

## **Dizertační práce**

RNDr. Anna Uhrová Mészárosová

### **Využití masivně paralelního sekvenování nové generace pro diagnostiku hereditární spastické paraparézy**

Příspěvek k rozvoji DNA diagnostiky vysoce heterogenního onemocnění

Školitel: prof. MUDr. Pavel Seeman, Ph.D.

Konzultantka: MUDr. Dana Šafka Brožková, Ph.D.

Praha, 2018

## **Souhrn**

Předkládaná dizertační práce zpracovává výsledky molekulárně genetických vyšetření českých pacientů onemocněním hereditární spastická paraplegie a mapováním genetického pozadí této nemoci u českých pacientů.

Hereditární spastická (HSP) je dědičné neurologické onemocnění se všemi typy mendelovské dědičnosti, které se projevuje bilaterální progresivní spasticitou a slabostí dolních končetin a vede k postupně se zhoršující chůzi, u některých pacientů může dojít až k úplné ztrátě schopnosti samostatné chůze. HSP je onemocnění velice heterogenní jak klinicky, tak geneticky. Bylo popsáno přes 90 typů nemoci a přes 70 genů, jejichž patogenní varianty mohou způsobovat tuto nemoc. Onemocnění se většinou projevuje jako tzv. nekomplikovaný typ nemoci, vyskytují se ale i formy komplikované s přidruženými příznaky (mentální retardace, epilepsie, ataxie, atrofie optického nervu, aj.)

U souboru 96 českých pacientů s klinickým podezřením na nekomplikovanou HSP, u nichž byl předem vyloučen nejčastější typ nemoci SPG4, bylo provedeno masivně paralelní sekvenování panelu genů spojených a popsáných s nekomplikovanou HSP. Za použití kitu HaloPlex Target Enrichment nebo SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies, US) s vlastními navrženými probami byl sekvenovány všechny kódující oblasti plus přilehlé intronové oblasti vybraných genů a to ve 3 verzích panelu, vždy aktualizovaných o nově popsané geny. U čtyř pacientů bylo provedeno celoexomové sekvenování (WES) pomocí kitu SureSelect All Exon Kit v6 (Agilent Technologies, US). Nalezené varianty byly ověřeny

Sangerovým sekvenováním a jejich patogenita/kausalita byla hodnocena in silico a tam, kde to bylo možné, pomocí segregáční analýzy v rodině.

Z 96 pacientů vyšetřených pomocí NGS sekvenování panelu genů byla kauzální varianta nalezena u 22 pacientů, což představuje objasněnost 23 % (22 z 96). Ve skupině familiárních pacientů byla objasněnost vyšší 29,4 % (15 z 51) než ve skupině sporadických pacientů s objasněností u 15,5 % (7 ze 45). Ze čtyř pacientů vyšetřených pomocí WES byli objasněni dva. Celkem jsme pomocí MPS / NGS technik diagnostikovali a objasnili 10 různých typů HSP mezi českými non-SPG4 pacienty (SPG4, SPG5, SPG6, SPG7, SPG10, SPG11, SPG31, PSG35, SPG77 a IAHSB, nebyl diagnostikován ani jeden pacient s SPG3). Nejčastější typ je SPG31 s kauzálními variantami v genu *REEP1*, tento typ je též nejčastější i mezi autozomálně dominantně děděnými typy HSP. Mezi autozomálně recesivními typy je nejčastější SPG11 (s mírnou převahou) a SPG7. Mezi českými pacienty jsme zjistili velmi nízký výskyt SPG3 (kauzální varianty v genu *ATLI*), který byl uváděn jako druhý nejčastější typ nemoci a nejčastější u pacientů s časným nástupem nemoci. Ve skupině vyšetřených pacientů byly nalezeny i vzácné typy nemoci: SPG35 (gen *FA2H*) a zejména SPG77 (gen *FARS2*), kdy je český pacient teprve třetí celosvětově s tímto typem nemoci. Bylo nalezeno 12 nových variant v celkem 6 genech, nejvíce nových variant je v genu *REEP1*.

Spojením a sumarizací těchto výsledků se souborem již dříve objasněných SPG4 a SPG3 pacientů jsme zjistili celkové genetické spektrum HSP u českých pacientů. V české populaci tak bylo prozatím nalezeno 11 typů HSP (10 typů z NGS plus SPG3 z předchozích vyšetření) s převahou SPG4 u téměř 70 % objasněných pacientů. Častěji se dále vyskytují typy SPG31, SPG11, SPG7 a SPG10 u 8,3 %, 6,0 %, 4,8 % a 3,6 % objasněných pacientů. Tyto výsledky ukazují a potvrzují, že vyšetření jednoho samostatného genu, kromě *SPAST* (pro SPG4) (ani *ATLI* pro SPG3) není příliš efektivní a je vhodné po vyšetření SPG4 pokračovat v indikovaných případech vyšetřením panelu genu pomocí MPS/NGS. Malá velikost genu *REEP1* (jen 6 exonů) může být důvodem k vyšetření u vybraných pacientů místo dosud často indikovaného genu *ATLI* (13 exonů) s mnohem menší šancí na objasnění.

Tato dizertační práce představuje první publikované podrobné výsledky o epidemiologii HSP a genetickém pozadí této nemoci v ČR a jde tedy o unikátní data.