giedion carrying SETBP1 mutations. *European Journal of Medical Genetics*, Sep 2015, 58(9), 479-487.

HOISCHEN, A., B. W. M. VAN BON, C. GILISSEN, P. ARTS, et al. De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nature Genetics*, Jun 2010, 42(6), 483-485.

HOUGE, G., D. HAESSEN, L. E. L. M. VISSERS, S. MEHTA, et al. B56 delta-related protein phosphatase 2A dysfunction identified in patients with intellectual disability. *Journal of Clinical Investigation*, Aug 2015, 125(8), 3051-3062.

HOYER, H., G. J. BRAATHEN, O. L. BUSK, O. L. HOLLA, et al. Genetic Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease in a Population by Next-Generation Sequencing. *Biomed Research International*, 2014.

CHAMBERS, C., L. A. JANSEN AND R. DHAMIJA Review of Commercially Available Epilepsy Genetic Panels. *Journal of Genetic Counseling*, Apr 2016, 25(2), 213-217.

CHARCOT, J.M. and Marie, P. "Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains". *Revue de médecine*, 1886, 6, 97-138.

INADA, H., E. PROCKO, M. SOTOMAYOR AND R. GAUDET Structural and Biochemical Consequences of Disease-Causing Mutations in the Ankyrin Repeat Domain of the Human TRPV4 Channel. *Biochemistry*, Aug 7 2012, 51(31), 6195-6206.

JAMES, P. A., M. Z. CADER, F. MUNTONI, A. M. CHILDS, et al. Severe childhood SMA and axonal CMT due to anticodon binding domain mutations in the GARS gene. *Neurology*, Nov 14 2006, 67(9), 1710-1712.

JAMES, P. A. AND K. TALBOT The molecular genetics of non-ALS motor neuron diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, Nov-Dec 2006, 1762(11-12), 986-1000.

KIJIMA, K., C. NUMAKURA, H. IZUMINO, K. UMETSU, et al. Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Human Genetics*, Jan 2005, 116(1-2), 23-27.

KONG, A., M. L. FRIGGE, G. MASSON, S. BESENBACHER, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, Aug 23 2012, 488(7412), 471-475.

KOZLOV, M. M. Dynamin: Possible mechanism of "pinchase" action. *Biophysical Journal*, Jul 1999, 77(1), 604-616.

KRISTL, G.C. et al. Phenotypic spectrum of dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain*, 2009, 132(7), 1741-1752.

KUHLENBAUMER, G., M. C. HANNIBAL, E. NELIS, A. SCHIRMACHER, et al. Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. *Nature Genetics*, Oct 2005, 37(10), 1044-1046.

KUMARASWAMY, S et al. Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain*, 2005, 128, 2304–2314

KURLAND, L. T. AND D. W. MULDER Epidemiologic Investigations of Amyotrophic Lateral Sclerosis .2. Familial Aggregations Indicative of Dominant Inheritance .1. *Neurology*, 1955, 5(3), 182-196.

LANDOURE, G., J. M. SULLIVAN, J. O. JOHNSON, C. H. MUNNS, et al. Exome sequencing identifies a novel TRPV4 mutation in a CMT2C family. *Neurology*, Jul 10 2012, 79(2), 192-194.

LANDOURE, G., A. A. ZDEBIK, T. L. MARTINEZ, B. G. BURNETT, et al. Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nature genetics*, Feb 2010, 42(2), 170-174.

LANDSVERK, M. L., E. K. RUZZO, H. C. MEFFORD, K. BUYSSE, et al. Duplication within the SEPT9 gene associated with a founder effect in North American families with hereditary neuralgic amyotrophy. *Human Molecular Genetics*, Apr 1 2009, 18(7), 1200-1208.

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

LAURA, M., M. MILANI, M. MORBIN, M. MOGGIO, et al. Rapid progression of late onset axonal Charcot-Marie-Tooth disease associated with a novel MPZ mutation in the extracellular domain. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, Nov 2007, 78(11), 1263-1266.

LAWSON, V. H., B. V. GRAHAM AND K. M. FLANIGAN Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology*, Jul 26 2005, 65(2), 197-204.

LEHMAN, A. M., D. MCFADDEN, D. PUGASH, K. SANGHA, et al. Schinzel-Giedion syndrome: Report of splenopancreatic fusion and proposed diagnostic criteria. *American Journal of Medical Genetics Part A*, May 15 2008, 146a(10), 1299-1306.

LIANG, J. S., K. SHIMOJIMA, R. TAKAYAMA, J. NATSUME, et al. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia*, Oct 2011, 52(10), 1835-1842.

LIN, C., B. FRANCO AND M. R. ROSNER CDKL5/Stk9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. *Human Molecular Genetics*, Dec 15 2005, 14(24), 3775-3786.

LIYANAGE, V. R. B. AND M. RASTEGAR Rett Syndrome and MeCP2. *Neuromolecular Medicine*, Jun 2014, 16(2), 231-264.

MAGY, L., S. MATHIS, G. LE MASSON, C. GOIZET, et al. Updating the classification of inherited neuropathies: Results of an international survey. *Neurology*, Mar 6 2018, 90(10), E870-E876.

MARDIS, E.R. ChiP-seq: welcome to the new frontier. *Nature Methods*, 2007, 4(8), 613-614.

MARINI, C., I. E. SCHEFFER, R. NABBOUT, A. SULS, et al. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia*, Apr 2011, 52, 24-29.

MARTIN, H. C., G. E. KIM, A. T. PAGNAMENTA, Y. MURAKAMI, et al. Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. *Hum Mol Genet*, Jun 15 2014, 23(12), 3200-3211.

MAZANEC, R. et al. Hereditární motorické neuropatie. *Neurol.praxi*, 2016, 17(6): 354-358

MCENTAGART, M. TRPV4 axonal neuropathy spectrum disorder. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, Jul 2012, 19(7), 927-933.

MEI, D., F. DARRA, C. BARBA, C. MARINI, et al. Optimizing the molecular diagnosis of CDKL5 gene-related epileptic encephalopathy in boys. *Epilepsia*, Nov 2014, 55(11), 1748-1753.

MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S., J. PATEL, D. CORDEIRO, S. HEWSON, et al. Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia*, May 2015, 56(5), 707-716.



MESTAN, K. K., L. ILKHANOFF, S. MOULI AND S. LIN Genomic sequencing in clinical trials. *Journal of Translational Medicine*, Dec 30 2011, 9.

MEYER ZU HORSTE, G., NAVE, K.A. Animal models of inherited neuropathies. *Curr Opin.Neurol.*, Oct 2006, 19(5), 464-473.

MORI-YOSHIMURA, M., A. OKUMA, Y. OYA, C. FUJIMURA-KIYONO, et al. Clinicopathological features of centronuclear myopathy in Japanese populations harboring mutations in dynamin 2. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, Jul 2012, 114(6), 678-683.

MOSHE, S.L. et al. Epilepsy: new advances. *Lancet*, Mar 2015, 385(9971), 884-898.

MOTLEY, W.W. et al. GARS axonopathy: not every neuron's cup of tRNA. *Trends in Neurosciences*, February 2010, 33(2), 59-66.

MULLEY, J. C., P. NELSON, S. GUERRERO, L. DIBBENS, et al. A new molecular mechanism for severe myoclonic epilepsy of infancy: Exonic deletions in SCN1A. *Neurology*, Sep 26 2006, 67(6), 1094-1095.

MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, et al. Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986, 51, 263-273.

MURPHY, S. M., M. LAURA, K. FAWCETT, A. PANDRAUD, et al. Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, Jul 2012, 83(7), 706-710.

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

NICHOLSON, G. A., J. L. DAWKINS, I. P. BLAIR, M. L. KENNERSON, et al. The gene for hereditary sensory neuropathy type I (HSN-I) maps to chromosome 9q22.1-q22.3. *Nature Genetics*, May 1996, 13(1), 101-104.

NILIUS, B. AND T. VOETS The puzzle of TRPV4 channelopathies. *Embo Reports*, Feb 2013, 14(2), 152-163.

OSTERN, R., T. FAGERHEIM, K. ORSTAVIK, T. HOLMOY, et al. Hereditary motor neuron disease in a large Norwegian family with a "H46R" substitution in the superoxide dismutase 1 gene. *Neuromuscular Disorders*, Jun 2012, 22(6), 511-521.

OTTMAN, R., S. HIROSE, S. JAIN, H. LERCHE, et al. Genetic testing in the epilepsies-Report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*, Apr 2010, 51(4), 655-670.

PAASSEN, B.W. et al. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Orphanet J. Rare Dis.*, Mar 2014, 9, 38.

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

PIERSON, C. R., K. TOMCZAK, P. AGRAWAL, B. MOGHADASZADEH, et al. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Jul 2005, 64(7), 555-564.

RABBANI, B., M. TEKIN AND N. MAHDIEH The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of Human Genetics*, Jan 2014, 59(1), 5-15.

RAYMOND, L., B. DIEBOLD, C. LEROUX, H. MAUREY, et al. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the CDKL5 gene: Identification of novel mutations. *Gene*, Jan 1 2013, 512(1), 70-75.

REILLY, M. M., S. M. MURPHY AND M. LAURA Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System*, Mar 2011, 16(1), 1-14.

RICHARDS, et al. 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*. May 2015, 17(5), 405-424.

ROSEN, D. R. Mutations in Cu/Zn Superoxide-Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic-Lateral-Sclerosis (Vol 362, Pg 59, 1993). *Nature*, Jul 22 1993, 364(6435), 362-362.

ROSSOR, A. M., B. KALMAR, L. GREENSMITH AND M. M. REILLY The distal hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Jan 2012, 83(1), 6-14.

RUSCONI, L., L. SALVATONI, L. GIUDICI, I. BERTANI, et al. CDKL5 Expression Is Modulated during Neuronal Development and Its Subcellular Distribution Is Tightly Regulated by the C-terminal Tail. *Journal of Biological Chemistry*, Oct 31 2008, 283(44), 30101-30111.

SANTEL, A. AND M. T. FULLER Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, Mar 2001, 114(5), 867-874.

SAPORTA, A. S. D., S. L. SOTTILE, L. J. MILLER, S. M. E. FEELY, et al. Charcot-Marie-Tooth Disease Subtypes and Genetic Testing Strategies. *Annals of Neurology*, Jan 2011, 69(1), 22-33.

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

SHANG, L. S., L. B. HENDERSON, M. T. CHO, D. S. PETREY, et al. De novo missense variants in PPP2R5D are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. *Neurogenetics*, Jan 2016, 17(1), 43-49.

SCHAFER, D. A., S. A. WEED, D. BINNS, A. V. KARGINOV, et al. Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Current Biology*, Oct 29 2002, 12(21), 1852-1857.

SCHEFFER, I.E., S. BERKOVIC, G.CAPOVILLA, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, Apr 2017, 58(4), 512-521.

SCHOUTEN, J. P., C. J. MCELGUNN, R. WAAIJER, D. ZWIJNENBURG, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*, Jun 15 2002, 30(12).

SIVERA, R., T. SEVILLA, J. J. VILCHEZ, D. MARTINEZ-RUBIO, et al. Charcot-Marie-Tooth disease Genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*, Oct 29 2013, 81(18), 1617-1625.

SKRE, H. Genetic and Clinical Aspects of Charcot-Marie-Tooths Disease. *Clinical Genetics*, 1974, 6(2), 98-118.

SLATKO, E. Barton, ALBRIGHT, M. Lisa, TABOR, Stanley a JU, Jingyue. *DNA Sequencing by the Dideoxy Method*. [online]. © 1. 5. 2001 [cit. 2018-10-15]. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0704as47>

STANĚK, D. et al. Detection rate of causal variants in severe childhood epilepsy is highest in patients with seizure onset within the first four weeks of life. *Orphanet J Rare Dis.*, May 2 2018, 13(1), 71.

STEINLEIN, O.K. Genetics and epilepsy. *Dialogues Clin Neurosci.* Mar 2008, 10(1), 29–38.

STUPPIA, G., F. RIZZO, G. RIBOLDI, R. DEL BO, et al. MFN2-related neuropathies: Clinical features, molecular pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Neurol Sci*, Sep 15 2015, 356(1-2), 7-18.

SUPHAPEETIPORN, K., C. SRICHOMTHONG AND V. SHOTELERSUK SETBP1 mutations in two Thai patients with Schinzel-Giedion syndrome. *Clinical Genetics*, Apr 2011, 79(4), 391-393.

SUSMAN, R. D., S. QUIJANO-ROY, N. YANG, R. WEBSTER, et al. Expanding the clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscular Disorders*, Apr 2010, 20(4), 229-237.

THOMPSON, H. M., H. CAO, J. CHEN, U. EUTENEUER, et al. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nature Cell Biology*, Apr 2004, 6(4), 335-342.

TOOTH, H.H. "The peroneal type of progressive muscular atrophy". *Annals of Surgery*, 1886, 7, 293.

VALLAT, J. M., D. GRID, C. MAGDELAINE, F. STURTZ, et al. [Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease]. *Bull Acad Natl Med*, Jan 2005, 189(1), 55-68; discussion 68-59.

VAN ALFEN, N., B. G. M. VAN ENGELEN, J. W. C. REINDERS, H. KREMER, et al. The natural history of hereditary neuralgic amyotrophy in the Dutch population - Two distinct types? *Brain*, Apr 2000, 123, 718-723.

VANCE, J. M. Hereditary Motor and Sensory Neuropathies. *Journal of Medical Genetics*, Jan 1991, 28(1), 1-5.

VAN DE WETERING, R.A., et al. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies with a small deletion interrupting the PMP22 gene. *Neuromuscul Disord*. Oct 2002;12(7-8), 651-655.

VERHOEVEN, K., K. G. CLAEYS, S. ZUCHNER, J. M. SCHRODER, et al. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain*, Aug 2006, 129, 2093-2102.

VOELKERDING, K.V. et al. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics, *Clin.Chem*. Apr 2009, 55(4), 641-658.

VOO, I., B. E. ALLF, N. UDAR, R. SILVA-GARCIA, et al. Hereditary motor and sensory neuropathy type VI with optic atrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, May 2003, 44, U114-U114.

VUCIC, S., M. KENNERSON, D. ZHU, E. MIEDEMA, et al. CMT with pyramidal features. *Neurology*, Feb 25 2003, 60(4), 696-699.

WHITE, R., G. HO, S. SCHMIDT, I. E. SCHEFFER, et al. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (CDKL5) Mutation Screening in Rett Syndrome and Related Disorders. *Twin Research and Human Genetics*, Apr 2010, 13(2), 168-178.

WILLIG, L. K., J. E. PETRIKIN, L. D. SMITH, C. J. SAUNDERS, et al. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *Lancet Respiratory Medicine*, May 2015, 3(5), 377-387.

YU, U. Y. AND J. H. AHN Phosphorylation on the PPP2R5D B regulatory subunit modulates the biochemical properties of protein phosphatase 2A. *Bmb Reports*, Apr 30 2010, 43(4), 263-267.

ZHAO, H., V. RACE, G. MATTHIJS, P. DE JONGHE, et al. Exome sequencing reveals HINT1 mutations as a cause of distal hereditary motor neuropathy. *European Journal of Human Genetics*, Jun 2014, 22(6), 847-850.

ZHU, D., M. L. KENNERSON, G. WALIZADA, S. ZUCHNER, et al. Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology*, Aug 9 2005, 65(3), 496-497.

ZUCHNER, S., P. DE JONGHE, A. JORDANOVA, K. G. CLAEYS, et al. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol*, Feb 2006, 59(2), 276-281.

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

ZUCHNER, S., M. NOUREDDINE, M. KENNERSON, K. VERHOEVEN, et al.  
Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant  
intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System*,  
Jul 2005, 10, 108-108.

ZUCHNER, S. AND J. M. VANCE Mechanisms of disease: a molecular genetic update  
on hereditary axonal neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol*, Jan 2006, 2(1), 45-53.



## **Internetové zdroje**

<http://denovogear.weebly.com/>

<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

<http://exac.broadinstitute.org/>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

<https://genome.ucsc.edu/>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

<http://www.interactive-biosoftware.com/>

[www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)

[www.mlpa.cz](http://www.mlpa.cz)

<http://www.mutationtaster.org/>

<http://sift.jcvi.org/>

## Seznam vybraných publikací autorky

### Prvoautorské

**Neupauerová J**, Štěrbová K, Komárek V, Gřegořová A, Vlčková M, Staněk D, Seeman P, Laššuthová P, Havlovicová M. Schinzel—Giedion Syndrome: First Czech Patients Confirmed by Molecular Genetic Analysis. *Journal of Pediatric Neurology*, 2018, IF: 2,398

**Neupauerova J**, Sterbova K, Vlckova M, Sebronova Vera, Marikova T, Krutova M, Stanek D, Krsek P, Zaliova Marketa, Seeman P, Lassuthova P. Two Novel Variants Affecting *CDKL5* Transcript Associated with Epileptic Encephalopathy; *Genet Test Mol Biomarkers*; 2017, 21(10): 613-618, IF: 1,181

**Neupauerova J**, Grecmalova D, Seeman P, Lassuthova P. Massively Parallel Sequencing Detected a Mutation in the *MFN2* Gene Missed by Sanger Sequencing Due to a Primer Mismatch on an SNP Site. *Ann Hum Genet.* 2016 May;80(3):182-6, IF: 1,659

### Spoluautorské

Staněk D, Laššuthová P, Štěrbová K, Vlčková M, **Neupauerová J**, Krůtová M, Seeman P. Detection rate of causal variants in severe childhood epilepsy is highest in patients with seizure onset within the first four weeks of life. *Orphanet J Rare Dis.* 2018 May 2;13(1):71.

Borgulová I, Soldatova I, Putzová M, Malíková M, **Neupauerová J**, Marková SP, Trková M, Seeman P. Genome-wide uniparental diploidy of all paternal chromosomes in an 11-year-old girl with deafness and without malignancy. *J Hum Genet.* 2018 Apr 10. doi: 10.1038/s10038-018-0444-9. [Epub ahead of print]

Štěrbová K, Vlčková M, Klement P, **Neupauerová J**, Staněk D, Zůnová H, Seeman P, Laššuthová P. Neonatal Onset of Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures Associated with a Novel GABRB3 Variant in Monozygotic Twins. *Neuropediatrics*. 2018 Jun;49(3):204-208.

Marková SP, Brožková DŠ, Laššuthová P, Mészárosová A, Krůtová M, **Neupauerová J**, Rašková D, Trková M, Staněk D, Seeman P. STRC Gene Mutations, Mainly Large Deletions, are a Very Important Cause of Early-Onset Hereditary Hearing Loss in the Czech Population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018 Feb;22(2):127-134

Reijnders MRF, Janowski R, Alvi M, Self JE, van Essen TJ, Vreeburg M, Rouhl RPW, Stevens SJC, Stegmann APA, Schieving J, Pfundt R, van Dijk K, Smeets E, Stumpel CTRM, Bok LA, Cobben JM, Engelen M, Mansour S, Whiteford M, Chandler KE, Douzgou S, Cooper NS, Tan EC, Foo R, Lai AHM, Rankin J, Green A, Lönnqvist T, Isohanni P, Williams S, Ruhoy I, Carvalho KS, Dowling JJ, Lev DL, Šterbová K, Laššuthová P, **Neupauerová J**, Waugh JL, Keros S, Clayton-Smith J, Smithson SF, Brunner HG, van Hoeckel C, Anderson M, Clowes VE, Siu VM, Ddd Study T, Selber P, Leventer RJ, Nellaker C, Niessing D, Hunt D, Baralle D. PURA syndrome: clinical delineation and genotype-phenotype study in 32 individuals with review of published literature. *J Med Genet*. 2018 Feb;55(2):104-113.

Štěrbová K, Laššuthová P, Perníková I, Beran M, **Neupauerová J**, Kršek P, Seeman P. KCNQ2 Mutation Explains the Etiology of Chloral Hydrate-Responsive Ohtahara Syndrome. *Pediatr Neurol*. 2017 Feb;67:e3-e4

## **Životopis**

Jméno a příjmení: Jana Neupauerová

Bydliště: Unhošťská 1630, 253 01 Hostivice

Datum narození: 29. 8.1982

### Vzdělání:

2013-dosud Univerzita Karlova, 2.LF, Praha, postgraduální studium, Obor:  
Molekulární a buněčná biologie, virologie, genetika

2016 Atestace v oboru klinická genetika - specialista bioanalytik pro klinickou  
genetiku

2001-2006 Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košicích – obor biochemie, titul:  
RNDr.

1997-2001 Gymnázium sv. Tomáše Akvinského Košice

### Zaměstnání:

2018- ÚHKT, Praha

2007-2017 DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie 2. LF UK a FN Motol

2006-2007 Farmaceutická firma IMUNA PHARM, a.s Šarišské Michaľany,

Slovenská republika

### Jazykové znalosti:

Angličtina pokročilá

Italština pokročilá

Granty:

Hlavní řešitelka studentského projektu GA UK 438216 (2016-2017): Hledání kauzálních de novo variant pomocí celoxomového a celogenomového sekvenování u pacientů s těžkou epilepsií a epileptickou encefalopatií.