

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



RNDr. Anna Uhrová Mészárosová

Využití masivně paralelního sekvenování nové generace pro diagnostiku hereditární spastické paraparézy

Příspěvek k rozvoji DNA diagnostiky vysoce heterogenního onemocnění

The Application of Massively Parallel Next Generation Sequencing Technologies for Diagnosis of Hereditary Spastic Paraplegia

A Contribution to the Development of DNA Diagnosis of a Highly Heterogeneous Disease

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Pavel Seeman, Ph.D.

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

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citoval/a 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, 27.06.2018

RNDr. Anna Uhrová Mészárosová

Identifikační záznam:

UHROVÁ MÉSZÁROSOVÁ, Anna.

Využití masivně paralelního sekvenování nové generace pro diagnostiku hereditární spastické paraparézy: Příspěvek k rozvoji DNA diagnostiky vysoce heterogenního onemocnění.

[The Application of Massively Parallel Next Generation Sequencing Technologies for Diagnosis of Hereditary Spastic Paraplegia: A Contribution to the Development of DNA Diagnosis of a Highly Heterogeneous Disease].

Praha, 2018. 129 stran, 5 příloh. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, DNA laboratoř, Klinika dětské neurologie.

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

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

Klíčová slova:

Hereditární spastická paraplegie, HSP, SPG, onemocnění Strumpell-Lorraine, SPG35, SPG77, masivně paralelní sekvenování, WES, NGS sekvenování nové generace

Keywords:

Hereditary spastic paraplegia, HSP, SPG, Strumpell-Lorraine disease, SPG35, SPG77, massively parallel sequencing, WES, NGS next generation sequencing

Poděkování:

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Pavlu Seemanovi, Ph.D. v první řadě za možnost vypracovat pod jeho vedením dizertační práci na velice zajímavé téma. Velice si vážím jeho odborných znalostí a zkušeností a děkuji mu za veškerou pomoc a podporu, milý přístup a důvěru ve mně vloženou. Ale nejvíce si cením toho, že jsem se od něho mohla naučit racionální rozvaze a správnému kritickému přístupu ke svojí práci a k získaným výsledkům.

Děkuji také své školitelce-konzultantce MUDr. Daně Šafka Božkové, Ph.D. za ochotu, pomoc, cenné rady pramenící z jejích širokých odborných znalostí, přátelský přístup a inspirativní nadšení.

Děkuji Mgr. Martině Bittóové, Mgr. Inně Soldátové a MUDr. Davidovi Stejskalovi z Centra lékařské genetiky a fetální medicíny GENNET, s.r.o. za pochopení, s jakým mi umožnili zpracovat soubor pacientů a nezištnou pomoc.

Svojí rodině velice děkuji za trpělivost, důvěru a obrovskou podporu.

Autorka

Obsah:

I.	Úvod	14
1.	Hereditární spastické paraplegie	14
1.1.	Historie	16
1.2.	Klinická diagnostika	16
1.3.	Neurologické nálezy u HSP	17
1.4.	Klinická klasifikace	18
1.4.1.	Nekomplikovaná forma nemoci	18
1.4.2.	Komplikované typy HSP	19
1.5.	Prevalence a epidemiologie	19
1.6.	Délka života	20
1.7.	Progrese onemocnění a ztráta schopnosti chůze	20
1.8.	Distribuce nemoci dle pohlaví	21
1.9.	Věk nástupu onemocnění	22
1.10.	Frekvence komplikujících klinických symptomů	23
2.	SPRS (The Spastic Paraplegia Rating Scale)	25
3.	Genetika hereditárních spastických paraplegií	26
3.1.	Distribuce genotypů	26
3.2.	Nejčastější typy HSP s autozomálně dominantním typem dědičnosti	31
3.2.1.	SPG4	31
3.2.2.	SPG3 (SPG3A)	31
3.2.3.	SPG31	32
3.2.4.	SPG8	33
3.2.5.	SPG10	33
3.3.	Nejčastější typy HSP s autozomálně recesivním typem dědičnosti	33
3.3.1.	SPG11	33
3.3.2.	SPG7	34
3.3.3.	SPG5	34
4.	Patofyziologické mechanismy u HSP	36
4.1.	Oxidativní stres	36
4.2.	Poruchy axonálního transportu a růstu axonů	37
4.3.	Abnormální metabolismus lipidů	37
4.4.	Poruchy myelinizace	37
4.5.	Poruchy buněčných membrán, tvarování ER a dalších membránových organel	37
5.	Možnosti léčby	39
5.1.	První potenciální cílená léčba u SPG5	39
5.2.	Zvířecí modely a genová terapie	40
6.	Možnosti molekulárně genetického vyšetření	40
II.	Cíle práce	42
III.	Materiál a metody	43
1.	Soubor HSP pacientů	43
1.1.	Algoritmus výběru pacientů pro NGS panelu genů	44
1.2.	Výběr genů pro NGS panelu genů	44
1.3.	Soubor vyšetřených pacientů	45
2.	Použité metody	47
2.1.	Sangerovo sekvenování	47
2.2.	MLPA	47
2.3.	NGS sekvenování panelu genů	48
2.3.1.	Design prob pro cílené obohacení vybraných genů	48
2.3.2.	Target Enrichment a příprava DNA knihovny	49
2.3.3.	Vlastní NGS sekvenování	50
2.4.	Bioinformatické vyhodnocení	51
2.4.1.	Alignment	51
2.4.2.	Variant Calling	52
2.4.3.	Anotace vcf souborů/nalezených variant	52
2.4.4.	Hodnocení patogenity variant	52
2.4.5.	Analýza Copy Number Variations (CNV)	53
2.5.	Celoexomové sekvenování (WES)	54
2.5.1.	Hodnocení vcf souborů	55
2.5.1.A	Exomiser	55
2.5.1.B	Anotace vcf souboru	55
2.5.2.	Hodnocení patogenity variant	55

2.6.	Mini Gene Splicing Assay	56
2.7.	SNP chip Array	56
2.8.	HaploPainter	56
IV.	Výsledky	57
1.	Masivně paralelní sekvenování panelu HSP genů	57
1.1.	Procento objasněnosti	57
1.2.	Nejčastěji se vyskytující typy HSP	58
1.3.	Kauzální varianty nalezené pomocí sekvenování panelu HSP genů	59
1.3.1.	Charakter nalezených kauzálních variant	59
1.3.2.	Nalezené kauzální varianty: nové vs. popsané	59
1.3.3.	Rekurentní vs. jedinečné varianty	60
1.3.4.	Frekvence kauzálních variant	60
1.4.	Gen <i>REEP1</i> ; SPG31	64
1.4.1.	Nalezené varianty v genu <i>REEP1</i>	64
1.4.2.	Kauzalita nalezených variant v genu <i>REEP1</i>	69
1.4.3.	Fenotyp pacientů s SPG31	70
1.5.	Gen <i>SPG7</i> ; HSP typu SPG7	71
1.5.1.	Nalezené varianty v genu <i>SPG7</i>	71
1.5.2.	Pacienti s variantami v <i>SPG7</i> genu	72
1.5.3.	Kauzalita variant v <i>SPG7</i> genu	74
1.5.4.	Fenotyp pacientů s SPG7	74
1.6.	Gen <i>SPG11</i> ; HSP typu SPG11	74
1.6.1.	Varianty nalezené v genu <i>SPG11</i>	75
1.6.2.	Pacienti s variantami v genu <i>SPG11</i>	77
1.6.3.	Kauzalita variant v <i>SPG11</i> genu	79
1.6.4.	Fenotyp pacientů s SPG11	79
1.7.	Gen <i>KIF5A</i> ; HSP typu SPG10	79
1.7.1.	Nalezené varianty v genu <i>KIF5A</i>	80
1.7.2.	Fenotyp pacientů s variantami v genu <i>KIF5A</i>	81
1.8.	Gen <i>CYP7B1</i> ; HSP typu SPG5	82
1.9.	Gen <i>NIPA1</i> ; HSP typu SPG6	83
1.10.	Gen <i>FA2H</i> ; HSP typu SPG35	84
1.11.	Gen <i>FARS2</i> ; HSP typ SPG77	86
1.12.	Varianta nejasného významu v genu <i>WASHC5</i> (KIAA0196)	88
1.13.	Patogenní varianta v genu <i>SPAST</i> nezachycená pomocí předchozího Sangerova sekvenování	88
1.14.	Varianta v genu <i>ATL1</i> ; HSP typ SPG3	91
2.	Celoexomové sekvenování (WES)	92
2.1.	Výsledky WES	92
2.2.	Pacientka 1	93
2.3.	Pacient 2	94
2.4.	Pacient 3	94
2.5.	Pacient 4	96
3.	Dříve diagnostikovaní pacienti s SPG4 a SPG3	97
3.1.	SPG4 pacienti diagnostikovaní v rámci DNA diagnostiky v centru GENNET.....	97
3.2.	SPG3 pacienti diagnostikovaní v rámci DNA diagnostiky v centru GENNET	97
3.3.	Celkový počet SPG3 pacientů mezi českými pacienty s HSP	98
4.	Spektrum genetických typů HSP (včetně SPG4 a SPG3) u českých pacientů s nekomplikovanou formou nemoci.	100
4.1.	Celkový přehled provedených vyšetření u českých pacientů s HSP. Počet objasněných pacientů	100
4.2.	Celkový počet pacientů u jednotlivých typů HSP	100
4.3.	Procentuální zastoupení jednotlivých typů HSP mezi objasněnými pacienty	101
4.3.1.	Zastoupení jednotlivých typů HSP mezi objasněnými familiárními pacienty	102
4.3.2.	Zastoupení jednotlivých typů HSP mezi objasněnými sporadickými pacienty	102
V.	Diskuze	103
VI.	Závěr	117
	Použitá literatura.....	119
	On-line zdroje.....	129
	Použité referenční sekvence genů	129

Seznam tabulek:

- Tab.1: *Prevalence HSP v různých populacích.*
- Tab.2: *Přehled HSP typů a HSP genů.*
- Tab.3: *Geny zahrnuté v jednotlivých designech pro sekvenování panelu genů.*
- Tab.4: *Typy HSP a procento objasněných non-SPG4 českých pacientů s HSP.*
- Tab.5: *Nalezené pravděpodobně kauzální varianty v HSP genech u českých non-SPG4 pacientů.*
- Tab.6: *Nalezené missense kauzální varianty.*
- Tab.7: *Nalezené splice site kauzální varianty.*
- Tab.8: *Nalezené nonsense a frameshift kauzální variant.*
- Tab.9: *Procentuální zastoupení jednotlivých typů HSP u českých pacientů.*

Seznam obrázků:

- Obr.1: *Ernst Adolf Gustav Gottfried von Strümpell (1853 – 1925).*
- Obr.2: *Distribuce věku nástupu onemocnění u pacientů s HSP.*
- Obr.3: *Věk nástupu onemocnění u vybraných častých typů HSP.*
- Obr.4: *Frekvence komplikujících znaků a symptomů.*
- Obr.5: *Proteiny kódované HSP geny a různé úrovně jejich funkce v buňkách.*
- Obr.6: *Target Enrichment SureSelect Kit: možnosti pro návrh prob.*
- Obr.7: *Princip metody SureSelect a Haloplex firmy Agilent Technologies použitých k přípravě DNA knihoven pro NGS sekvenování.*
- Obr.8: *Princip Illumina NGS sekvenování.*
- Obr.9: *Rodokmen rodiny s variantou c.33-2A>G v genu REEP1.*
- Obr.10: *Rodokmen rodiny 1 s variantou c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20) v genu REEP1.*
- Obr.11: *Rodokmen rodiny 2 s variantou c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20) v genu REEP1.*
- Obr.12: *Rodokmen rodiny s variantou c.431T>A (p.Leu144*) v genu REEP1.*
- Obr.13: *Rodokmen rodiny s variantami c.233T>A (p.Leu78*) a c.1553-2_1553-1del v genu SPG7.*
- Obr.14: *MLPA, heterozygotní delece exonů 16-18 v genu SPG11.*
- Obr.15: *Rodokmen rodiny s variantou c.1603-1G>A a delecí exonů 16-18 v genu SPG11.*
- Obr.16: *Sekvence s variantou c.130C>T v genu FA2H u pacienta s SPG35 a jeho zdravé sestry.*
- Obr.17: *Snímky z MRI mozku pacienta s SPG35 s hypersignálními ložisky a mírnou atrofií mozku a mozečku.*
- Obr.18: *Rodokmen rodiny s variantou c.130C>T v genu FA2H.*
- Obr.19: *Sekvence s variantou c.1082C>T v genu FARS2 v heterozygotním stavu u pacienta s SPG77.*
- Obr.20: *Výsledek z SNP Chip Array s delecí zasahující dva exony genu FARS2 a jeden exon sousedního genu LYRM4.*
- Obr.21: *Grafické znázornění principu allele drop-out u varianty c.1321+2 T>G v genu SPAST.*
- Obr.22: *Vizualizace BAM files v místě obou variant v genu SPAST.*
- Obr.23: *Sekvence s kauzální variantou c.1321+2 T>G v genu SPAST.*
- Obr.24: *MLPA, heterozygotní delece exonů 37-39 genu SPG11.*

Seznam použitých zkratk:

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD HSP	hereditární spastické paraplegie s autozomálně dominantní dědičností
AR HSP	hereditární spastické paraplegie s autozomálně recesivní dědičností
ATP	adenosintrifosfát
BAEP	sluchové evokované potenciály
CMT	neuropatie typu Charcot-Marie-Tooth
CNS	centrální nervový systém
CNV	copy number variations
DK	dolní končetina
DMO	dětská mozková obrna
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
EEG	elektroencefalografie
GATK	genome analysis toolkit
HK	horní končetina
HMM	hidden Markov model
HSP	hereditární spastická paraplegie/paraparéza
MEP	motorické evokované potenciály
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MPS	masivně paralelní sekvenování
MRI	magnetic resonance imaging, magnetická rezonance
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NFE	non-Finish European population
NGS	next generation sequencing
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonukleotidová kyselina
SNP	single nucleotide polymorphism
SPG	hereditární spastická paraplegie/paraparéza
SPRS	Spastic Paraplegia Rating Scale
SEP	somatosensorické evokované potenciály
TCC	thin corpus callosum
TCC-HSP	hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum
UTR	untranslated region
VEP	visual evoked potentials
WES	whole exome sequencing

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 popsaných 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 IAHSPP, nebyl diagnostikován ani jeden pacient s SPG3). Nejčastější typ je SPG31 s kauzálními variantami v genu *REEPI*, 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 *ATL1*), 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 *REEPI*.

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 *ATL1* pro SPG3) není příliš efektivní a je vhodné po vyšetření SPG4 pokračovat v indikovaných případech vyšetřením panelu genu pomocí MPS/NGS. Malá velikost genu *REEPI* (jen 6 exonů) může být důvodem k vyšetření u vybraných pacientů místo dosud často indikovaného genu *ATL1* (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.

Abstract

The aim of this work is to map the genetical spectrum of hereditary spastic paraplegia in Czech patients. Hereditary spastic paraplegia (HSP) is an inherited neurological disorder, clinically characterized by progressive weakness and spasticity of the lower limbs leading to problems with gait and can cause the complete loss of the ability to walk. HSP is clinically and genetically very heterogenous; more than 90 HSP types and pathogenic variants in more than 70 genes have been described to date. HSP manifests as an uncomplicated (pure) form in the majority of HSP patients. Less often it manifests as a complicated phenotype with the associated clinical signs (mental impairment, epilepsy, ataxia, atrophy of the optic nerve).

We performed massively parallel sequencing (MPS) of uncomplicated HSP gene panel in a group of 96 Czech patients with suspected uncomplicated type of HSP. In all patients the most common HSP type SPG4 was previously excluded. HaloPlex Target Enrichment kit and SureSelect Target Enrichment kit (both Agilent Technologies, US) with custom probes designed was used for MPS. All coding and neighbouring regions of included genes was sequenced by MPS. We performed whole exome sequencing (WES) in four patients using SureSelect All Exon Kit v6 (Agilent Technologies, US). The presence of all found variants was confirmed by Sanger sequencing. Their pathogenicity was assessed in silico and by segregation analysis where possible.

The causal pathogenic variant was found in 22 patients from 96 examined using MPS sequencing of the gene panel. Our results represent 23 % of examined patients evaluated by this method (22 from 96). The percentage of evaluated patients was 29,4 % in the group of familial patients (15 from 55) and it was higher than in the group of sporadic patients with 15,5 % evaluated patients (7 from 45). Two patients were evaluated by WES from four patients examined. By using next generation sequencing methods (MPS of gene panel and WES) we found all together 10 types of HSP among the non-SPG4 Czech patients (SPG4, SPG5, SPG6, SPG7, SPG10, SPG11, SPG31, PSG35, SPG77 a IAHS, no patient with SPG3 was diagnosed); the most frequent is type SPG31 with pathogenic variants in the *REEPI* gene. SPG31 is the most frequent type among the autosomal dominant HSPs. The most frequent autosomal recessive type of HSP are SPG11 (slightly more frequent) and SPG7. We observe a low frequency of SPG3 (variants in *ATL1* gene) among the Czech HSP patients although this type was repeatedly described as the second most frequent type of HSP. We found rare types of HSP, such as SPG35, IAHS and especially SPG77. The Czech patient

with SPG77 is the fourth patient worldwide. Twelve new variants in six genes together have been found. The number of new variants is highest in the *REEP1* gene.

In the more frequent types of HSP diagnosed in this work we discuss the phenotypic features characteristic for types of HSP. These data can be useful for further clinical diagnostics.

We summarized the results from this work and the group of previously evaluated patients with SPG4 and SPG3, which allows us to describe the genetical characteristics of the group of Czech HSP patients. Altogether 11 types of HSP have been found among Czech patients with hereditary spastic paraplegia to date (with SPG3 diagnosed previously). The most frequent type is SPG4 (70 % of all evaluated HSP patients). The other more frequent types are SPG31, SPG11, SPG7 and SPG10 in 8.3 %, 6.0 %, 4.8 % and 3.6 % from all evaluated patients. Sanger sequencing is effective only in *SPAST* gene, sequencing of *REEP1* gene can be more effective than sequencing of *ATL1* gene.

All these results represent the very first data concerning the genetic characteristics of hereditary spastic paraplegia in the Czech Republic and are thus unique with regard to epidemiological data about diagnosis HSP.

I. Úvod

1. Hereditární spastické paraplegie

Hereditární spastické paraparézy/paraplegie (HSP) jsou heterogenní skupinou onemocnění centrálního motoneuronu klinicky charakterizované bilaterální progredující spasticitou a slabostí dolních končetin. Onemocnění je známo pod původním názvem spastická paraplegie nebo podle prvních popisovatelů onemocnění Strümpell-Lorrain. Klinické příznaky nemoci jsou způsobeny postupnou degenerací axonů kortikospinální dráhy a zadních provazců míšních. HSP se manifestuje progredující poruchou chůze, první příznaky zaznamená buď sám pacient nebo si zhoršené chůze povšimne jeho okolí. Subjektivně může pacient pocítovat ztuhlost dolních končetin nebo také udává křeče svalů. Nástup onemocnění bývá pozvolný a nenápadný, symptomy se mohou začít projevovat v kterémkoli věku od předškolního dětství až do pozdních dekad života. Obtíže postupně progredují a mohou vést až k neschopnosti samostatné chůze a nutnosti upoutání na invalidní vozík. U některých typů nemoci se kromě hlavních, výše popsaných příznaků přidávají další klinické příznaky, které mohou způsobit až vážnou invaliditu pacienta. Příčinou nemoci mohou být patogenní varianty v mnoha genech. Dosud byla u více než sedmdesáti genů popsána spojitost s HSP. Jak byly postupně lokalizovány lokusy a následně objevovány a popisovány jednotlivé geny, byly vzestupně číslovány typy nemoci: SPG1, SPG2, SPG3, atd. Jednotlivé typy nemoci se liší věkem nástupu, rychlostí progresu onemocnění, závažností jednotlivých klinických příznaků i typem a závažností přidružených klinických znaků.

1.1. Historie

První zmínka o hereditární spastické paraparéze pochází od německého lékaře působícího v oblasti dnešních pobaltských republik Ernsta Adolfa Gustava Gottfrieda von Strümpella (1853–1925), který v roce 1880 publikoval případ dvou sourozenců s pravděpodobně AD-HSP (autozomálně dominantní), s nástupem onemocnění v 37 a 56 letech. Z dnešního pohledu pacienti klinicky manifestovali nekomplikovanou formu nemoci (viz dále). Po smrti jednoho ze sourozenců popsal Strümpell degeneraci laterálního kortikospinálního traktu, fasciculus gracilis a spinocerebelárního traktu (Strümpell, 1880).

Obr. 1: *Ernst Adolf Gustav Gottfried von Strümpell (1853 – 1925)*

Převzato z: <http://www.200.uk-erlangen.de/de/geschichte/20-koepfeder-erlangeruniversitaetsmedizin/strumpell/>, April 08th, 2017.



V průběhu dalších sta let byly publikovány víceméně jen jednotlivé kazuistiky pacientů a rodin. V roce 1916 poukázal Rhein na klinickou heterogeneitu mezi rodinami s HSP (Rhein, 1916). Postupně byly popisovány další případy pacientů i s komplikovanými fenotypy HSP, kdy byly u pacientů spolu s projevy hereditární spastické paraparézy přítomny i další příznaky jako demence, amyotrofie, extrapyramidální příznaky a další (Kjellin, 1952, Dick and Stevenson, 1953, Silver, 1966). Některé typy komplikované HSP jsou dodnes označovány jménem prvního autora, který jen popsal (Kjellin syndrom, Silver syndrom).

V roce 1981 (tzn. až 101 let po první publikaci dr. Strümpella) publikovala Anita Harding, profesorka neurologie londýnské univerzity, do té doby největší studii zahrnující 22 rodin s nekomplikovanou HSP, kdy popsala 18 rodin s autozomálně dominantním typem dědičnosti a tři s autozomálně recesivní dědičností (poslední rodinu nebylo vzhledem k malému počtu příbuzných možno zařadit) (Harding, 1981). Jednalo se o první systematickou práci týkající se genetického pozadí HSP. O dva roky později publikovala stejná autorka v časopisu *Lancet* přelomovou práci shrnující klasifikační kritéria pro HSP, která jsou v zásadě používána dodnes (Harding, 1983). Hardingová rozdělila HSP jednoduše na skupinu nekomplikovaných a komplikovaných HSP. Nekomplikované formy dále rozdělila na ty s nástupem před a po 35 roce věku a popsala, že u časného nástupu je progresse obtíží pozvolnější, zatímco u pozdních nástupů je rychlejší. Komplikované formy popsala jako

vzácnější a geneticky více heterogenní. Pozorovala též u stejného onemocnění fenotypovou variabilitu v rámci jedné rodiny.

V roce 2006 Rebecca Shüle s kolegy z German Network for Hereditary Spastic Paraplegia prezentovali klasifikační kritéria tzv. SPRS (The Spastic Paraplegia Rating Scale), na jejichž základě lze klinicky kvantifikovat stupeň postižení a progresi onemocnění (Schule et al., 2006).

Co se týče poznání v oblasti patofyziologie, tak sice již Strumpell v roce 1880 popsal patologické změny kortikospinální dráhy, ale teprve až v roce 1991 publikoval Schady a kolegové práci, ve které potvrdili, že HSP je způsobena postižením centrálního motoneuronu (Schady et al., 1991). Do té doby byla HSP považována spíše za distální axonopatii.

Rozvoj molekulárně genetických technik, zejména pozičního klonování umožnil postupně podrobnější zmapování genetického pozadí častějších typů a příčin HSP. V roce 1994 popsal Jouet a kolektiv první gen *LICAM* ve spojitosti s X-vázanou HSP (Jouet et al., 1994). V roce 1998 byl klonován první autozomálně recesivní gen *SPG7* (Casari et al., 1998) a hned další rok Hazan a kolektiv gen vyklonovali gen *SPAST* zodpovědný za většinu AD děděných případů HSP (Hazan et al., 1999). Díky nástupu masivně paralelních sekvenčních technologií (MPS) (tzv. sekvenování nové generace NGS) vyvinutých v posledních méně než 10 letech je dnes známo přes 70 genů spojovaných s HSP.

1.2. Klinická diagnostika

Správná klinická diagnostika hereditární spastické paraparézy je naprosto zásadní, nicméně může být velice složitá. Vzhledem k tomu, že celá skupina hereditárních spastických paraparéz je fenotypově velice heterogenní v mnoha aspektech (věk nástupu, progresse a různý stupeň postižení, atd.) jednoznačná klinická diagnóza je v některých případech stanovena až po několika letech a mnoha různých vyšetřeních teprve díky nalezené genové příčině.

HSP je onemocnění centrálního motoneuronu. Postižení centrálního motoneuronu se obecně projevuje zvýšením svalového tonu, zvýšením šlachookosticových reflexů, přítomností iritační pyramidových jevů (Babinski). Oproti tomu postižení periferního motoneuronu se projevuje opačně, tzn. snížením svalového tonu, snížením nebo chyběním reflexů, slabostí a pyramidové jevy iritační nejsou obvykle výbavné.

Mezi základní diagnostická kritéria HSP patří: zvýšený tonus a spasticita dolních končetin a spastická chůze, zvýšené šlachookosticové reflexy na dolních končetinách s rozšířenou reflexní zónou a pozitivní pyramidové jevy iritační (Babinski, Rossolimo, Chaddock, Strumpell).

V základní diferenciální diagnostice HSP je třeba vyloučit infekční příčiny (virové, syfilis, aj.), deficit vitamínu B12, nádorová a degenerativní onemocnění míchy, roztroušenou sklerózu. Pozitivní rodinná anamnéza s dalšími příbuznými s příznaky HSP výrazně svědčí pro to, že se jedná o hereditární onemocnění a může napovídat nebo i určovat typ dědičnosti. Přesto i další stanovení jasné diagnózy HSP může být obtížné. Některé fenotypové klinické projevy jsou společné i pro další neurologická onemocnění např. ataxie, leukodystrofie, amyotrofickou laterální sklerózu, spinální muskulární atrofii a periferní neuropatie, což může být pro diagnostiku HSP matoucí.

Některé klinické příznaky, např. ataxie, mohou být vylučujícím kritériem pro spastickou paraparézu, ale na druhou stranu jsou nově často popisovány jako jeden z mírných a častých příznaků u SPG7 (Pfeffer et al., 2015, Hadjivassiliou et al., 2017). A naopak například u Fridreichovy ataxie s pozdním nástupem (25 let a více) mohou být zachovány reflexy a nemoc se zpočátku může prezentovat jako spastická paraparéza (Martinez et al., 2017, Abrahao et al., 2015). Podobné studium fenotypu u pacientů se stejným genetickým typem HSP, resp. kauzálními variantami ve stejném genu, rozšiřuje naše vědomosti o hraničních fenotypech a rozšiřuje spektrum fenotypů popsaných v době před molekulárně genetickou diagnostikou.

Povinné příznaky pro HSP však pro všechny zůstávají stejné:

- progredující bilaterální a symetrická spasticita a slabost dolních končetin
- spastická chůze
- hyperreflexie na dolních končetinách s rozšířenou reflexní zónou
- pozitivní pyramidové iritační jevy.

1.3. Neurologické nálezy u HSP

Krom povinných neurologických příznaků popsaných výše, mohou být přítomny i další klinické projevy. Přítomen bývá klonus nohy nebo pseudoklonus, mohou být přítomny poruchy vibračního cití na dolních končetinách distálně. Mírná hyperreflexie může být pozorována i na horních končetinách (Fink, 2003). Zpochybňujícími příznaky pro klinickou diagnózu jsou asymetrie, převažující ataxie nebo výraznější amyotrofie, extrapyramidové příznaky a dominující postižení na horních končetinách. Při onemocnění nedochází k výraznější hypotrofii lýtkových svalů, jako tomu bývá např. u dědičné neuropatie, může však být přítomen pes cavus. Svalová síla zůstává relativně zachována.

U nekomplikované formy HSP bývá normální MRI nález míchy i mozku, (Hedera et al., 2005), atrofie corpus callosum může být pozorována u komplikovaných forem. Motorické evokované potenciály (MEP) jsou důležitým vodítkem k diagnóze nekomplikované HSP. Centrální kondukční časy jsou prodloužené až nevybavné při kortikální stimulaci k dolním končetinám, ukazují na postižení centrálních motorických drah, z horních končetin jsou normální. Somatosenzorické evokované potenciály (SEP) z dolních končetin mohou mít snížené amplitudy (Sartucci et al., 2007). EMG a kondukční studie bývají u nekomplikované HSP s normálním nálezem. Někdy a většinou v pokročilých stádiích nemoci může být přítomna neuropatie axonálního typu, ale spíše u komplikovaných typů HSP. H-reflex má vysokou amplitudu, potvrzující hyperreflexii. Vyšetření likvoru není pro určení HSP ani upřesnění typu nutné ani přínosné, pokud bylo provedeno, pak je u HSP nález normální, bez známek zánětu.

1.4. Klinická klasifikace

Pro stanovení diagnózy HSP jsou sice povinné výše uvedené příznaky, nicméně v mnoha dalších přidružených fenotypových znacích jsou hereditární spastické paraplegie velice heterogenní. Již bylo uvedeno, dodnes platí rozdělení dle Hardingové z roku 1983 na skupinu **nekomplikovaných** (též čistých) a skupinu **komplikovaných** spastických paraparéz. Výrazně častější (cca 90 % pacientů) je nekomplikovaná forma nemoci.

Nekomplikované typy se vyskytují s větší převahou mezi autozomálně dominantně dědičnými typy HSP (AD HSP), zatímco komplikované fenotypy jsou daleko častější u autozomálně recesivních HSP (AR HSP) a mezi sporadickými pacienty (kdy je pouze jediný případ HSP v rodině) (Schule et al., 2016).

1.4.1. Nekomplikovaná forma nemoci

U nekomplikované formy odpovídají typické fenotypové projevy pouze spinálnímu postižení. Projevy nemoci jsou vždy omezeny pouze na dolní končetiny, horní končetiny zůstávají nepostiženy, pokud jsou postiženy, pak velice mírně. Stejně tak zůstává až na výjimky beze změn řeč a polykání i kognitivní funkce. K výše popsaným příznakům se často přidávají poruchy mikce (hypertonický neurogení močový měchýř), není to ale povinný a u všech pacientů přítomný znak. MRI nález míchy i mozku je normální. Vzácně a většinou v pokročilých stádiích nemoci může být přítomna neuropatie axonálního typu spojená s atrofií svalů dolních končetin.

1.4.2. Komplikované typy HSP

Ve skupině komplikovaných forem je progredující spastická paraparéza a další výše popsané příznaky asociovány s dalšími neurologickými obtížemi, např. ataxií, svalovými atrofiemi, atrofií optiku, dysarthrií, dysfagií, mentální retardací nebo deteriorací, extrapyramidovými příznaky, demencí, periferní neuropatií nebo epilepsií. Na MRI míchy a mozku mohou být patrné změny, nejčastěji atrofie corpus callosum.

Komplikovaných forem HSP je v porovnání s nekomplikovanými typy více co do počtu genů/lokusů (přes 50 typů). Obecně jsou však komplikované formy vzácnější a některé byly popsány pouze u jediné rodiny celosvětově. Jednoznačně nejčastější typ komplikované HSP je ve většině populací SPG11, původně popsán jako HSP s tenkým corpus callosum (viz dále). Existují i geny, u nichž je popisován nekomplikovaný i komplikovaný fenotyp (SPG5, SPG6, SPG7) a i u typických nekomplikovaných typů (SPG3, SPG4, SPG31) jsou vzácně popsány komplikované fenotypy (viz Kapitola I:/ 3.2). Mnohé typy HSP se zpočátku manifestují jako nekomplikované, postupně se přidávají komplikující znaky (SPG11, SPG35). Nicméně těžké fenotypy s mentálním postižením a růstovým opožděním, mikrocefalií, skeletálními abnormalitami apod., kdy je spastická paraplegie spíš součástí syndromu, jsou vzácné a fenotypově i geneticky velice heterogenní (Harding, 1983, Fink, 2003).

1.5. Prevalence a epidemiologie

Protože je HSP vzácné onemocnění, chybí prozatím větší klinicko-genetické studie mapující různé populace. Obecně se prevalence nemoci udává podle různých zdrojů 1–10:100 000. Podle review z roku 2014 (Ruano et al., 2014) byla nejvyšší prevalence popsána ve španělské populaci 9,6:100 000 a nejnižší v japonské populaci 0,1 resp. 0,9:100 000, přičemž většinou převládá v populacích AD typ HSP (viz Tab.1).

Tab.1: *Prevalence HSP v různých populacích*. Převzato z Ruano et al. 2014

Table 2. Selected studies and prevalence estimates: HSP

First author	Country (region)	Source of patients ^a	Population	Number	Prevalence per 100,000 people			
					isolated HSP	AD-HSP	AR-HSP	total HSP
Sridharan [26], 1985	Libya (Benghazi province)	multisource	519,000	11	–	–	–	2.1
Brignolio [38], 1986 ^c	Italy (Turin province)	multisource	2,327,996	31	0.3	0.7	0.3	1.3
Polo [4], 1991	Spain (Cantabria region)	hospitals + families	510,000	49	–	–	–	9.6
Filla [41], 1992 ^c	Italy (Molise region)	multisource	335,211	9	–	0.6 ^b	2.1 ^b	2.7
Hirayama [27], 1994	Japan (national)	hospitals	123,000,000	109	–	–	–	0.1
Leone [39], 1995 ^c	Italy (Valle d'Aosta region)	multisource	115,270	5	0.9 ^b	3.4 ^b	0.0	4.3
McMonagle [36], 2002 ^c	Ireland (Northern Ireland and Irish Republic)	hospitals + families	5,436,000	69	–	1.3	–	–
Tsuji [22], 2008	Japan (national)	registry	126,900,000 ^b	1,103 ^b	–	–	–	0.9 ^b
Braschinsky [42], 2009 ^c	Estonia (national)	multisource	1,340,000 ^b	59	–	1.8 ^b	2.6 ^b	4.4
Boukhris [57], 2009 ^c	Tunisia (Sfax district)	hospitals	869,700	50	–	0.5 ^b	5.3	5.8
Erichsen [20], 2009 ^c	Norway (southeast)	multisource	2,633,893	194	1.3	5.5	0.6	7.4
Coutinho [23], 2013 ^c	Portugal (national)	multisource	10,322,000	418	–	2.5	1.7	4.1

Isolated = Isolated patients; Number = number of patients identified in the study; – = the group was included in the study, but the prevalence was not ascertainable from the reported data.

^a Studies were classified according to the main sources of patients, though other complementary sources might have been used. Please refer to online supplementary table 1 for a complete listing of

sources used. Multisource studies were defined as studies that include patients from at least primary care/community settings, specialized/hospital care and active investigation of probands' families.

^b Values not reported by the authors but estimated from the data in the paper.

^c Study included in the meta-analysis.

Nekomplikované formy jsou více prevalentní v Severní Evropě, Severní Americe a Japonsku, zatímco komplikované fenotypy - většinou autozomálně recesivně dědičné – jsou častější v oblasti Středozemního moře (Braschinsky et al., 2009, Ishiura et al., 2014, Coutinho et al., 1999).

1.6. Délka života

U nekomplikované formy HSP je předpokládána délka života nezměněná ve srovnání se zdravou populací. U komplikovaných forem HSP se nelze z hlediska doby dožití sumárně vyjádřit vzhledem k rozmanitosti individuálních symptomů.

1.7. Progrese onemocnění a ztráta schopnosti chůze

Nekomplikovaná forma HSP se může projevit kdykoliv během života od dětství do 8. dekády, nejčastěji však ve druhé až čtvrté dekádě. Obecně je známo a bylo publikováno, že při nástupu v dětství je pozdější progrese onemocnění velice pozvolná, oproti tomu pozdější nástup onemocnění (cca po 30. roce věku) vede k daleko rychlejší progresi onemocnění, vedoucí většinou k výrazným poruchám až ztrátě samostatné chůze a upoutání na invalidní vozík v pozdějších dekádách života (Fink, 2003). Tato korelace platí jako obecně pro všechny HSP pacienty, tak pro skupinu SPG4 pacientů (Schule et al., 2016).

Na závažnost postižení má největší efekt délka trvání nemoci, následuje věk nástupu. Čím pozdější věk nástupu a delší trvání nemoci, tím vyšší SPRS skóre (viz dále). Taková korelace je zajímavá, u většiny neurodegenerativních onemocnění (spinocerebelární ataxie, Fridreichova ataxie, Huntingtonova choroba) je závislost obrácená – čím dřívější nástup, tím rychlejší progrese onemocnění (Jacobi et al., 2011, Metz et al., 2013, Reetz et al., 2015, Tabrizi et al., 2013). Vliv pohlaví na stupeň závažnosti onemocnění nebyl popsán.

Po době trvání nemoci 10/20/30/40 let musí pravidelně používat pomůcky k chůzi 25/48/64/72 % pacientů. Medián trvání nemoci ke ztrátě schopnosti samostatné chůze je 22 let. Závislost na invalidním vozíku je obecně nižší, po 10/20/30/40 letech trvání nemoci je upoutáno na vozík 5/12/18/29 % pacientů. Po době trvání nemoci 37 let byla na invalidní vozík upoutána čtvrtina pacientů (Schule et al., 2016). Prognóza a závažnost postižení však bývají různé dokonce i v rámci jedné rodiny.

Vzhledem ke vzácnému výskytu některých typů HSP chybí informace týkající se typického fenotypu konkrétních HSP a nelze proto v současné době v žádném případě pouze na základě klinického fenotypu bez znalosti genetického pozadí stanovit, o jaký typ HSP se jedná. Korelace jednotlivých genotypů HSP se závažností onemocnění nebyla zatím nikdy popsána (i z důvodu malého počtu některých typů HSP), nicméně mezi nejčastějšími typy HSP má zřejmě jednoznačně nejzávažnější fenotyp SPG11 (Schule et al., 2016).

1.8. Distribuce nemoci dle pohlaví

Vzhledem k faktu, že HSP je vzácné onemocnění a teprve až rozvoj molekulárně genetických metod posledních několika let umožňuje podrobnější mapování genetických typů HSP v jednotlivých populacích, chybí publikace mapující u větších skupin pacientů z různých populací klinicko–genetické aspekty. Počty pacientů s HSP jsou navíc v mnohých populacích obecně nízké.

V roce 2016 byla publikována dosud jediná práce mapující klinicko-genetické aspekty u prozatím největší skupiny 608 pacientů s HSP žijících v Německu (Schule et al., 2016). Dle této práce v celé skupině pacientů převažovali muži, 55 % mužů vs. 45 % žen. Nicméně pokud zahrnuli pouze pacienty se stanovenou genetickou diagnózou, poměr muži vs. ženy byl vyrovnaný. Naopak mužští pacienti převažovali ve skupině sporadických pacientů s neobjasněnou genetickou diagnózou (60 % muži vs. 40 % ženy). Autoři diskutují možnost existence zatím neznámých X-vázaných genetických faktorů. Trend predominance mužů mezi HSP pacienty byl popsán i u dominantní SPG4, byla diskutována možnost vyšší penetrance nemoci u mužů (Proukakakis et al., 2011, Varga et al., 2013).

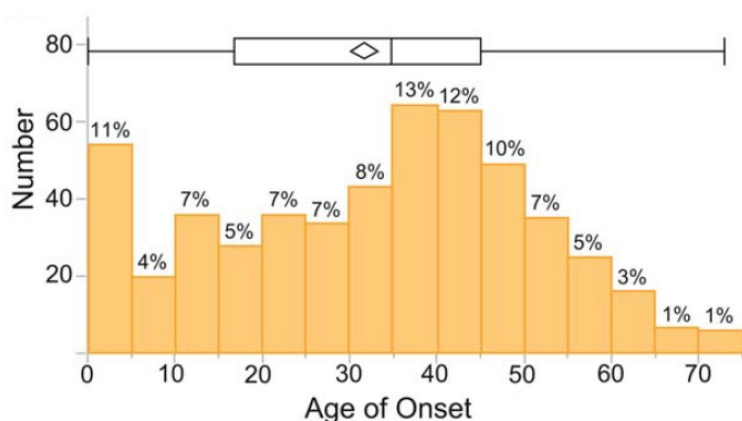
1.9. Věk nástupu onemocnění

HSP se může projevit v jakémkoli věku od časného dětství do pozdních dekád. Průměrný věk nástupu je dle Schule (Schule et al., 2016) 30,8 roku. Distribuce je bimodální s dvěma píky, první v časném dětství do 5-ti let (11 % pacientů) a druhý ve věku kolem 40-ti let (Obr.2). Ve skupině pacientů s pozdějším nástupem onemocnění (50 let a více) převažují pacienti se sporadickým výskytem onemocnění v rodině nad pacienty s familiárním výskytem (AD i AR) (Schule et al., 2016).

Obr.2: Distribuce věku nástupu onemocnění u pacientů s HSP.

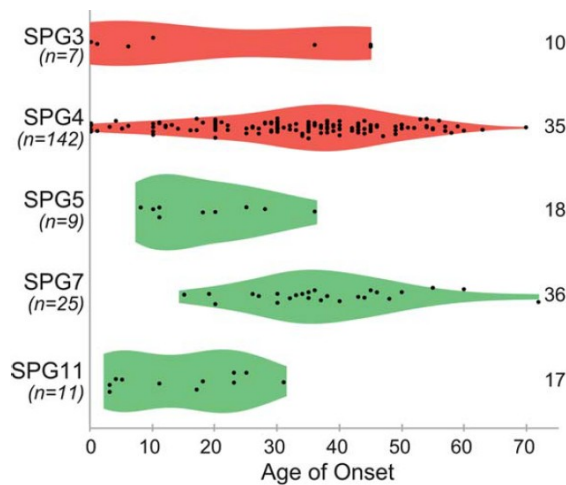
Bimodální rozložení s dvěma píky ve věku do 5-ti let a ve věku kolem 40-ti let. Box plot v horní části představuje věkovou distribuci s minimem, prvním kvantilem, mediánem, třetím kvantilem a maximem. Kosočtverec značí průměrný věk nástupu (30,8 let). Osa X věk nástupu, osa Y počet pacientů.

Převzato z Schule et al. 2016.



Pro některé typy HSP je charakteristický nástup onemocnění v dětském nebo mladším věku (SPG3), pro jiné naopak v dospělosti (SPG7, SPG4). Analýza věku nástupu u skupiny pacientů s vybranými častějšími typy HSP (SPG3, SPG4, SPG5, SPG7 a SPG11) ukázala, že všechny typy SPG mohou mít širokou distribuci věku nástupu od dětství do dospělosti. SPG3 začíná nejčastěji v dětství do 10-ti let, následuje SPG11 s mediánem nástupu v 17 letech. SPG7 se manifestuje nejpozději z vybraných genotypů, medián nástupu je 36 let (Obr.3) (Schule et al., 2016).

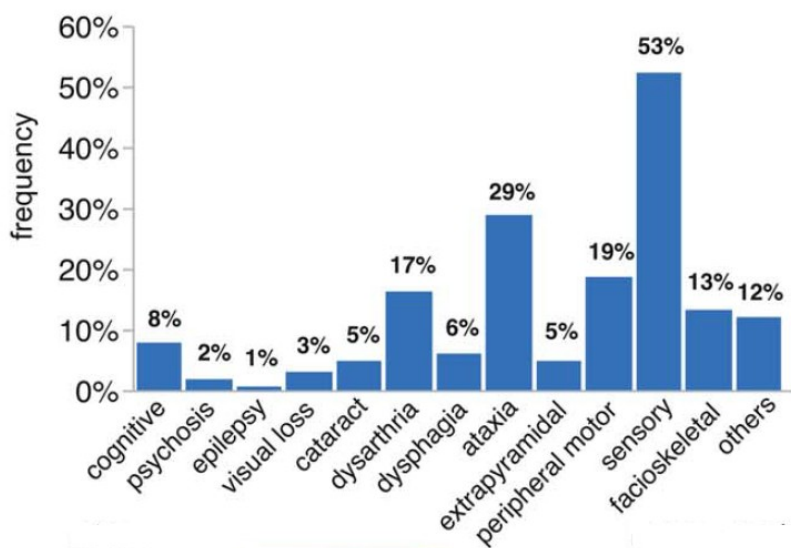
Obr.3: Věk nástupu onemocnění u vybraných častých typů HSP. n = počet pacientů; vpravo medián nástupu onemocnění, osa X věk nástupu. Převzato z Schule et al. 2016.



1.10. Frekvence komplikujících klinických symptomů

Schule et al. 2016 také sledovali ve skupině 608 pacientů s HSP frekvenci jednotlivých komplikujících klinických projevů a příznaků (stanoveny na základě neurologického vyšetření, výsledky z MRI mozku a míchy, EMG apod. nebyly sledovány). Ve skupině zkoumaných pacientů bylo 42 % (256) pacientů s nekomplikovanou a 58 % (352) pacientů s komplikovanou formou nemoci. Jako nejčastější komplikující znak se vyskytovalo postižení čítí u 53 % pacientů, následováno ataxií u 29 % pacientů. Naopak nejméně se vyskytovaly epilepsie, psychózy a ztráty zraku. (Obr.4).

Obr.4: Frekvence komplikujících znaků a symptomů. Převzato z Schule et al. 2016



Pokud rozdělili komplikující znaky a symptomy dle typů HSP u nejvíce frekventovaných typů SPG4, SPG3, SPG7 a SPG11, u SPG4 se nejčastěji vyskytovaly poruchy čítí (přes 50 % pacientů), ostatní komplikace se vyskytují vzácně. U SPG3 se objevily poruchy čítí ve zhruba čtvrtině případů a periferní neuropatie rovněž u zhruba čtvrtiny pacientů. U SPG7 se vyskytují komplikující znaky častěji: ataxie v necelých 50-ti % případů, podobně v necelých 50-ti % případů poruchy čítí, dysartrie ve čtvrtině případů. Ostatní znaky (periferní neuropatie, kognitivní zhoršení, extrapyramidové znaky) zhruba do 10-ti %. Ataxie u SPG7 byla již opakovaně popsána jako nejčastější přidružený symptom. (van Gassen et al., 2012, Choquet et al., 2016). Jednoznačně nejvíce komplikujících znaků se vyskytuje u SPG11, ve 100 % případů se objevilo kognitivní zhoršení, téměř u tří čtvrtin pacientů dysartrie, ve více než polovině ataxie, u třetiny poruchy čítí, dále periferní neuropatie, dysfágie (poruchy polykání), extrapyramidové postižení (Schule et al., 2016). Pro SPG11 je také typické tenké corpus callosum (TCC) na MRI zobrazení mozku.

2. SPRS (The Spastic Paraplegia Rating Scale)

U tak heterogenního onemocnění, jakým HSP bezesporu je, dlouho chyběla nějaká kritéria pro přesnější klinické hodnocení, podle kterých by bylo možno pacienty klasifikovat a stanovit stupeň jejich postižení. V roce 2006 navrhl tým německých lékařů a vědců snadno aplikovatelná, nicméně spolehlivá a validní kritéria, pro zhodnocení závažnosti pacientova postižení (Schule et al., 2006). Na jejich základě lze pak jednoduše kontinuálně sledovat rychlost progresu a vývoj onemocnění.

Na stupnici se hodnotí 13 kritérií, přičemž každému kritériu je přiřazena dle stupně postižení bodová hodnota od 0 do 4. Nula bodů je pro žádné postižení, 4 body pro největší postižení. Maximální možný součet bodů je 52 ($13 \times 4 = 52$). Výsledný součet přiřazených bodů značí stupeň postižení: 0 bodů = nepostižen, 52 = největší možné postižení:

The Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS). Třináct kritérií pro hodnocení závažnosti postižení u pacientů s HSP. (Podle Schule et al., 2006)

1. vzdálenost chůze bez přestávky
2. kvalita chůze
3. maximální rychlost chůze
4. výstup do schodů
5. rychlost výstupu do schodů
6. vstávání ze židle
7. spasticita na adduktorech kyčle
8. spasticita při ohybu v kolenu
9. slabost při abdukci v kyčli
10. slabost při dorsiflexi chodidla
11. kontraktury na dolních končetinách
12. bolest související se symptomy spastické paraparézy
13. funkce močového měchýře a střev

Příklad bodového hodnocení u kritéria: vzdálenost chůze bez přestávky:

- 1 bod – schopen chůze na > 500 m bez podpory
- 2 body – schopen chůze na < 500 m bez podpory
- 3 body - schopen chůze na < 500 m s podpůrnou pomůckou
- 4 body – neschopen chůze

3. Genetika hereditárních spastických paraplegií

Skupina HSP onemocnění je geneticky vysoce heterogenní. Dosud bylo popsáno více než 90 typů nemoci (lokusů) a více než 70 genů, jejichž patogenní varianty jsou příčinou HSP (viz Tab.2, str. 28-30). U HSP existují všechny typy dědičnosti, jak mendelovské: autozomálně dominantní i recesivní, X-vázaná, tak byla popsána vzácně i mitochondriální dědičnost (Verny et al., 2011). S nekomplikovanou formou nemoci je spojováno zhruba polovina těchto genů, zbytek genů byl popsán v souvislosti s komplikovanou formou HSP, často pouze v jedné rodině na světě (Fink, 2013, Lo Giudice et al., 2014). U komplikovaných forem obecně se více objevuje recesivní způsob dědičnosti a výskyt komplikovaných forem je proto daleko častější v populacích s vyšším procentem konsanguinních sňatků.

Číslování typu HSP odpovídá tomu, jak byly postupně objevovány/popisovány geny/lokusy zodpovědné za rozvoj nemoci. V genech byly popsány všechny typy mutací, nejčastěji missense a frameshift, méně nonsense a splice site varianty. Popsány byly i varianty v UTR oblastech, např. v genu *REEPI* (Zuchner et al., 2006, Beetz et al., 2008). Příčinou nemoci mohou být i velké delecce, nejčastější jsou v genu *SPAST* (SPG4) a v genu *SPG11*.

3.1. Distribuce genotypů

Zdáleka nejčastější typ HSP je SPG4 (kauzální varianty v genu *SPAST*), uvádí se u 40 % HSP pacientů a rodin (Fonknechten et al., 2000, Sauter et al., 2002, Depienne et al., 2006, Erichsen et al., 2007). Mezi objasněnými SPG4 pacienty je až 65 % případů s familiárním výskytem nemoci (více postižených jedinců v rodině) (de Bot et al., 2010), vysoký výskyt familiárních případů u SPG4 jsme zjistili i u českých pacientů (Meszarosova et al., 2016). Naproti tomu u sporadických pacientů v rodině je výskyt SPG4 nízký (pod 10 %).

Mezi autozomálně dominantními typy se ještě významně častěji vyskytuje SPG31 a SPG3. V publikacích bývá udáváno, že varianty v genu *ATLI* (tzn. SPG3) jsou příčinou onemocnění u zhruba 10 % pacientů s nekomplikovanou HSP. U dětských pacientů s nástupem před desátým rokem života je dokonce popsáno, že varianty v genu *ATLI* pro SPG3 jsou zdaleka nejčastější příčinou nemoci (Namekawa et al., 2006). Nicméně u českých pacientů s HSP je toto číslo výrazně nižší viz (Meszarosova et al., 2017), podobně nízký výskyt byl popsán i v několika dalších populacích (Kim et al., 2014, Lu et al., 2014, Elert-

Dobkowska et al., 2015, Park et al., 2015). Procentuální zastoupení SPG31 mezi HSP pacienty je udávána cca 5 % procent v různých populacích (Zuchner et al., 2006, Beetz et al., 2008). Z dalších dominantních typů HSP se v jednotkách procent vyskytuje SPG (*KIF5A*), i když výskyt může být v některých populacích vyšší (Goizet et al., 2009b, Lynch et al., 2016, Morais et al., 2017).

Mezi typy s AR dědičností je nejčastější SPG7 (Orsucci et al., 2014, Yoon et al., 2013, Chrestian et al., 2017, Kumar et al., 2013) a SPG11 (Stevanin et al., 2007, Stevanin et al., 2008, Coutinho et al., 2013) a v různých populacích, významně častěji lze ještě uvést SPG5 (jednotky procent) (Schule et al., 2016, Lynch et al., 2016).

Ostatní typy HSP (dominantně i recesivně dědičných) se vyskytují velice vzácně, vzhledem k jejich nízké frekvenci ani nelze spolehlivěji stanovit procentuální zastoupení. Zastoupení AR typů HSP je obecně oproti AD daleko víc heterogenní (Schule et al., 2016). Souhrnem celosvětově nejčastější typ HSP je s vysokou převahou SPG4, následuje SPG11 a SPG7 (Fonknechten et al., 2000, Sauter et al., 2002, Klebe et al., 2012, van Gassen et al., 2012, Stevanin et al., 2008, Brugman et al., 2008).

Tab.2: *Přehled HSP typů a HSP genů. Viz strany 28-30. (MR – mentální retardace).*

Vytvořeno na základě Fink 2013, Lo Giudice et al., 2014 a HGMD Professional.

Typ	Gen	Dědičnost	Variant	Věk nástupu	Fenotyp	Komplikující znaky
SPG1	L1CAM	X-vázaná	~20	časný	C	MR, hydrocefalus, ageneze corpus callosum
SPG2	PLP1	X-vázaná	20	variabilní	P/C	Záchvaty, MR, nystagmus, polyneuropatie, léze bílé hmoty
SPG3	ATL1	AD	~70	časný	P/C	Atrofie svalů, atrofie optiku, neuropatie, poruchy kognitivních funkcí
SPG4	SPAST	AD	>600	variabilní	P/C	Poruchy kognitivních funkcí, ataxie, spasticita HK, neuropatie
SPG5	CYP7B1	AR	51	variabilní	P/C	Atrofie optiku, cerebelární ataxie
SPG6	NIPA1	AD	5	druhá dekáda	P/C	Epilepsie, dysartrie, faciální dystonie, spasticita HK
SPG7	PGN/SPG7	AR	>90	variabilní	P/C	Ataxie, cerebelární znaky, polyneuropatie, atrofie optiku
SPG8	KIAA0196/WASHC5	AD	13	dospělost	P	-
SPG9	ALDH18A1	AD/AR	8	druhá dekáda	C	Katarakta, polyneuropatie, skeletální abnormality, reflux
SPG10	KIF5A	AD			P/C	Změny kognitivních funkcí, polyneuropatie, retinitis pigmentosa
SPG11	KIAA1840/SPG11	AR	>200	variabilní	C	Tenké corpus callosum, mentální deteriorace, cerebelární znaky, tremor, slabost HK
SPG12	RTN2	AD	5	časný	P	-
SPG13	HSPD1	AD	3	variabilní	P/C	Dystonie
SPG14	-	AR	-	dospělost	C	Polyneuropatie, MR
SPG15	ZFYVE26	AR	32	časný	C	Tenké corpus callosum, retinopatie, cerebelární znaky, mentální deteriorace, polyneuropatie, amyotrofie
SPG16	-	X-vázaná	-	časný	P/C	Mentální deteriorace, afázie
SPG17	BCL2	AD	2	druhá dekáda	C	Periferní neuropatie
SPG18	ERLIN2	AR	3	časný	C	Epilepsie, MR, kloubní kontraktury
SPG19	-	AD	-	dospělost	P	-
SPG20	SPG20	AR	25	časný	C	MR, dysartrie, cerebelární znaky, léze bílé hmoty, spasticita HK
SPG21	ACP33	AR	2	časný	C	Demence, tenké corpus callosum, cerebelární a extrapyramidové znaky
SPG22	SLC16A2	X-vázaná	10	časný	C	MR, atrofie svalů, dyskinezie, ataxie, atrofie svalů
SPG23	-	AR	-		C	Abnormality pigmentace, změny kognitivních funkcí, faciální a skeletální abnormality, tremor
SPG24	-	AR	-	časný	C	Pseudobulbární znaky, katarakta, polyneuropatie
SPG25	-	AR	-	dospělost	C	Katarakta, polyneuropatie
SPG26	B4GALNT1	AR	12	časný	C	Intelektuální nestabilita, kortikální artrofie, ataxie, polyneuropatie
SPG27	-	AR	-	variabilní	C	MR, dysartrie
SPG28	DDHD1	AR	8	časný	P/C	Axonální polyneuropatie, sakadované oční pohyby
SPG29	-	AD	-	druhá dekáda	C	Hyperbilirubinemie, ztráty sluchu, hiátová hernie
SPG30	KIF1A	AR	30	druhá dekáda	P/C	Senzorické neuropatie, cerebelární znaky, intelektuální nestabilita
SPG31	REEP1	AD	>50	časný	P/C	Ataxie, polyneuropatie, tremor
SPG32	-	AR	-	časný	C	MR, tenké corpus callosum

SPG33	ZFYVE27	AD	1	dospělost	C	-
SPG34	-	X-vázaná	-	variabilní	P	-
SPG35	FA2H	AR	40	časný	P/C	Mentální deteriorace, tenké corpus callosum, změny bílé hmoty
SPG36	-	AD	-	variabilní	C	Senzorické polyneuropatie
SPG37	-	AD	-	variabilní	P	-
SPG38	-	AD	-	variabilní	C	Neuropatie
SPG39	PNPLA6	AR	5	časný	C	Atrofie svalů, axonální neuropatie
SPG40	-	AD	-	dospělost	P/C	Změny kognitivních funkcí, hyperreflexie na HK
SPG41	-	AD	-	druhá dekáda	P	-
SPG42	SLC33A1	AD	1	variabilní	P	-
SPG43	C19orf12	AR	2	variabilní	C	Atrofie optiku, senzorická i motorická neuropatie, kumulace železa v mozku
SPG44	GJC2	AR	2	dospělost	C	Tenké corpus callosum, změny bílé hmoty, změny kognitivních funkcí, ataxie, skolióza, postižení HK
SPG45	-	AR	-	časný	C	MR, atrofie optiku, nystagmus
SPG46	GBA2	AR	4	časný	C	MR, katarakta, atrofie mozečku, tenké corpus callosum, hypogonadie
SPG47	AP4B1	AR	2	časný	C	Změny bílé hmoty, tenké corpus callosum, mikrocefalie, epilepsie, hypermobilita kloubů
SPG48	KIAA0415	AR	1	dospělost	P/C	Hypersignální ložiska v míše
SPG49	TECPR2	AR	3	časný	C	Opožděný psychomotorický vývoj, MR, tenké corpus callosum, dysmorfické rysy, mozkové dysfunkce
SPG50	AP4M1	AR	1	časný	C	MR, redukce bílé hmoty, atrofie cerebella
SPG51	AP4E1	AR	2	časný	C	Mikrocefalie, růstová a mentální retardace
SPG52	AP4S1	AR	2	časný	C	Růstová retardace, opožděná řeč
SPG53	VPS37A	AR	1	časný	C	Kýfóza, hypetrichóza, opožděná řeč a kognitivní funkce, spasticita na HK
SPG54	DDHD2	AR	11	časný	C	MR, strabismus, hypoplazie optického nervu, změny bílé hmoty, dysartrie, dysfágie, tenké corpus callosum
SPG55	C12orf65	AR	3	časný	C	Atrofie optiku, polyneuropatie
SPG56	CYP2U1	AR	17	časný	C	Tenké corpus callosum, změny bílé hmoty, změny kognitivních funkcí, dystonie, makulopatie
SPG57	TFG	AR	3	časný	P/C	Atrofie optiku, polyneuropatie
SPG58	KIF1C	AR	7	časný	P/C	Chorea, myoklonus, ataxie, MR, opoždění vývoje, ptóza, hluchota
SPG59	USP8	AR	1	časný	C	Nystagmus, hraniční inteligence
SPG60	WDR48	AR	1	časný	C	Neuropatie, nystagmus
SPG61	ARL6IP1	AR	2	časný	C	Mutilace na distálních částech končetin, polyneuropatie
SPG62	ERLIN1	AR	3	časný	P	-
SPG63	AMPD2	AR	2	časný	C	Tenké corpus callosum, změny bílé hmoty, neprospívání
SPG64	ENTPD1	AR	2	časný	C	Agresivita, opožděná puberta, mikrocefalie, hraniční inteligence

SPG65	NT5C2	AR	4	časný	P/C	Tenké corpus callosum, poruchy myelinizace
SPG66	ARSI	AR	1	časný	C	Hypoplazie mozku, hraniční inteligence, polyneuropatie
SPG67	PGAP1	AR	1	časný	C	Hraniční inteligence, ageneze corpus callosum, poruchy myelinizace, hypoplazie mozku
SPG68	FLRT1	AR	1	časný	C	Nystagmus, atrofie optiku, polyneuropatie
SPG69	RAB3GAP2	AR	1	časný	C	Intelektuální nestabilita, hluchota, katarakta
SPG70	MARS	AR	1	časný	C	Skolióza, kontrakturní Achillových šlach, hraniční inteligence
SPG71	ZFR	AR	1	časný	C	Tenké corpus callosum
SPG72	REEP2	AD/AR	5	časný	P	-
SPG73	CPT1C	AD	1	dospělost	p	-
SPG74	IBA57	AR	1	časný	C	Atrofie optiku, periferní neuropatie
SPG75	MAG	AR	1	časný	C	Nystagmus
SPG76	CAPN1	AR	8	dospělost	P	-
SPG77	FARS2	AR	4	časný	P/C	Encefalopatie, opoždění psychomotorického vývoje
SPG78	ATP13A2	AR	6	dospělost	C	Ataxie, dysartrie, atrofie mozečku, mentální deteriorace
SPG79	UCHL1	AR	2	časný	C	Atrofie optiku, neuropatie, ataxie, poruchy kognitivních funkcí
-	GAD1	AR	1	časný	C	MR, spastické obrny
-	CCT5	AR	1	časný	C	Mutilující sensorické neuropatie
-	OPA3	AR	1	časný	C	Atrofie optiku, chorea, ataxie, demence
-	BICD2	AR	1	časný	P	-
IAHSP	ALS2	AR	27	časný	C	Dysartrie, dysfágie
-	LYST	AR	1	dospělost	C	Ataxie, polyneuropatie
-	SACS	AR	4	časný	P/C	Neuropatie, ataxie
-	KLC4	AR	1	časný	C	-
-	TGM6	AD	1	-	C	Ataxie
-	TUBB4A	AR	3	časný	C	Dystonie, hypomyelinizace, mikrocefalie, intelektuální nestabilita
-	ABCD1	X-vázaný	2	variabilní	C	Neuropatie, změny v bílé hmotě
-	NFU1	AR	1	-	P	-
-	ATAD3A	AD	1	časný	C	Atrofie optiku, opoždění vývoje, kardiomyopatie, hypotonie
-	EXOSC3	AR	2	časný	C	Atrofie mozečku, intelektuální nestabilita
-	VCP	AD	2	časný	C	Myopatie, neuropatie
-	ATP2B4	AD	1	dospělost	P	-
-	IFIH1	AD	1	druhá dekáda	P	-
-	MT-ATP6	Maternal	1	dospělost	C	Kardiomyopatie, arytmie, mozečkový syndrom
SPOAN syndrom	KLC2	AR	2	časný	C	Deformace páteře a kloubů, atrofie optiku, polyneuropatie

3.2. Nejčastější typy HSP s autozomálně dominantním typem dědičnosti

3.2.1. SPG4

SPG4 je zdaleka nejčastějším typem HSP. Příčinou SPG4 jsou heterozygotní patogenní varianty v genu *SPAST*, popsáno bylo přes 500 mutací všech typů (missense, nonsense, splicesite, frameshift, velké delece). Zajímavé je, že nebyla zatím popsána žádná patogenní varianta v exonu 4. Krom bodových mutací byly jako příčina nemoci popsány i velké delece genu. Příčinou je pravděpodobně vysoký počet *Alu* repetitivních segmentů v intronech, a tedy predispozice genu k intragenovým přestavbám (Depienne et al., 2007). Frekvence velkých delecí může být dost vysoká, mezi německými SPG4 pacienty bylo až 21 % s velkou delecí v genu *SPAST* jako příčinou HSP (Schule et al., 2016).

Gen *SPAST* (2p24.1) má 17 exonů a byly objeveny čtyři typy *SPAST* mRNA, podle použitého iniciačního kodonu v translaci a alternativního sestřihu exonu 4 (Salinas et al., 2007). Protein spastin má dvě funkční domény, MIT (microtubule interacting and transport) na N-konci a AAA katalytickou doménu na C-konci. Většina popsaných mutací je loss-of-function (haploinsuficience) (Beetz et al., 2006).

Pro SPG4 je typický pozdější nástup (2. až 5. dekáda) a progresivnější postup klinických projevů a velká variabilita závažnosti postižení v rámci jedné rodiny. U zhruba třetiny pacientů s SPG4 se objevují problémy s imperativní mikcí (McDermott et al., 2006), tento typ HSP je popisován i s mírnými poruchami citlivosti (Schule et al., 2016). Dochází k postupnému a konstantnímu zhoršování chůze vedoucí u SPG4 většinou až k upoutání na vozík. Fenotyp může být variabilní mezi jednotlivými rodinami (interfamiliárně) a dokonce i mezi jednotlivými postiženými v jedné rodině (intrafamiliárně), i když je příčinou nemoci stejná mutace stejného genu. SPG4 je typický případ nekomplikované HSP, nicméně vzácně byly popsány i fenotypy komplikované zhoršením kognitivních funkcí (Ribai et al., 2008) či fenotyp Silver syndrom (Orlacchio et al., 2008b) a též závažnější fenotyp u mužů (Proukakis et al., 2011), otázkou je však vždy příčinná souvislost *SPAST* patogenní varianty s těmito dalšími netypickými příznaky nebo koincidence více příčin a projevů.

3.2.2. SPG3 (SPG3A)

Příčinou SPG3 (též uváděno jako SPG3A) jsou patogenní heterozygotní varianty v genu *ATL1*. Gen *ATL1* (14q22.1), má 14 exonů (13. kódujících), kóduje protein atlastin. Ten je součástí rodiny enzymů guanotin-trifosfatáz hrající biologickou úlohu při růstu axonů,

intracelulárním membránovém transportu, ale zejména má roli v morfogenezi ER a Golgiho aparátu v axonech (Zhao et al., 2001).

V genu bylo dosud popsáno necelých 70 patogenních variant všech typů, výrazně však převažují varianty typu missense, vzácně ostatní (nonsense, splice site, frame shift). Dosud byla popsána pouze jedna velká delece v genu (Sulek et al., 2013). V (Beetz et al., 2007) je popsána rodina se *SPAST* kauzální variantou (SPG4) a zároveň delecí celého genu *ATLI*, delece genu *ATLI* však neselegovala s onemocněním ani neovlivňovala fenotyp HSP (Beetz et al., 2007). Také byla popsána in-frame delece v *ATLI* genu u pacienta se sníženou hladinou atlastinu v lymfoblastech, ale normálními hladinami *ATLI* mRNA i normální GTPázovou aktivitou a normálními proteinovými interakcemi. Byla tak vyslovena hypotéza, že patogeneze není způsobena jednoduše haploinsuficiencí, ale dominantně-negativní loss-of-function mechanismem (Meijer et al., 2007).

Pro SPG3 je typický a častý nástup příznaků již v dětství do desátého roku života, nejčastěji kolem 4. roku života. Progrese nemoci ovšem není tak rychlá jako u typu SPG4, mnohdy nedochází i v průběhu několika let ke zhoršení obtíží, nicméně poruchy chůze mohou být velice závažné. Rovněž se u určitého procenta pacientů objevují poruchy sfinkterů, popisovány jsou též poruchy vibračního cití. Vzhledem k dlouhému průběhu nemoci mohou být přítomny svalové atrofie. Fenotypové spektrum u SPG3 nicméně může být poměrně široké, u pacientů s mutacemi v *ATLI* jsou popisovány i neuropatie axonálního typu a vzácně i poměrně závažné svalové atrofie a motorické postižení (Haberlova et al., 2008, Ivanova et al., 2007).

3.2.3. SPG31

Heterogenní varianty v genu *REEPI* (2p11.2) jsou uváděny jako třetí nejčastější příčina u pacientů s familiárním výskytem a autosomálně dominantním typem dědičnosti (Zuchner et al., 2006). V genu bylo popsáno přes 50 mutací všech typů včetně velkých delecí. V populačních databázích (ExAC, GnomAD) nejsou závažné varianty popsány. Protože je *REEPI* hojně exprimován na mitochondriích, předpokládá se i jeho vliv na funkci mitochondrií (Lim et al., 2015).

Fenotyp u SPG31 není jednoznačně charakterizovaný, je však v zásadě stejný jako u SPG3 a SPG4, nástup nemoci je popisován nejčastěji v druhé dekádě, popisována je opět imperativní mikce, poruchy vibračního cití (Beetz et al., 2008).

Kromě třech nejčastějších typů AD HSP se ještě relativně častěji vyskytují SPG8 a SPG10. Jejich výskyt je v různých populacích obecně nízký, prozatím neexistuje publikace, která by sumárně určovala jejich procentuální zastoupení.

3.2.4. SPG8

Heterozygotní patogenní varianty v genu *WASHC5/KIAA0196* (8q24.13) jsou zodpovědné za rozvoj SPG8. Gen *WASHC5* kóduje protein strumpellin silně exprimovaný a lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu. Do dnešní doby bylo v tomto genu popsáno 13 patogenních variant (všechny missense, jedna velká delece) (Ishiura et al., 2014) v rodinách s nekomplikovanou SPG. Mutace vedou v omezení axonálního růstu a poruchám transportu vezikulů ER mechanismem loss-of-function (de Bot et al., 2013, Clemen et al., 2010, Freeman et al., 2013).

3.2.5. SPG10

SPG10 je způsobena heterozygotními patogenními variantami v genu *KIF5A* (12q13.13) (Reid et al., 2002). Gen kóduje těžký řetězec kinesinu, většina popsáných patogenních variant je lokalizována ve vysoce konzervované motorické doméně. Dosud jich bylo popsáno 35, všech typů, žádná velká delece. Funkční studie ukazují vliv na axonální transport vedoucí k nedostatečné funkci synapsí (Ebbing et al., 2008). SPG10 se manifestuje jako nekomplikovaná i komplikovaná forma, uváděno je, že až v 10 % komplikovaných forem se jedná o SPG10 (Goizet et al., 2009b).

3.3. Nejčastější typy HSP s autozomálně recesivním typem dědičnosti

3.3.1. SPG11

Bialelické patogenní varianty *SPG11* (15q14) genu byly popsány zejména u autosomálně recesivně dědičné, komplikované HSP s tenkým corpus callosum (tzv. TCC-HSP) (Martinez Murillo et al., 1999, Stevanin et al., 2007). SPG11 je spolu s SPG7 nejčastější autosomálně recesivně dědičný typ HSP. Protein je silně exprimován v nervové tkáni, ale s větší intenzitou v mozečku, mozkové kůře a hypocampu. Protein spatacsin, kódovaný genem *SPG11*, hraje roli v růstu a rozvoji axonů a v intracelulárním transportu a má zřejmě zásadní vliv na životnost neuronů (Perez-Branguli et al., 2014). Molekulárně genetická diagnostika byla donedávna komplikovaná kvůli velikosti genu, gen obsahuje 40 kódujících exonů s více než 7000 kódujícími nukleotidy. V genu *SPG11* bylo popsáno přes 200 patogenních variant

včetně velkých delecí. Velké delece se vyskytují v genu *SPG11* s vysokou frekvencí (Conceicao Pereira et al., 2012), z důvodu vysokého výskytu *Alu* repetice v genu, které zvyšují jeho nestabilitu a tendenci k velkým přestavbám.

Fenotyp bialelických patogenních variant *SPG11* genu může být velmi variabilní, nověji byl rozšířen i o nekomplikovanou formu HSP, dokonce i o juvenilní ALS a axonální CMT neuropatii (Orlacchio et al., 2010, Montecchiani et al., 2016). Nástup onemocnění bývá popisován spíše časnější maximálně do konce druhé dekády. Pro SPG11 je typický nálezn na MRI s tenkým corpus callosum, často jsou popisovány též změny bílé hmoty i atrofie kůry mozkové. Často jsou u pacientů popisovány progredující změny kognitivních funkcí, mentální deteriorace, nystagmus, dysarthrie, dysfágie. EMG a kondukční studie často vykazují známky axonální neuropatie. V průměru po 16 letech trvání nemoci jsou pacienti s SPG11 upoutáni na invalidní vozík (Schule et al., 2016).

3.3.2. SPG7

SPG7 je spolu s SPG11 nejčastější AR dědičný typ HSP. Protein paraplegin, kódovaný genem *SPG7* (16q24.3, 17 exonů), je lokalizován na membránách na vnitřní straně mitochondrií a hraje úlohu v jejich fungování (Koppen et al., 2007). Protein má dvě funkční domény, metalo-peptidázovou a ATP-ázovou (Langer, 2000). V genu bylo popsáno přibližně 100 patogenních variant, většina z nich je missense nebo nonsense s loss-of-function efektem lokalizovaných v metalo-peptidázové doméně (Manganelli et al., 2011).

Klinický obraz SPG7 může ukazovat poměrně často vedle typické spasticity a paraparézy i možné narušení mozečkových funkcí ve smyslu spastické ataxie (Hadjivassiliou et al., 2017, Pfeiffer et al., 2015) rovněž na MRI mozku může být patrná atrofie mozečku. Pacienti si mohou stěžovat na zhoršení zraku způsobené postupnou atrofií optiku (Brugman et al., 2008, Klebe et al., 2012).

3.3.3. SPG5

Z recesivních forem se ještě relativně častěji vyskytuje SPG typu 5, i když v jednotlivých populacích jsou to mezi HSP pacienty jen jednotky procent. SPG5 je způsobena bialelickými patogenními variantami v genu *CYP7B1* (8q21.3, 7 exonů). Gen kóduje cytochrom P450 oxysterol oxysterol-7 α -hydroxylázu (Tsaousidou et al., 2008). Tento enzym je zapojen v metabolismu/degradaci cholesterolu. Jeho chybění vede k akumulaci oxysterolů, které mají neurotoxický vliv na kortikální neurony (Lim et al., 2014). V genu bylo dosud popsáno 51 patogenních variant všech typu, nebyla popsána dosud žádná velká delece v genu.

SPG5 se nejčastěji manifestuje jako nekomplikovaný fenotyp s nástupem v dětství, elektrofyziologicky mohou být přítomny patologické hodnoty MEP (motor evoked potentials), SEP (sensory evoked potentials), ale normální hodnoty EMG (Manganelli et al., 2011).

4. Patofyziologické mechanismy u HSP

Patofyziologické mechanismy vzniku HSP jsou rozmanité. Proteiny kódované různými geny (varianty v nichž způsobují HSP) mají různou funkci a úlohu v nervovém systému a v organismu, jsou zapojeny do různých metabolických drah, jsou lokalizovány v jiných buněčných strukturách atd.

Navíc různé patogenní varianty ve stejném genu mohou mít velmi odlišné fenotypové projevy, tzn. způsobovat více různých fenotypů. Příkladem je např. gen *SPG11*, bialelické patogenní varianty v něm jsou nejčastěji příčinou SPG typu 11, ale mohou též způsobovat periferní neuropatie typu CMT (Charcot-Marie-Tooth) nebo i amyotrofickou laterální sklerózu (oboje také s autozomálně recesivním typem dědičnosti).

Obecně lze patofyziologické mechanismy vzniku HSP shrnout do několika oblastí:

1. Vznik oxidativního stresu
2. Poruchy axonálního transportu a růstu axonů
3. Abnormální metabolismus lipidů
4. Poruchy myelinizace
5. Poruchy buněčných membrán, tvarování ER a dalších membránových organel

4.1. Oxidativní stres

Bialelické patogenní varianty v genu *SPG7* kódující paraplegin způsobují nedostatek proteinového komplexu, jehož je paraplegin součástí na mitochondriálních membránách. Tento proteinový komplex je zapojen v OXPHOS (oxidative phosphorylation pathway) dráze. Nedostatkem tohoto proteinu je způsoben oxidativní stres. U paraplegin-deficientních myší byla pozorována axonální degenerace s abnormálním tvarem mitochondrií a poruchou axonálního transportu (Maltecca et al., 2009, Ferreira et al., 2004).

Abnormální funkce mitochondriálního respiračního komplexu I a IV byla pozorována u pacientů, kteří nesli heterozygotní patogenní variantu v genu *REEP1* (Hewamadduma et al., 2009).

Byly popsány mutace v mitochondriálním genu MT-ATP6 kódujícím podjednotku ATP syntetázy u pacientů s maternálně děděnou HSP (Verny et al., 2011).

4.2. Poruchy axonálního transportu a růstu axonů

Gen *KIF5A* a *KIF1A* kódují proteiny, které jsou podjednotkami v proteinových komplexech ze skupiny kinesinů. Kinesiny jsou zodpovědné za transport membránových organel podél mikrotubulů v axonech (Reid et al., 2002, Lo et al., 2011). Experimentální data ukazují, že mutace v genu *KIF5A* způsobují opoždění transportu v distálních částech axonů a funkce synapsí je tak opožděná (Ebbing et al., 2008).

Protein atlastin, kódovaný genem *ATL1*, reguluje morfogenezi axonů. U zvířecích modelů vedlo chybění atlastinu v časných stádiích k závažným defektům axonů a výraznému omezení mobility (Fassier et al., 2010).

4.3. Abnormální metabolismus lipidů

Gen *CYP7B1* kóduje enzym hydroxylázu zapojenou v metabolismu cholesterolu. Chybění enzymu má za následek zvýšení hladin látek s neurotoxickým vlivem na neurony (více popsáno dále viz Kapitola 5.1.). *PNPLA6* gen kóduje fosfolipázu zapojenou v regulaci homeostázy fosfolipidů důležitých pro udržení membránové integrity. Knock-out experimenty na myších ukazují důležitost proteinu pro přežití embrya a axonální funkčnost u dospělců (Moser et al., 2004).

4.4. Poruchy myelinizace

Proteolipin-protein 1 kódovaný genem *PLP1* je důležitý pro udržení stability myelinových obalů v CNS a jejich ukotvení na axonech. Špatně složený protein v důsledku patogenní varianty zůstává v ER a dochází ke vzniku nestability myelinových obalů (Inoue, 2005).

Gen *FA2H* kóduje NADPH-dependentní monoxygenázu silně exprimovanou v oligodendrocytech a zapojenou v biosyntéze sfingolipidů. Oxygenáza syntetizuje 2-hydroxymastné kyseliny, ty jsou součástí ceramidů, tvořících hlavní jednotku myelinových obalů (Lamari et al., 2013, Zoller et al., 2008).

4.5. Poruchy buněčných membrán, tvarování ER a dalších membránových organel

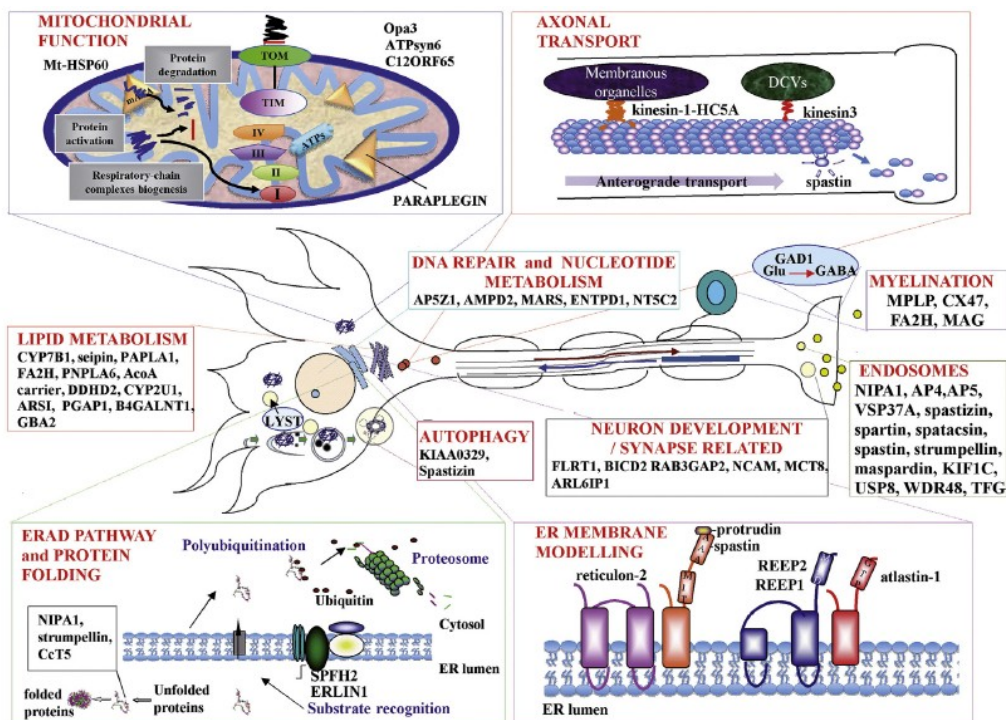
NIPA1 protein (kódovaný genem *NIPAI*) je silně zastoupen v raných endosomech a buněčných membránách. Protein obsahuje devět transmembránových domén a má vliv na endocytózu a degradaci lysosomů. Předpokládá se též jeho vliv na metabolismus hořčíku (Botzolakis et al., 2011).

Protein spastin, produkt genu *SPAST*, hraje roli ve více buněčných pochodech, mikrotubulární organizaci, transportu membránových organel a formování

endoplazmatického retikula (ER) v axonech (Hazan et al., 1999). Zkrácený *REEP1* protein způsobuje poruchy tvarování ER a negativně ovlivňuje jeho interakci s mikrotubuly v axonech. Předpokládá se, že spastin, *REEP1* protein spolu s atlastinem kooperují v transportu proteinů podél axonálních mikrotubulů a chybní některého z těchto tří proteinů (resp. loss of function) vede k poruchám dlouhých axonů kortikospinálního traktu (Park et al., 2010).

Obr.5: Proteiny kódované HSP geny a různé úrovně jejich funkce v buňkách.

Převzato z Lo Giudice et al. 2014.



5. Možnosti léčby

Kauzální terapie není doposud možná ani u jednoho typu HSP, a proto v současnosti nalezení kauzální varianty dosavadní léčbu zásadněji neovlivní. Možnosti léčby jsou v zásadě totožné pro pacienty s kauzálními variantami v různých genech, tzn. s různými typy HSP.

V současnosti dostupná léčba je pouze symptomatická, cílená na zmírnění příznaků spasticity, bolesti nebo poruch mikce. Pravidelná rehabilitace zůstává hlavním pilířem léčby. K dosažení nejlepších léčebných výsledků bývá kombinována s podpůrnou farmakologickou léčbou myorelaxancii. Na zmírnění svalové spasticity se nejčastěji používá baclofen (může být podáván i intratekálně). Pro zlepšení stability a chůze je aplikován botulotoxin A do lýtkových svalů. Efekt léčby trvá několik měsíců. S postupem nemoci však i za použití veškeré dostupné léčby potřebuje většina pacientů pomůcky k podpoře chůze včetně vozíku.

V současné době u nás neexistuje centrum, které by bylo specializováno pouze na léčbu a diagnostiku hereditárních spastických paraparéz. Ve většině fakultních nemocnic i v některých krajských nemocnicích fungují komplexní i regionální centra pro léčbu spasticity, (<http://www.expy.cz/centra-spasticity/>).

5.1. První potenciální cílená léčba u SPG5

V roce 2014 byla publikována kazuistika dvou pacientů s SPG typu 5, kdy byl pozorován potenciální terapeutický vliv podávání simvastatinu (Mignarri et al., 2014). V roce 2017 publikoval tým německých lékařů a vědců první dvojité zaslepenou placebo – kontrolovanou studii, ve které bylo použita cílená léčebná strategie u SPG typu 5. Autoři potvrdili kumulaci oxysterolů v séru i mozkomíšním moku u pacientů s SPG5. Navíc hladina oxysterolů korelovala se závažností postižení a délkou trvání onemocnění. U 34 pacientů byl podáván atorvastatin (40 mg/den) po dobu 9 týdnů. Hladiny oxysterolů byly po léčbě statisticky významně sníženy u pacientů, kterým byl podáván atorvastatin, ale ne u těch, kterým byl podáváno placebo (Schols et al., 2017). K podobným výsledkům došla v letošním roce i skupina francouzských vědců (Marelli et al., 2018). Jedná se o vůbec první studie ukazující potenciální kauzální léčbu prozatím u jediného – navíc vzácného – typu HSP. U SPG5 je výhodou, že je přesně známa metabolická dráha a vliv enzymu kódovaného genem *CYP7B1* na ní, což umožňuje cílit vývoj léčby a kauzálního léku.

5.2. Zvířecí modely a genová terapie

Zvířecí modely, zejména na myších, poskytují nejen možnost zkoumání patofyziologického mechanismu nemoci, ale ukazují cestu potenciální léčby. Některé látky např. vinblastin (Orso et al., 2005) nebo nocodazol (Trotta et al., 2004) se zdají mít pozitivní vliv na snížení příznaků HSP fenotypu in vivo na modelech *Drosophila*.

Pomocí genového transferu za použití virového vektoru došlo u paraplegin-deficientních myší k obnově správné morfologie mitochondrií a zastavení neuropatologických změn v periferních nervech (Pirozzi et al., 2006). Paraplegin je kódován genem *SPG7* a patogenní varianty v něm jsou příčinou SPG typu 7.

Rozvoj metod editace genomu v posledních letech (CRISPR/Cas9) slibuje možnost léčby přímo na úrovni genetické informace. U některých typů neurodegenerativních chorob se podařilo v nedávné době vyvinout léčbu působící přímo v buňkách na úrovni genomu, resp. transkripce nebo translace. Příkladem je lék Translarna u Beckerovy muskulární dystrofie (PTC Therapeutics Inc., USA), nebo lék Spinraza (Biogen Idec, Ltd., Velká Británie) u svalové muskulární atrofie.

6. Možnosti molekulárně genetického vyšetření

Stanovení přesné diagnózy HSP, a hlavně určení jejího typu je možné pouze s použitím molekulárně genetických vyšetření. Teoreticky je sice možné doplnit základní klinickou a neurologickou diagnostiku o biochemické vyšetření, které by poukázalo na některá typ HSP - např. u pacientů SPG 5 jsou prokázány vyšší hladiny 27-hydroxysterolů v séru i mozkomíšním moku (viz výše), ale vzhledem k nízké frekvenci tohoto typu HSP mezi pacienty by výtěžnost vyšetření nebyla vysoká. I některé fenotypové znaky jsou typické např. tenké corpus callosum pro SPG11, ale může být i u SPG35 atp.

Určení typu nemoci je pro rodinu důležité, lze pak zásadně upřesnit genetickou prognózu, resp. riziko opakování u příbuzných a je nezbytné pro cílenou genetickou prevenci včetně prenatální diagnostiky. U častějších typů nemoci je možné upřesnit i klinickou prognózu, tedy lépe odhadnout přibližný průběh nemoci.

Možností molekulárně genetického vyšetření je v zásadě pět:

1. Sangerovo sekvenování kódujících a přilehlých oblastí jednotlivých genů
2. MLPA pro detekci velkých delecí v jednotlivých genech
3. Cílené NGS sekvenování panelu genů popsanych s nemocí

4. Celoexomové sekvenování (WES)
5. Celogenomové sekvenování (WGS)

Vzhledem k vysoké frekvenci SPG4 mezi HSP pacienty má v dnešní době Sangerovo sekvenování jednotlivých genů smysl už jen u genu *SPAST*, zejména u familiárních (nemoc ve více generacích) AD (autozomálně dominantních) pacientů/rodin, kde je procento objasnitelnosti dost vysoké.

Sekvenování panelu genů se stalo již běžným rutinním diagnostickým vyšetřením, vyšetření *SPAST* genu už tak dnes bývá zahrnuto do NGS panelu genů (Balicza et al., 2016, Burguez et al., 2017).

HSP je klinicky i geneticky vysoce heterogenní závažné neurologické onemocnění, jehož genetické pozadí nebylo až donedávna možné podrobněji zmapovat. Nebylo tak ani možné podrobněji klinicky popsat jednotlivé typy HSP a to nejen u českých pacientů, ale obecně. Rozvoj nových molekulárně genetických technik z několika posledních let otevírá možnost postupně doplňovat chybějící genetické i klinické poznatky o HSP. Obecně je zatím málo informací o genetickém spektru HSP v různých populacích, chybí i detailnější poznatky o průběhu onemocnění u jednotlivých typů HSP. V posledních letech bylo popsáno mnoho nových genů, jejichž patogenní varianty způsobují HSP. Znalost HSP genů a dál i znalost biologické úlohy proteinů, které jsou jimi kódovány, je ale nezbytná pro hledání kauzální léčby.

Použití nových molekulárně genetických technik NGS u souboru českých pacientů s HSP umožní u častěji se opakujících typů získat jejich podrobnější klinický popis a dále dovolí získat unikátní molekulárně epidemiologická data týkající se onemocnění HSP v ČR.

II. Cíle práce

1. Vybrat cca 100 českých pacientů se suspektní hereditární spastickou paraparézou (HSP), kteří mají jako příčinu nemoci vyloučenou kauzální variantu v genu *SPAST* (tzn. non-SPG4 pacienti) a pomocí cíleného masivně paralelního NGS sekvenování u nich vyšetřit všechny kódující a přilehlé oblasti v panelu vybraných genů spojovaných s nekomplikovanou HSP.
2. Zmapovat genetické spektrum u českých non-SPG4 pacientů s HSP a zjistit tak molekulárně epidemiologickou charakteristiku českých pacientů s HSP. Tato data prozatím u české populace úplně chybí.
3. Zjistit, v jakém procentu se na HSP podílejí varianty v dosud popsáných genech u českých pacientů a které genetické typy HSP jsou v ČR častější a významné (krom SPG4).
4. Zjistit, ve kterých genech jsou patogenní varianty častější a popsat klinické charakteristiky častějších typů HSP.
5. Navrhnout optimální postup molekulárně genetických vyšetření pacientů s HSP.

III. Materiál a metody

1. Soubor HSP pacientů

Vyšetřili jsme soubor českých pacientů se suspektní hereditární spastickou paraparézou, kteří byli zasláni v letech 2005 – 2017 k diagnostickému DNA vyšetření genu *SPAST* (SPG4) pomocí Sangerova sekvenování do Centra lékařské genetiky a reprodukční medicíny GENNET, s.r.o. Někteří pacienti byli indikováni též k vyšetření genu *ATLI* (SPG3) Sanger sekvenováním, u několika málo byl klasicky sekvenován gen *REEPI* (SPG31).

Všichni pacienti mají **nekomplikovaný typ HSP**. V souboru není žádný pacient s komplikovanou HSP ve smyslu těžkého mentálního postižení, opoždění psychomotorického vývoje, s významnými komplikujícími znaky: epilepsie, slepota, hluchota, apod.

U 336 pacientů ze všech zasláných pacientů nebyla pomocí Sangerova sekvenování genu *SPAST* (případně *ATLI*, výjimečně *REEPI*) ani pomocí MLPA genu *SPAST* nalezena kauzální varianta (tzv. non-SPG4 pacienti). V této skupině bylo 100 pacientů s familiárním výskytem nemoci (dále značení jako FAM), tzn. stejné obtíže se vyskytly alespoň u jednoho dalšího člena rodiny, a to buď ve více generacích nebo u dalšího/dalších jedinců stejné generace. U 157 pacientů byl popsán sporadický výskyt nemoci v rodině tzn. jen u tohoto jediného pacienta (dále značení SP). Z těchto dvou skupin pacientů (FAM a SP) byli vybíráni kandidáti pro NGS sekvenování panelu genů spojených s nekomplikovanou HSP dle kritérií uvedených dále (viz kapitola III:1.1). U zbylých 79 pacientů nebyla k dispozici žádná další indikace ani další upřesňující informace o klinickém obrazu, kopie neurologických zpráv atd. Z těchto pacientů nemohli být pro nedostatek informací vybráni pacienti pro NGS sekvenování panelu HSP genů.

Pro NGS sekvenování panelu genů byli nejprve vybíráni pacienti s familiárním výskytem onemocnění, kde je jistější, že se jedná o genetické onemocnění a šance nalezení kauzální varianty se tak zvyšuje. Celkem jsme pomocí NGS sekvenování panelu genů vyšetřili 51 familiárních pacientů. Dále bylo vyšetřeno 45 ze skupiny sporadických pacientů vybraných přísně tak, aby neurologicky s jistotou splňovali kritéria spastické paraplegie. Někteří pacienti byly pro vyšetření zařazeni na osobní žádost neurologů. Z celkových 96 vyšetřených pacientů bylo 22 dětských pacientů do 18-ti let (23 %), krom dvou všichni se

sporadickým výskytem nemoci, jeden familiární pacient mladší 18 let měl stejně postiženého bratra, druhý otce se stejným postižením.

Od všech pacientů byla k dispozici a ke všem analýzám byla použita genomová DNA izolovaná z leukocytů periferní krve. DNA byla izolována různými metodami v různých laboratořích. Ve výjimečných případech byla DNA izolována ze slin kitem OraGene OG 500 (DNA Genotec Inc., Kanada). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s genetickým testováním pro objasnění příčiny svého neurologického onemocnění a všichni pacienti vybraní pro NGS sekvenování panelu genů podepsali souhlas s využitím jejich DNA vzorku pro další výzkumné účely a se skladováním DNA pro tyto účely.

1.1. Algoritmus výběru pacientů pro NGS panelu genů

Pacienti pro vyšetření sekvenováním panelu genů byli vybíráni podle následujících kritérií:

1. Pacienti, u nichž byly již vyloučeny patogenní varianty v genu *SPAST* jako příčina nemoci (non-SPG4): Klasickým Sanger sekvenováním všech 17 kódujících exonů včetně přilehlých intronových oblastí nebo následně i pomocí MLPA pro *SPAST* gen.
2. Výběr dle klinických kritérií: pacienti museli splňovat jasné klinické příznaky HSP – podrobněji viz. kapitoly I:1.2. a 1.4. Vylučujícími znaky byly: asymetrie postižení, převažující postižení horních končetin, převažující ataxie.
3. Výběr dle rodinné anamnézy: přednostně byli vybíráni pacienti s pozitivní rodinnou anamnézou, kde se nemoc vyskytla ve více generacích nebo u více jedinců stejné generace (sourozenci). Sporadiční pacienti (jediný výskyt nemoci v rodině) byly zařazeni pouze ti s vysoce suspektní diagnózou HSP podle neurologického nálezu.

1.2. Výběr genů pro NGS panelu genů

Pacienti vyšetření pomocí NGS panelu genů byly postupně zařazováni, celkem byly vytvořeny tři skupiny vyšetřených pacientů (v roce 2015, 2016 a 2017). Panel genů byl pro každou skupinu upraven podle nových informací a poznatků z literatury a databází. Použity tak byly celkem tři designy zahrnující 28 (verze 1), 38 (verze 2) a 46 genů (verze 3). V rámci jednotlivých designů byly postupně vyšetřeno 45 (verze 1), 27 (verze 2) a 24 (verze 3) pacientů.

V souvislosti s HSP bylo popsáno nyní již 70 různých genů, všechny však nebyly zahrnuty. Mnohé geny byly popsány jen v jedné rodině celosvětově a s takovým fenotypem, který neodpovídá fenotypu našich pacientů. Vzhledem k tomu, že v souboru českých pacientů jsou pouze pacienti s nekomplikovanou HSP, do designu panelu genů byly zahrnuty jen geny, které odpovídají takovému fenotypu. Vyloučeny byly geny, u nichž byla spastická paraparéza pospána spíše jen jako doprovodný klinický příznak doplňující celkový syndrom.

První panel genů Verze 1 vycházel zejména ze dvou review: Fink (Fink, 2013) a Lo Giudice (Lo Giudice et al., 2014). Další dvě verze panelů Verze 2 a Verze3 vycházely krom dvou zmíněných review zejména z databáze HGMD Professional (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/>), kde byly podrobněji prostudovány konkrétní fenotypy u jednotlivých genů z uvedených publikací a na základě toho některé geny přidány a několik naopak vyřazeno. Do každého verze panelu genů byly doplněny nově popsané geny.

1.3. Soubor vyšetřených pacientů

Všech 96 zařazených pacientů bylo vyšetřeno postupně ve třech skupinách:

1. Rok 2015; skupina 45 pacientů. DNA knihovna pro NGS připravena v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie metodou HaloPlex Target Enrichment (Agilent Technologies, US). Počet vyšetřených SPG genů: 28 (verze 1).
(pozn. Počet vyšetřených genů pomocí NGS u této skupiny pacientů byl ve skutečnosti 92, zbylých 64 genů ale byly geny popsané s neuropatií typu Charcot – Marie – Tooth (CMT). Vzhledem k finanční výhodnosti objednaného kitu pro HaloPlex Target Enrichment byl objednán design se spojenými probami pro SPG a CMT geny pro 96 vzorků. Zařazené geny pro CMT byly též zhodnoceny, ale u všech pacientů s negativním výsledkem.)
2. Rok 2017; skupina 27 pacientů. DNA knihovna pro NGS připravena v servisní laboratoři MacroGen, Korea metodou SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies, US). Počet vyšetřených SPG genů: 38 (verze 2).
3. Rok 2018; skupina 24 pacientů. DNA knihovna pro NGS připravena v servisní laboratoři MacroGen, Korea metodou SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies, US). Počet vyšetřených SPG genů: 46 (verze 3).

Tab.3: Geny zahrnuté v jednotlivých designech pro sekvenování panelu genů

Verze 1	Verze 2		Verze3	
<i>ATL1</i>	<i>ABCD1</i>	<i>RNASEH2B</i>	<i>ABCD1</i>	<i>NT5C2</i>
<i>BSCL2</i>	<i>ADAR1</i>	<i>RTN2</i>	<i>ADAR1</i>	<i>PLP1</i>
<i>C19orf12</i>	<i>ALS2</i>	<i>SLC33A1</i>	<i>ALS2</i>	<i>PNPLA6</i>
<i>CYP7B1</i>	<i>ATL1</i>	<i>SPAST</i>	<i>ATL1</i>	<i>REEP1</i>
<i>DDHD1</i>	<i>BICD2</i>	<i>SPG11</i>	<i>ATP2B4</i>	<i>REEP2</i>
<i>ERLIN1</i>	<i>BSCL2</i>	<i>SPG7</i>	<i>BICD2</i>	<i>RNASEH2B</i>
<i>GJC2</i>	<i>CPT1C</i>	<i>VCP</i>	<i>BSCL2</i>	<i>RTN2</i>
<i>HSPD1</i>	<i>CYP2U1</i>	<i>ZFR</i>	<i>C12orf65</i>	<i>SLC33A1</i>
<i>KIAA0196</i>	<i>CYP7B1</i>	<i>ZFYVE26</i>	<i>CAPN1</i>	<i>SPAST</i>
<i>KIAA0415</i>	<i>DDHD1</i>	<i>ZFYVE27</i>	<i>CPT1C</i>	<i>SPG11</i>
<i>KIF1A</i>	<i>DNM2</i>		<i>CYP2U1</i>	<i>SPG7</i>
<i>KIF1C</i>	<i>ERLIN1</i>		<i>CYP7B1</i>	<i>TECPR2</i>
<i>KIF5A</i>	<i>FA2H</i>		<i>DDHD1</i>	<i>TFG</i>
<i>NIPAI</i>	<i>FARS2</i>		<i>DNM2</i>	<i>TGM6</i>
<i>NT5C2</i>	<i>HSPD1</i>		<i>ERLIN1</i>	<i>TUBB4A</i>
<i>PLP1</i>	<i>KIAA0196</i>		<i>EXOSC3</i>	<i>VCP</i>
<i>PNPLA6</i>	<i>KIAA0415</i>		<i>FA2H</i>	<i>ZFR</i>
<i>REEP1</i>	<i>KIF1A</i>		<i>FARS2</i>	<i>ZFYVE26</i>
<i>RTN2</i>	<i>KIF1C</i>		<i>HSPD1</i>	
<i>SLC33A1</i>	<i>KIF5A</i>		<i>IFIH1</i>	
<i>SPAST</i>	<i>NFU1</i>		<i>KIAA0196</i>	
<i>SPG11</i>	<i>NIPAI</i>		<i>KIAA0415</i>	
<i>SPG20</i>	<i>NT5C2</i>		<i>KIF1A</i>	
<i>SPG21</i>	<i>PLP1</i>		<i>KIF1C</i>	
<i>SPG7</i>	<i>PMCA4</i>		<i>KIF5A</i>	
<i>ZFR</i>	<i>PNPLA6</i>		<i>KLC4</i>	
<i>ZFYVE26</i>	<i>REEP1</i>		<i>NFU1</i>	
<i>ZFYVE27</i>	<i>REEP2</i>		<i>NIPAI</i>	
28 genů	38 genů		46 genů	

2. Použité metody

2.1. Sangerovo sekvenování

Pro klasické / Sangerovo sekvenování PCR produktů byl použit kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, US). Sekvenační produkty byly analyzovány za použití kapilární elektroforézy na přístroji ABI 3130 (Applied Biosystems, US) a software Sequencing Analysis Software v6.1 (ThermoFisher Scientific, US).

Sangerovo sekvenování bylo použito pro ověření nalezených variant z NGS sekvenování, dále pro ověření přítomnosti nalezených variant u příbuzných v segregančních analýzách.

2.2. MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Metoda MLPA byla použita pro detekci přítomnosti velkých delecí genu *SPAST* u těch pacientů, kde nebyla zachycena kauzální varianta pomocí klasického sekvenování, ještě před jejich zařazením k vyšetření NGS sekvenováním panelu HSP genů. Použit byl kit P165-C2 HSP probe mix (MRC Holland, Nizozemsko), který obsahuje proby pro všechny kódující exony genu *SPAST* a také proby pro všechny kódující exony genu *ATL1*.

Dále byly použity kity P213 HSP-mix (MRC Holland, Nizozemsko) pro ověření přítomnosti velké delecce v genu *SPG7* u vybrané rodiny a kit P306 SPG11 probemix (MRC Holland, Nizozemsko) pro ověření přítomnosti velké delecce v genu *SPG11* u několika pacientů. V jednom případě byl použit kit P211-B3 HSP region probemix ke zjištění rozsahu delecce u pacienta, u něhož byla detekována delecce krajního (17.) exonu genu *SPAST*. Kit obsahuje proby pro oblasti sousedící s genem *SPAST*.

Fragmentační analýza MLPA produktů byla provedena na přístroji ABI 3130 (Applied Biosystems, US) s přidaným interním size standardem GeneScan 500 ROX Dye Size Standard (ThermoFisher Scientific, US). Data byla odečtena za použití volně dostupného programu Coffalyzer (<https://support.mlpa.com/>; Coffalyzer.net; MRC Holland, Nizozemsko) poskytovaného výrobcem MLPA kitů.

2.3. NGS sekvenování panelu genů

K NGS sekvenování vybraného panelu genů je nejprve potřeba vytvořit design prob k cílenému obohacení (target enrichment) vybraných cílových oblastí zájmu. Za použití těchto prob je pak vytvořena DNA knihovna pro vlastní NGS sekvenování.

2.3.1. Design prob pro cílené obohacení vybraných genů

K designu prob pro cílené obohacení kódujících oblastí vybraných genů byl použit volně dostupný software SureDesign <https://earray.chem.agilent.com/suredesign/> (Agilent Technologies, US). Design byl vytvořen tak, aby pokrýval všechny kódující exony a přilehlé oblasti genů plus 5' a 3' UTR oblasti. Výběr genů byl popsán dříve (Kapitola III:1.2. a Tab.5). Jedná se o proby hybridizační a program nabízí možnost zvolit pro jejich návrh několik úrovní specificity:

1/ pro proby na HaloPlex Target Enrichment System (viz III:/2.3.2.) od maximální specificity na úkor pokrytí vybraných oblastí po maximální pokrytí na úkor specificity.

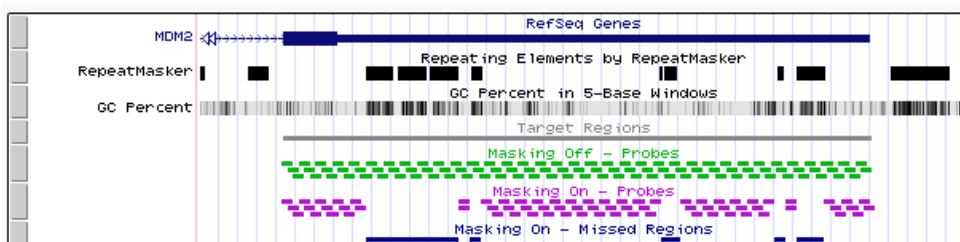
2/ pro design prob na SureSelect Target Enrichment System je možnost volit několik úrovní tzv. boostingu, maskingu a denzity. Vyšší boosting znamená zvýšení počtu prob pro GC bohaté oblasti. Masking se týká repetitivních oblastí, které jsou při maskingu vynechány z návrhu prob. Vyšší denzita znamená větší počet postupně se překrývajících prob pro jednu oblast. (Obr.6)

Proby byly vždy navrhovány od nejvíce specifických kritérií (max. specificity/ max. boosting, max.masking, nejvyšší denzita). Oblasti nepokryté při nejpřísnějších kritériích byly znovu použity pro návrh se sníženou přísností. Tak bylo postupováno v několika krocích, až byly pokryty všechny oblasti. Proby navržené v jednotlivých krocích byly nakonec spojeny do jednoho velkého designu. Navržené proby byly syntetizovány firmou Agilent Technologies (Agilent Technologies, US).

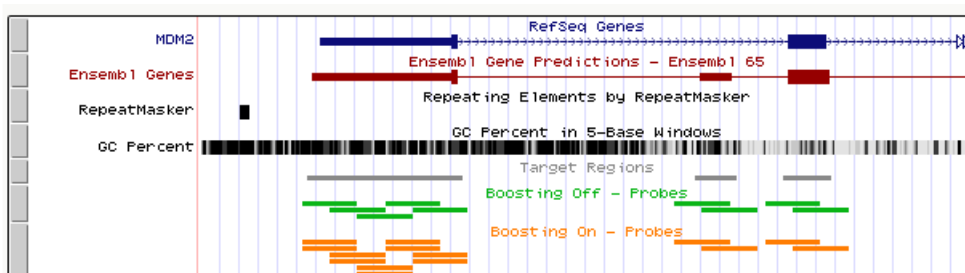
Obr.6: Target Enrichment SureSelect Kit: možnosti pro návrh prob

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

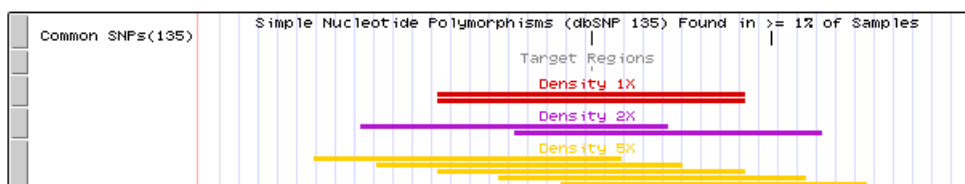
Masking



Boosting



Density



2.3.2. Target Enrichment a příprava DNA knihovny

K cílenému obohacení vybraných úseků genů a přípravě DNA knihovny pro NGS sekvenování byly použity dvě technologie, resp. různé kity: HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies, US) a SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies, US).

Obě metody fungují na v zásadě podobném principu, kde příprava DNA knihovny proběhne v několika krocích:

1. Nafragmentování genomické DNA
2. Hybridizace navržených prob na cílené vybrané úseky DNA
3. Amplifikace cílových oblastí.

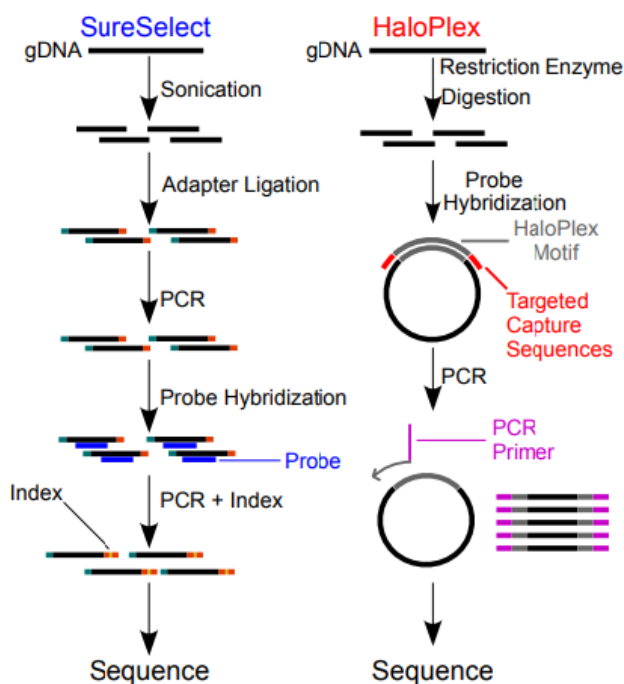
Rozdíl mezi metodami HaloPlex Target Enrichment a SureSelect Target Enrichment je zejména ve způsobu nafragmentování DNA. U metody HaloPlex je nafragmentování DNA cílené za použití osmi párů restikčních enzymů (endonukleáz; součást kity HaloPlex Target

Enrichment), zatímco u metody SureSelect je použito náhodné nafragmentování ultrazvukem pomocí sonifikátoru Covaris (Covaris, Inc., US). U metody HaloPlex jsou navíc před amplifikací pomocí PCR hybridizované úseky selektovány (capturing) pomocí magnetických kuliček potažených streptavidinem.

Ke kontrole kvality připravené knihovny byl použit Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, US), výsledky odečteny pomocí Agilent 2100 Expert Software (Agilent Technologies, US).

Vzhledem k vysoké ceně sonifikátoru Covaris a současně větší spolehlivosti a robustnosti metody SureSelect Target Enrichment, byla k DNA knihovna části vzorků (tedy těch, které byly analyzovány metodou SureSelect Target Enrichment) připravena v servisní laboratoři firmy Macrogen, Korea.

Obr.7: Princip metody SureSelect a HaloPlex firmy Agilent Technologies použitých k přípravě DNA knihoven pro NGS sekvenování. Převzato z (Samorodnitsky et al., 2015)



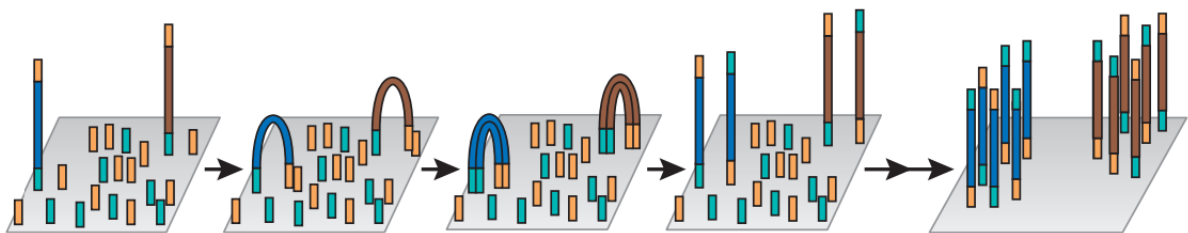
2.3.3. Vlastní NGS sekvenování

Vlastní NGS sekvenování bylo provedeno na platformě Illumina (Illumina Inc., US). Naše laboratoř nevládní sekvenátor pro NGS, proto bylo k sekvenování využito servisní laboratoře Macrogen, Korea nebo EMBL, Heidelberg, Německo. NGS sekvenování DNA

knihoven panelu genů proběhlo na přístroji MiSeq nebo HiSeq 2500, exomové sekvenování na přístroji HiSeq 4000 (oba Illumina Inc., US).

Platforma Illumina používá „bridge PCR“, PCR produkty připravené knihovny se naváží na adaptory lokalizované na flowcell, která je jimi pokryta. Postupně probíhá PCR, při které je „real time“ odečítána vznikající sekvence v jednotlivých sekvencích. Vznikající PCR produkty zůstávají v blízkosti původního templátu v tzv. clusteru. Po proběhnutém runu každý cluster obsahuje zhruba 1000 kopií původního templátu.

Obr.8: *Princip Illumina NGS sekvenování.* Převzato z (Shendure and Ji, 2008)



2.4. Bioinformatické vyhodnocení

Raw data z NGS sekvenování ve formátu FASTQ byla bioinformaticky dále zpracována v naší laboratoři za použití několika nástrojů. Bioinformatické zpracování data probíhá obecně v několika krocích:

1. Alignment k referenčnímu genomu
2. Variant calling – vyhledání variant na základě zadaných kritérií
3. Anotace nalezených variant

2.4.1. Alignment

Pro alignment a variant calling byly použity dva nástroje: 1. volně dostupný software **SureCall** (Agilent Technologies, US), který je vytvořen firmou Agilent Technologies přímo pro vyhodnocování dat z NGS při použití jejich kitů, tzn. HaloPlex Target Enrichment i SureSelect Target Enrichment, 2. komerční software **NextGene** (Softgenetics, US), který je možné použít pro hodnocení NGS dat při použití různých kitů pro přípravu knihoven. Oba software používají pro alignment inkorporovaný Burrows-Wheeler aligner BWA-MEM (Li and Durbin, 2009), v obou případech byla FASTQ data alignována k genomu Human hg19 (GRCh37).

2.4.2. Variant Calling

Při variant callingu jsou pomocí bioinformatického software vytvořeny tzv. vcf soubory, což je soubor všech genomických variant/odchylek od referenční sekvence pro každý jednotlivý vzorek. Poněvadž byly raw (fastq) data analyzována pomocí dvou nezávislých software, pro každý vzorek byly získány dva vcf soubory a každý byl hodnocen zvlášť. Tento přístup byl zvolen pro maximální záchytnost použitých analýz, neboť každý z použitých software (SureCall a NextGene) používá pro variant calling jiná kritéria. Zejména u metody HaloPlex Target Enrichment bylo v některých oblastech nižší pokrytí než odpovídá defaultnímu pokrytí pro vyvolání varianty u software SureCall (30x) a varianta by tak nebyla zařazena do vcf souboru.

U software SureCall i NextGene bylo pro variant calling použito defaultní nastavení (SureCall: Minimum quality for base: 30, Minimum number of reads supporting variant allele: 10. NextGene: Mutation percentage ≥ 20 %, SNP allele count ≥ 3 , total coverage count ≥ 5). Obě nastavení jsou platná jak pro SNPs, tak pro malé indels.

2.4.3. Anotace vcf souborů/nalezených variant

Vcf soubory všech vzorků, které byly sekvenovány společně (vždy konkrétní verze designu) byly spojeny do tzv. spojeného vcf souboru pomocí lokální instalace nástroje Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (Afgan et al., 2016) příkazem vcf combine tool.

Oba spojená vcf (zvlášť ze SureCall a z NextGene) byla dále anotována pomocí několika nástrojů. Vcf soubory vzorků analyzovaných designem verze 1 (28 genů) byly anotovány pomocí volně dostupného nástroje Annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org/>) (Wang et al., 2010, Yang and Wang, 2015) a komerčního GenomeTrax (BioBase International, Quiagen Company, US). Spojené vcf soubory z obou následujících designů (verze 2 a 3) byly anotovány pomocí komerčního software AlamutBatch (Interactive Biosoftware, Francie).

2.4.4. Hodnocení patogenity variant

Hodnocení patogenity variant proběhlo v několika krocích. Za prvé byly ručně fitrovány ze spojeného vcf souboru jen ty varianty, které se ve skupině vyšetřovaných pacientů vyskytovaly u tří a méně pacientů. Dále byly varianty fitrovány na základě frekvencí v uvedených v populačních databázích: ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>), později GnomAD Browser (<http://gnomad.broadinstitute.org/>), 1000 Genomes (<http://www.internationalgenome.org/>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Hodnoceny byly všechny varianty, které měly frekvenci v uvedených databázích menší nebo rovnu 2 %.

Nalezené varianty byly vizualizovány pomocí software Alamut Visual (Interactive Biosoftware, Francie), který má inkorporované predikční programy pro in silico analýzu: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) a Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>) pro missense varianty, MaxEntScan (http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) a NNSplice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) pro splice site/sestřihové varianty. Predikční programy pro sestřihové varianty hodnotí potenciální vliv na sestřih ve škále 0 – 100 % od nejmenší k nejvyšší pravděpodobnosti ovlivnění splicingu. AlamutVisual také automaticky u hodnocených variant generuje informaci o konzervovanosti nukleotidu a aminokyseliny s uvedeným Grantham skóre (vyjadřuje fyzi chemickou rozdílnost aminokyselin, stupnice 0-215 od nejmenšího rozdílu po největší).

Naše laboratoř má předplacený přístup do databáze HGMD® Professional (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/>, Ouiagen Bioinformatics, US), informace z níž jsou též propojeny s Alamut Visual programem a byly tak získány informace o tom, zda již byla varianta dříve popsána v literatuře, kde a u jakých rodin/pacientů. U některých variant bylo též přihlédnuto k informacím z databáze ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) jako doplňující kritérium.

Patogenita suspektních variant byla posouzena in silico také dle ACMG kritérií (Richards et al., 2015), kdy byly varianty podle všech dostupných informací zařazeny do tříd 1-5 dle závažnosti.

Přítomnost varianty byla vždy potvrzena Sangerovým sekvenováním. U suspektních variant byla pro potvrzení kauzality provedena segregáční analýza v rodině, pokud byly dostupné DNA vzorky dalších členů rodiny. Jasná kauzalita byla stanovena jen u takové varianty, kde byla potvrzena segregace varianty s onemocněním v rodině anebo byla varianta již popsána v literatuře a fenotyp odpovídal fenotypu pacienta.

2.4.5. Analýza Copy Number Variations (CNV)

Pro analýzu velkých delecí z NGS dat byly použity dva bioinformatické nástroje. Oba jsou součástí programu NextGene (Softgenetics, US), viz dříve. Byl použit nástroj CNV Comparison Tool a nástroj Beta Batch CNV Tool.

CNV Comparison Tool je založen na principu hodnocení pokrytí analyzovaných oblastí pomocí hidden Markov statistického modelu (HMM). Pro co možná největší

spolehlivost analýzy jsme vytvořili vlastní algoritmus CNV vyhodnocení pomocí tohoto nástroje. Každý vzorek byl vyhodnocen nezávisle 3x vždy proti skupině tří kontrol a 1x proti všem devíti kontrolám dohromady. Pro maximální citlivost analýzy a zohlednění klastrování a pokrytí jendotlivých analyzovaných oblastí v konkrétním sekvenačním běhu je optimální, aby byly kontroly i hodnocené vzorky z jednoho sekvenačního běhu (v našem případě design/verze 1, 2 a 3) a i metodika přípravy knihovny by měla být shodná (HaloPlex, SureSelect). Jako kontroly byly proto použity vzorky, u kterých byla nalezena kauzální bodová patogenní varianta. Protože byl počet objasněných pacientů ve všech třech skupinách pacientů (verze 1,2,3) menší než devět, byly dále jako kontroly použity náhodně vybrané vzorky ze stejného sekvenačního běhu.

Beta Batch CNV Tool je založen na normalizaci pokrytí jednotlivých oblastí, kde jsou srovnány jednotlivé oblasti proti sobě a jednotlivé vzorky proti sobě. Pro hranici delece byla zvolena hranice 0,7 proti normálním vzorkům, pro duplikaci hranice 1,3.

2.5. Celoxomové sekvenování (WES)

U několika vysoce suspektních pacientů, u nichž nebyla pomocí NGS sekvenování panelu genů nalezena příčina nemoci, bylo provedeno celoxomové sekvenování (WES). Pro přípravu DNA knihovny i vlastní sekvenování bylo využito servisní laboratoře MacroGen, Korea. K přípravě knihovny byl použit kit SureSelect All Exon Kit v6 (Agilent Technologies, US). Použitý kit obsahuje hybridizační proby pro kódující oblasti dosud popsáných genů. Princip přípravy knihovny je obdobný jako u přípravy DNA knihovny pro sekvenování panelu genů: 1/ DNA je fragmentována pomocí sonifikátoru Covaris, 2/ hybridizace prob a selekce hybridizovaných úseků pomocí magnetických kuliček, 3/ amplifikace selektovaných úseků, 4/ vlastní sekvenování. Vlastní sekvenování bylo provedeno na přístroji HiSeq 4000 (Illumina, Inc., US)

Raw data z celoxomového sekvenování byla bioinformaticky vyhodnocena v naší laboratoři. Postup bioinformatického vyhodnocení je podobný jako u dat ze sekvenování panelu genů. Fastq data byla analyzována opět dvěma nezávislými software: 1) SureCall (Agilent Technologies, US) a 2) vlastní lokální bioinformatické vyhodnocení podle protokolu GATK verze 3.8 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>).

2.5.1. Hodnocení vcf souborů

K hodnocení nalezených variant u pacienta ve formátu vcf byly použity dva přístupy. 1) hodnocení pomocí lokální instalace volně dostupného nástroje Exomiser (www.sanger.ac.uk/science/tools/exomiser) (Smedley et al., 2015) a 2) další anotace vcf souboru pomocí několika nástrojů – viz Kapitola III:/2.5.1.B. Oběma cestami byly hodnoceny oba získané vcf soubory (SureCall a GATK). U každého pacienta tak byla provedena čtyři nezávislá hodnocení.

2.5.1.A Exomiser

Exomiser je volně dostupný Java program, který anotuje, filtruje a prioritizuje nalezené varianty na základě tzv. HPO terms. HPO terms (Human Phenotype Ontology) (<http://human-phenotype-ontology.github.io/>) jsou číselné kódy jednotlivých fenotypů kompatibilní s programem Exomiser a byly vybírány tak, aby co nejvíce odpovídaly konkrétnímu fenotypu hodnoceného pacienta. Výhodou programu Exomiser je, že není nutné nalezené varianty ve vcf souboru dále anotovat, ale je možné neanotovaný vcf soubor spolu s HPO terms rovnou zpracovat pomocí Exomiseru, a pak už hodnotit výstupní soubor z Exomiseru.

2.5.1.B Anotace vcf souboru

Oba vcf soubory byly dále anotovány pomocí nástroje Annovar (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) a AlamutBatch (Interactive Biosoftware, Francie) a dále pomocí nástroje Galaxy anotován informacemi z databáze OMIM (<https://www.omim.org/>) a UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Vzhledem k velkému počtu nalezených variant z celoexomového sekvenování u pacientů byly po anotaci Annovarem filtrovány a k dalším anotacím použity jen varianty, které mají frekvenci výskytu $\leq 2\%$ v populaci GnomAD_All.

2.5.2. Hodnocení patogenity variant

Varianty byly hodnoceny v zásadě stejným způsobem jako u variant ze sekvenování panelu genů. Pro hodnocení byly zahrnuty jen varianty na tzv. OMIM genech. Zohledňována byla všechna další kritéria tak, jak bylo uvedeno výše: frekvence v populacích, přítomnost v HGMD® Professional databázi, in silico predikce, konzervovanost nukleotidu a aminokyseliny. Pro klasifikaci variant a interpretaci jejich významu a patogenicity, resp. kauzality jsme opět využívali tzv. ACMG kritéria (Richards et al., 2015). Tam, kde to bylo možné, byla provedena segregáční analýza v rodině.

2.6. Mini Gene Splicing Assay

U dvou pacientů s nalezenou variantou a podezřením, že by mohla ovlivňovat sestřih RNA (splice site varianta) byl pro ověření vlivu nalezené varianty na sestřih RNA použit Mini Gene Splicing Assay (Steffensen et al., 2014, Cooper, 2005), kdy je PCR produkt obklopující zkoumané místo naklonován do pSPL3 vektoru a ten následně tranfekován do COS-7 buněk. Ty jsou kultivovány po dobu 48 hodin a poté je vyizolována veškerá mRNA. Reverzní transkripce je přepsána do cDNA a ta pomocí gelové elektroforézy separována dle délky. Při změně splicingu jsou na gelu patrné dva fragmenty různé délky. Samotný assay byl proveden ve spolupráci s Dr. Christianem Beetzem na Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Universitätsklinikum Jena, Německo.

2.7. SNP chip Array

Pro ověření suspektní velké delece zachycené pomocí CNV analýzy u jednoho pacienta byla použita analýza SNP Chip Array s použitím čipu SurePrint CGH 4x180K G3 ISCA_V2 (Agilent Technologies, US). Samotná analýza byla provedena na Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol.

2.8. HaploPainter

Pro kreslení rodokmenů byl použit volně stažitelný program HaploPainter verze 1.043. (<https://haplopainter.soft112.com/>)

IV. Výsledky

1. Masivně paralelní sekvenování panelu HSP genů

1.1. Procento objasněnosti

V průběhu let 2015 – 2018 jsem v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie, 2.LF UK a FN Motol pomocí NGS sekvenování panelu genů popsanych s hereditární spastickou paraplegií vyšetřila postupně celkem 96 pacientů s klinickým podezřením na HSP, u kterých zůstala příčina onemocnění i po vyšetření *SPAST* genu klasickým sekvenováním a MLPA nejasná.

Ve skupině 96 pacientů vyšetřených NGS sekvenováním panelu vybraných HSP genů bylo nalezeno u 22 pacientů celkem 21 bodových variant a dvě velké delece, u nichž předpokládáme kauzalitu. Kauzální variantu, a tedy příčinu onemocnění a typ hereditární spastické paraparézy se tak povedlo objasnit u 23 % pacientů (22 z 96). Varianty byly nalezeny celkem v 9 genech, mezi objasněnými pacienty bylo tedy nalezeno 9 různých typů HSP (Tab.4). Přítomnost všech nalezených variant byla ověřena Sangerovým sekvenováním v případě bodových variant, pomocí MLPA nebo ArrayCGH u velkých delecí.

Ve skupině 51 familiárních vyšetřených pacientů byla kauzální varianta nalezena u 15 pacientů, což představuje objasněnost u 29,4 %. Většina těchto variant je v genech s AD (autozomálně dominantní) dědičností – u 11 objasněných pacientů.

Ve skupině sporadických pacientů byla kauzální varianta nalezena u 7 pacientů z celkových 45 vyšetřených, což představuje objasněnost 15,5 % v této skupině. Všichni objasnění sporadiční pacienti mají kauzální varianty v genech s autozomálně recesivní dědičností (AR).

Čtyři objasnění familiární pacienti s variantami v genech s AR dědičností mají všichni pozitivní rodinnou anamnézu ve smyslu stejně postiženého sourozence, což odpovídá AR dědičnosti.

Ze skupiny objasněných pacientů jsou dva mladší 18-ti let. Jsou to právě oba dva familiární pacienti, kteří byli ve skupině vyšetřovaných pacientů mladších 18 let. U jednoho byla nalezena varianta C.838C>G (p.Arg280Gly) v genu *KIF5A*, u druhého varianta c.431T>A (p.Leu144*) v genu *REEP1*. U varianty v genu *REEP1* nicméně váháme s uznáním kauzality, neboť byla nalezena i u údajně zdravé matky pacienta – podrobněji je rozepsáno v kapitole IV:/1.4.1.

Dále byla u jedné sporadické pacientky ve skupině do 18-ti let byla nalezena varianta c.402A>C (p.Lys134Asn) v genu *ATL1*, kterou nepovažujeme za kauzální, protože byla nalezena i u pacientčiny zcela zdravé matky (viz IV:/1.14.).

1.2. Nejčastěji se vyskytující typy HSP

Mezi vyšetřenými českými non-SPG4 pacienty s HSP se nejčastěji vyskytovali pacienti s SPG31, tzn. kauzálními variantami v genu *REEP1* - celkem 6 pacientů, resp. 6 rodin. To představuje 27,3 % ze všech dosud objasněných non-SPG4 pacientů pomocí sekvenování panelu genů. SPG31 je zároveň i nejčastěji se vyskytující typ HSP s autozomálně dominantní dědičností u non-SPG4 pacientů, pacienti s kauzální variantou v genu *REEP1* tvoří více než polovinu všech objasněných non-SPG4 pacientů s AD typem HSP.

S vyšší frekvencí se dále vyskytují SPG7 a SPG11, v obou případech 4 pacienti (resp. rodiny) a SPG10 (varianty v genu *KIF5A*) u 3 pacientů (rodin). SPG11 i SPG7 pozitivní pacienti představují shodně 18,2 % z objasněných non-SPG4 pacientů. SPG11 a SPG7 jsou nejčastější typy autozomálně recesivních HSP mezi českými HSP pacienty. SPG10 (*KIF5A* gen) pozitivní pacienti tvoří 13,6 % objasněných non-SPG4 pacientů a SPG10 je druhý nejčastější typ mezi non-SPG4 AD HSP (27 % z objasněných AD pacientů; 3 z 11).

Ostatní typy HSP (SPG5, SPG6, SPG35 a SPG77) byly nalezeny vždy jen u jednoho pacienta ze souboru objasněných, což představuje 4,5 % shodně pro každý typ HSP z celkového počtu objasněných non-SPG4 pacientů. U jedné pacientky byla překvapivě nalezena i kauzální varianta v genu *SPAST*, blíže rozepsáno v kapitole IV:/1.13.

U přesně poloviny objasněných non-SPG4 pacientů (11 pacientů) byl nalezen některý z AD typů nemoci, u druhé poloviny některý z AR typů nemoci.

Přehled výsledků viz Tab.4.

Tab.4: Typy HSP a procento objasněných non-SPG4 českých pacientů s HSP

Typ SPG	Gen	Dědičnost	Počet objasněných pacientů	Procento z objasněných pacientů
SPG4	<i>SPAST</i>	AD	1	4,5 %
SPG5	<i>CYP7B1</i>	AR	1	4,5 %
SPG6	<i>NIPAI</i>	AD	1	4,5 %
SPG7	<i>SPG7</i>	AR	4	18,2 %
SPG10	<i>KIF5A</i>	AD	3	13,6 %
SPG11	<i>SPG11</i>	AR	4	18,2 %
SPG31	<i>REEP1</i>	AD	6	27,3 %
SPG35	<i>FA2H</i>	AR	1	4,5 %
SPG77	<i>FARS2</i>	AR	1	4,5 %

1.3. Kauzální varianty nalezené pomocí sekvenování panelu HSP genů

1.3.1. Charakter nalezených kauzálních variant

Celkem bylo nalezeno 21 bodových mutací a dvě velké delece (v genu *SPG11* a genu *FARS2*) (viz Tab.5). Z nalezených variant bylo 9 typu missense, všechny krom jedné již dříve popsané, ani jedna missense varianta nebyla v genu *REEP1*. Další 6 variant bylo sestřihových (splice site), z toho 4 nové a dvě popsané. Dále byly nalezeny 4 nonsense varianty (tři již popsané a jedna nová), z toho 2 v genu *SPG11*, a 2 frame-shift varianty (jedna nová, druhá popsaná).

Většina nalezených variant byla v heterozygotním stavu. V genech s AD dědičností všechny varianty, v genech s AR dědičností mezi 12 nalezenými variantami byly u 4 pacientů varianty v homozygotním stavu: v genu *CYP7B1*, jedna v genu *SPG11*, jedna v genu *SPG7* a jedna v genu *FA2H*. Ostatních 7 objasněných AR pacientů jsou složeni heterozygoti pro dvě varianty ve stejném genu. V heterozygotním stavu byly také obě nalezené velké delece: v genu *SPG11* má pacient kombinaci velké delece a sestřihové varianty, v genu *FARS2* kombinaci velké delece a missense varianty.

1.3.2. Nalezené kauzální varianty: nové vs. popsané

Ze všech 21 nalezených kauzálních variant bylo 13 již dříve popsáných a 8 nově nalezených. Dvě nově nalezené varianty v genu (jedna v genu *KIF5A*, druhá v genu *SPAST*) jsou ve stejném nukleotidu, ve kterém již byla popsána jiná patogenní varianta.

U všech nově nalezených variant byla uznána kauzalita jen pokud 1) byla provedena segreganční analýza v rodině nebo 2) byla již ve stejném nukleotidu popsána jiná patogenní varianta nebo 3) byly jiné silné argumenty pro uznání kauzality – viz dále podrobněji rozepsáno u nově nalezených variant v genech *FA2H*, *FARS2* a splice site varianty c.33-2A>G v genu *REEPI* (Kapitoly IV:/ 1.4.1.; 1.10. a 1.11.).

Nejvíce nově nalezených kauzálních variant bylo v genu *REEPI*, dokonce všechny nalezené varianty v genu *REEPI* nebyly zatím popsány, všechny jsou nové. Naopak v genu *SPG7* byla nalezena jen jedna nová varianta, všechny ostatní již byly popsány. V genu *SPG11* tomu bylo podobně, byla nalezena jen jedna nová sestřihová varianta, popsána nebyla ani velká delece tří exonů v genu *SPG11*.

1.3.3. Rekurentní vs. jedinečné varianty

Většina z nalezených kauzálních variant byla nalezena pouze u jednoho pacienta, ale některé varianty se opakovaly u více pacientů. Nejčastěji se opakovaly varianty v genu *SPG7*: 2x (tzn. u dvou pacientů) byly nalezeny varianty c.233T>A (p.Leu78*), c.1529C>T (p.Ala510Val) a c.1553-2_1553-1del, z toho varianta p.Leu78* byla nalezena na třech alelách, jednou byla u pacientky v homozygotním stavu a jednou u složeného heterozygota v kombinaci s jinou patogenní variantou.

U dvou pacientů se též opakovala varianta c.5381T>C v genu *SPG11*, vždy u složeného heterozygota v kombinaci s jinou variantou.

Nejčastěji se opakující variantou je nově nalezená c.318_321del v genu *REEPI*, která byla nalezena hned ve třech různých rodinách vždy v heterozygotním stavu (jedná se o gen s AD dědičností).

1.3.4. Frekvence kauzálních variant

Nalezené heterozygotní varianty v genech s AD dědičností nemají uvedenou žádnou frekvenci v populačních databázích. Z 12 nalezených variant v genech s AR dědičností mají všechny krom dvou nových, dosud nepopsaných (c.130C>T v genu *FA2H* a c.1603-1G>A v genu *SPG11*) uvedenou nějakou frekvenci v populačních databázích. Nejvyšší frekvenci mezi recesivními mají varianty v genu *SPG7*: 0,047 % u varianty c.233T>A (p.Leu78*) a dokonce až 0,29 % u varianty c.1529C>T (p.Ala510Val) v ExAC_All. Překvapivě vysokou frekvenci má i varianta c.1082C>T (p.Pro361Leu) v genu *FARS2* (0,013 % v ExAC_All) s ohledem na fakt, že varianty v genu *FARS2* byly popsány s hereditární spastickou paraparézou jen vzácně.

Tab.5: Nalezené pravděpodobně kauzální varianty v HSP genech u českých non-SPG4 pacientů, věk nástupu a doba trvání nemoci u pacientů

Pacient číslo	Gen	Typ SPG	Nukleotidová záměna	AMK změna		Exon/Intron	Nová/ popsaná	Rodinný status	Nástup onemocnění (věk)	Věk pacienta (roky)
Autozomálně dominantní										
1	SPAST	SPG4	c.1321+2T>G	Splice site	HT	Intron 10	Nová*	FAM	~ 50	62
2	NIPAI	SPG6	c.316G>A	p.Gly106Arg	HT	Exon 4	Popsaná (Chen et al. 2005)	FAM	~ 6	42
3	KIF5A	SPG10	c.610C>T	p.Arg204Trp	HT	Exon 8	Popsaná (Tessa et al. 2008)	FAM	~ 45	49
4			c.759G>T	p.Lys253Asn	HT	Exon 9	Popsaná (Schule et al. 2008)	FAM	~ 45	75
5			c.838C>G	p.Arg280Gly	HT	Exon 10	Nová*	FAM	~ 5	17
6	REEP1	SPG31	c.33-2A>G	Splice site	HT	Intron 2	Nová	FAM	4 - 6	44
7			c.182+2C>T	Splice site	HT	Intron 4	Nová	FAM	~ 2	39
8,9,10			c.318-321del	p.Cys106Trpfs*20	HT	Exon 6	Nová	FAM	31; ?; ?	67; 39; 62
11			c.431T>A	p.Leu144*	HT	Exon 7	Nová	FAM	~ 5	14
Autozomálně recesivní										
12	CYP7B1	SPG5	c.889A>G	p.Thr297Ala	HM	Exon 4	Popsaná (Goizet et al. 2009)	SP	5 - 6	38
13	SPG7	SPG7	c.233T>A	p.Leu78*	HM	Exon 2	Popsaná (Arnoldi et al. 2008)	FAM	?	72
14			c.233T>A	p.Leu78* / Splice site	HT/HT	Exon 2/ Intron 11	Popsaná/ Nová	FAM	~ 35	50
15			c.1529C>T/ c.1552+1G>T	p.Ala510Val/ Splice site	HT/HT	Exon 11/ Intron 11	Popsaná (Brugman et al. 2008)/ Popsaná (Warnecke et al. 2010)	SP	~ 60	68
16			c.1529C>T/ c.1553-2_1553-1del	p. Ala510Val / Splice site	HT/HT	Exon 11/ Intron 11	Popsaná/ Nová	FAM	~ 50	59
17	SPG11	SPG11	c.1603-1G>A/ delece ex 16-18	Splice site / -	HT/HT	Intron 7/ Exon 16-18	Nová/Nová	SP	15	26
18			c.3075dup	p.Glu1026Argfs*4	HM	Exon 17	Popsaná (Hehr et al. 2007)	SP	18	33
19			c.5381T>C c.5623C>T	p.Leu1794Pro p.Gln1875*	HT/HT	Exon 30/ Exon 30	Popsaná (Lynch et al. 2016)/ Popsaná (Paisan-Ruiz et al. 2008)	SP	~ 60	68
20			c.5381T>C c.7138G>T	p.Leu1794Pro p.Glu2380*	HT/HT	Exon 30/ Exon 39	Popsaná/ Popsaná (Puech et al. 2011)	FAM	~ 50	72
21	FA2H	SPG35	c.130C>T	p.Pro44Ser	HM	Exon 1	Nová	SP	16	30
22	FARS2	SPG77	c.1082C>T/ delece ex 1-2	p.Pro361Leu/ -	HT/HT	Exon 6/ Exon 1-2	Popsaná (Vantrouy et al. 2017)/ Popsaná (Raviglione et al. 2016)	SP	4 - 5	21

* ve stejném nukleotidu již byla popsána jiná změna

Tab.6: Nalezené missense kauzální varianty: frekvence, in silico predikce, konzervovanost a přítomnost v proteinové doméně
(abecedně řazeno dle názvu genu)

Gen	Dědičnost	Varianta	AMK záměna	Frekvence v EXAC _{All}	Polyphen-2	SIFT	Mutation Taster	Konzervovanost nukleotidu	Konzervovanost animokyseliny	Přítomnost v proteinové doméně
CYP7B1	AR	c.889A>G	p.Thr297Ala	0,0034 %	0,999	Deleterious	Disease causing	středně	vysoce	Cytochrome P450 domain
FA2H	AR	c.130C>T	p.Pro44Ser	-	0,999	Deleterious	Disease causing	vysoce	vysoce	Cytochrome b5 domain
FARS2	AR	c.1082C>T	p.Pro361Leu	0,013 %	1,000	Deleterious	-	vysoce	vysoce	ne
KIF5A	AD	c.610C>T	p.Arg204Trp	-	1,000	Deleterious	Disease causing	středně	vysoce	Kinesin motor domain
		c.759G>T	p.Lys253Asn	-	1,000	Deleterious	Disease causing	slabě	vysoce	Kinesin motor domain
		c.838C>G	p.Arg280Gly	-	1,000	Deleterious	Disease causing	středně	vysoce	Kinesin motor domain
NIPA1	AD	c.316G>A	p.Gly106Arg	-	1,000	Deleterious	Disease causing	vysoce	středně	ano, v proteinu neznámé funkce
SPG7	AR	c.1529C>T	p.Ala510Val	0,29 %	1,000	Deleterious	-	vysoce	vysoce	Peptidase M14 domain
SPG11	AR	c.5381T>C	p.Leu1794Pro	0,0041 %	1,000	Deleterious	Disease causing	vysoce	vysoce	ne

PolyPhen-2: 0,999 Probably damaging; 1,000 Probably damaging

Tab.7: Nalezené splice site kauzální varianty: frekvence, in silico predikce (abecedně řazeno dle názvu genu)

Gen	Dědičnost	Varianta	Vliv na splicing	Frekvence v ExAC_All	MaxEnt	NNSPLICE
REEP1	AD	c.33-2A>G	Acceptor splice site	-	-100 %	-100 %
		c.182+2C>T	Donor splice site	-	-100 %	-100 %
SPAST	AD	c.1321+2T>G	Donor splice site	-	-100 %	-100 %
SPG7	AR	c.1552+1G>T	Donor splice site	0,002 %	-100 %	-100 %
		c.1553-2_1553-1del	Acceptor splice site	0,0012 %	-100 %	-100 %
SPG11	AR	c.1603-1G>A	Acceptor splice site	-	-100 %	-100 %

Tab.8: Nalezené nonsense a frameshift kauzální varianty (abecedně řazeno dle názvu genu)

Gen	Dědičnost	Varianta	Změna v proteinu	Frekvence v ExAC_All
REEP1	AD	c.318-321del	p.Cys106Trpfs*20	-
		c.431T>A	p.Leu144*	-
SPG7	AR	c.233T>A	p.Leu78*	0,047 %
SPG11	AR	c.3075dup	p.Glu1026Argfs*4	0,00083 %
		c.5623C>T	p.Gln1875*	0,0041 %
		c.7138G>T	p.Glu2380*	0,0017 %

1.4 Gen *REEPI*; SPG31

Heterozygotní patogenní varianty v genu *REEPI* jsou příčinou SPG31 s autozomálně dominantní dědičností. V souboru pacientů vyšetřených NGS panelu genů byly nalezeny celkem 4 pravděpodobně kauzální varianty genu *REEPI* (NM_022912.2) v celkem v šesti rodinách. Všechny nalezené varianty v genu *REEPI* jsou dosud nepopsané a nemají frekvenci v populačních databázích. Ani jedna nalezená varianta není typu missense, dvě varianty jsou sestřihové (splice site), jedna frame shift a jedna nonsense. Frameshift varianta c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20) byla nalezena ve třech rodinách. V genu *REEPI* bylo také v našem souboru nalezeno nejvíce nových variant, resp. všechny varianty v tomto genu nebyly dosud popsány. V genu *REEPI* byla dále nalezena synonymní záměna c.105T>C (p.Tyr35Tyr), která by mohla ovlivňovat sestřih mRNA, varianta je ale nekauzální (viz dále).

1.4.1. Nalezené varianty v genu *REEPI*

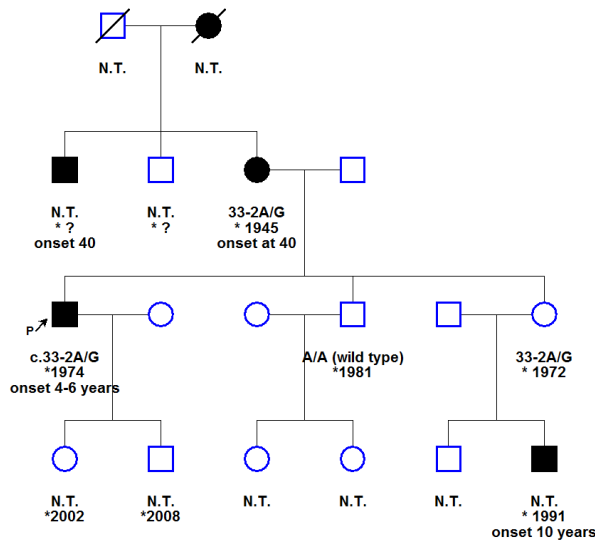
c.33-2A>G

Varianta *c.33-2A>G* na akceptorovém sestřihovém místě v intronu 2 genu *REEPI* nebyla dosud popsána a nemá ani frekvenci v databázích. Je v místě invariantního -2 nukleotidu, a tedy s vysokou pravděpodobností ovlivňuje sestřih RNA. Také predikčními programy je hodnocena jako vysoce riziková: MaxEnt: -100 %, NNSPLICE: -100 %.

DNA pacienta byla pro zjištění vlivu varianty na sestřih RNA odeslána do laboratoře na Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Universitätsklinikum Jena v Německu Dr. Beetzovi, kde byl proveden Mini Gene Splicing Assay. Test prokázal vliv varianty na sestřih RNA se zajímavým výsledkem. Exon 2 je s nezměněným čtecím rámcem (tzn. normální sestřih) přítomen ve zhruba 10 % veškeré mRNA. Ve zbytku mRNA není exon 2 vynechán, jak by bylo očekáváno, ale k sestřihu je použito jiné kryptické akceptorové místo. V této frakci mRNA je tedy exon 2 zahrnut, ale jen jeho část od nukleotidu c.76 (chybí 43 nukleotidů), což nakonec vede také k posunu čtecího rámce a ke vzniku předčasného terminačního kodonu.

Varianta byla nalezena v heterozygotním stavu nejprve u vyšetřovaného pacienta, následně byla potvrzena v heterozygotním stavu i u pacientovy stejně postižené matky. Varianta byla nalezena i u jeho údajně zdravé sestry v heterozygotním stavu, která ale nebyla dosud neurologicky vyšetřena. Její syn, který má problémy s chůzí nebyl zatím testován. Varianta nebyla potvrzena u zdravého pacientova bratra (viz rodokmen na Obr.9).

Obr.9: Rodokmen rodiny s variantou *c.33-2A>G* v genu *REEP1*. (N.T. not tested). Vytvořeno za použití HaploPainter1.043.



První obtíže se u pacienta objevily již v předškolním věku ve smyslu neobratnosti a ztuhlosti DK. Problémy v čase velice pomalu progredují, nyní ve věku 44 let je stále schopen samostatné chůze, jen má problémy do schodů. Horní končetiny jsou bez postižení, dysartrii nemá a nemá ani problémy s mikcí.

Jeho matka udává první obtíže také od dětství, nyní je 73-letá, větší progrese onemocnění byla ale až kolem 40. roku věku. Chodí s oporou dvou holí, nyní má i poruchu citlivosti a hybnosti dolních končetin. Udává necitlivost a neobratnost prstů na horních končetinách. Dysartrii nemá. U jejího bratra je údajně též fenotyp HSP, ale nebyl dosud neurologicky vyšetřen, začátek obtíží měl být kolem 40. roku věku.

Pacient má údajně zdravou sestru, u které byla prokázána varianta *c.33-2A>G*. U jejího syna (nyní 27 let), který nebyl zatím testován, jsou popisovány problémy s chůzí, ztuhlostí a neobratností od 10 let, potíže neprogredují.

c.182+2T>C

Nová, dosud nepopsaná varianta *c.182+2T>C* je v místě invariantního +2 nukleotidu v donor splice místě intronu 4 a s vysokou pravděpodobností tak ovlivňuje sestřih RNA. I predikčními programy je hodnocena jako vysoce riziková: MaxEnt: -100 %, NNSPLICE: -100 %, nemá uvedenou frekvenci v databázích. ACMG kritéria: pathogenic.

Byla nalezena v heterozygotním stavu u nyní 39-letého pacienta s problémy od dvou let, kdy se objevilo zakopávání. Pacient je nyní schopen chůze jen s pomocí dvou francouzských holí, chůze je těžce paraparetická. Horní končetiny jsou bez postižení,

na dolních je hyperreflexie, pozitivní pyramidové iritační jevy, klonus, přítomna je výrazná porucha cití akrálně. V rodině je spastická paraparéza popisována i u jeho otce a paternálního děda, bližší informace o průběhu onemocnění u nich nemáme.

c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20)

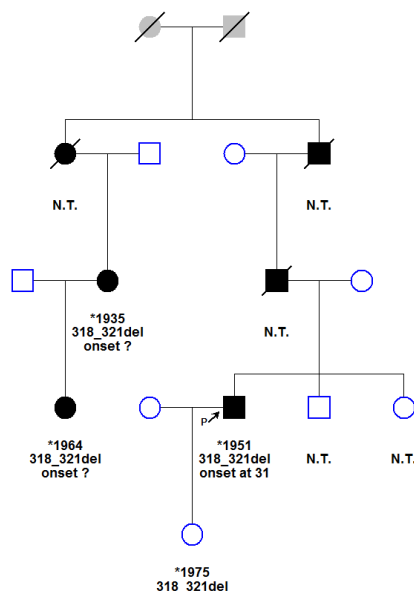
Nalezená heterozygotní frame shift varianta *c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20)* v exonu 6 je nová, dosud nepopsaná, nemá žádnou frekvenci v populačních databázích. Varianta vede k posunu čtecího rámce a tím předčasnému vzniku terminačního kodonu a předčasnému ukončení syntézy proteinu.

V heterozygotním stavu byla varianta nalezena celkem ve třech nezávislých rodinách:

Rodina 1/ V prvním případě byla nalezena u pacienta nar. 1951, u něhož máme pouze informaci, že problémy charakteru HSP začaly ve věku 31 let. Varianta byla dále potvrzena i u jeho stejně postižené příbuzné (sestřenice jeho otce) a její rovněž stejně postižené dcery, a dále i u pacientovy dcery nar. 1975, u které nejsou zatím popisovány projevy HSP (viz rodokmen na Obr.10).

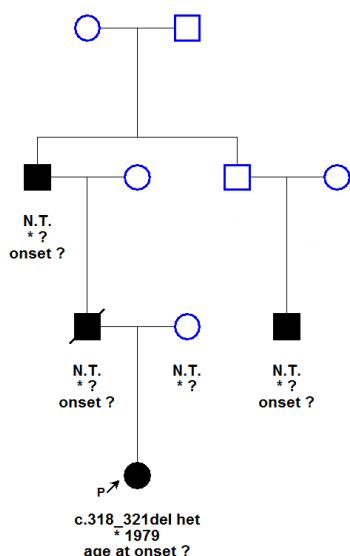
Obr.10: Rodokmen rodiny 1 s variantou *c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20)* v genu *REEP1*.

(N.T. not tested). Vytvořeno za použití HaploPainter1.043.



Rodina 2/ Varianta byla dále nalezena u pacientky nar. 1979, v anamnéze bylo pouze uvedeno, že stejné postižení měl i otec pacientky, paternální děd a paternální bratranec otce. Informace o věku nástupu onemocnění nebyly poskytnuty, nicméně v době prvního zaslání pacientky k vyšetření jí bylo 28 let.

Obr.11: Rodokmen rodiny 2 s variantou *c.318_321del* (*p.Cys106Trpfs*20*) v genu *REEP1*. (*N.T. not tested*). Vytvořeno za použití *HaploPainter1.043*.



Rodina 3/ Třetí pacientka je nar. 1956, nyní tedy 62-letá, nemáme o ní od odesílajícího lékaře žádné další informace, pouze že v rodině je autozomálně dominantní spastická paraparéza. V době zaslání pacientky k prvnímu vyšetření jí bylo 58 let.

Všichni pacienti z těchto tří rodin byli zasláni ze stejného centra lékařské genetiky, dva pacienti (1 a 2) mají dokonce stejné příjmení, o jejich příbuznosti ale nemáme informace.

***c.431T>A* (*p.Leu144**)**

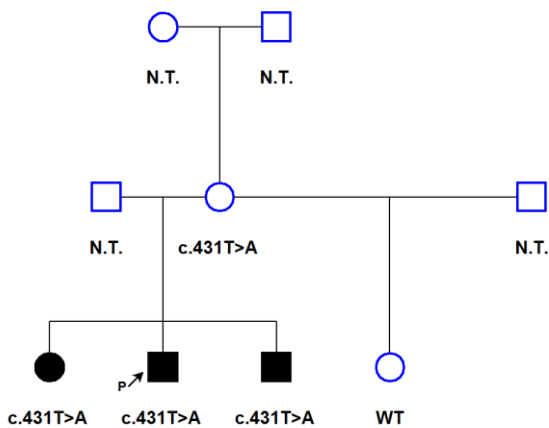
Nonsense varianta *c.431T>A* (*p.Leu144**) v exonu 7, která k vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vzniku terminačního kodonu a předčasnému ukončení syntézy proteinu, nemá uvedenou žádnou frekvenci a nebyla dosud popsána.

Varianta byla nalezena v heterozygotním stavu u nyní 14-letého pacienta romského původu, první nástup obtíží zhruba od 4 let, progresse je pomalá. Poruchy chůze, na DK je popisována hyperreflexie, která mírně i na HK. Na DK dále pozitivní pyramidové iritační jevy, poruchy čítí nejsou. Není dysartrie, nystagmus ani změny kognitivních funkcí.

Varianta byla potvrzena v heterozygotním stavu i u jeho bratra a jeho sestry. Bratřovi je nyní 9 let, v 5 letech se objevila spasticita na DK, hyperreflexie na DK, mírně i na HK, čítí je bez poruch. Nystagmus není, je u něho ale popisován suspektní kognitivní deficit. Sestra je 5-letá, s hyperreflexií na DK, pyramidové iritační jevy zatím negativní. Obtíže s chůzí nemá. Varianta nebyla prokázána u další sestry (11 let, jiný otec), která je zdravá, neurologické

vyšetření bylo s normálním nálezem. Varianta však byla prokázána v heterozygotním stavu i u matky, nyní 31-leté, která údajně nemá obtíže s chůzí a je zcela zdravá, ale neurologicky nebyla vyšetřena. U matčina bratra jsou ale popisovány problémy s chůzí od dětství, bližší informace nejsou k dispozici. (viz rodokmen na Obr.12).

Obr.12: Rodokmen rodiny s variantou *c.431T>A* (*p.Leu144**) v genu *REEP1*. (*N.T.* not tested, *WT* wild type). Vytvořeno za použití *HaploPainter1.043*.



Synonymní záměna *c.105T>C* (*p.Tyr35Tyr*)

V genu *REEP1* byla také nalezena synonymní varianta v heterozygotním stavu s možným vlivem na sestřih RNA *c.105T>C* (*p.Tyr35Tyr*) v exonu 3. Varianta nepredikuje záměnu aminokyseliny, ale je v místě posledního nukleotidu v exonu, i když slabě konzervovaného. Vzhledem k lokalizaci varianty blízko sestřihového místa je možný vliv na sestřih, predikčními programy však hodnocený jen mírně: MaxEnt: +38,6 %, NNSPLICE: +0,9 %.

DNA pacienta byla z tohoto důvodu také odeslána do laboratoře na Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Universitätsklinikum Jena v Německu, k provedení Mini Gene Splicing Assay ke zjištění vlivu na sestřih RNA. Provedený test byl negativní, ukázal, že varianta s největší pravděpodobností sestřih RNA neovlivňuje.

Varianta byla nalezena u pacienta se spastickou paraparézou, narozeného v r. 1948 začátek obtíží byl ve 35 letech. Postižení je jen na dolních končetinách, horní končetiny má pacient bez postižení, problémy s mikcí nemá. V rodině byli podobně postiženi i jeho sourozenci, kteří ale už nežijí, vznik problémů u nich byl kolem 50. roku věku. Další informace nejsou dostupné. Varianta byla prokázána i u jeho syna, který nejeví známky spastické paraparézy.

Pacient s variantou c.194A>G (p.Tyr65Cys) v genu *REEPI* nalezenou pomocí Sangerova sekvenování

Již dříve byla prof. MUDr. Pavlem Seemanem, PhD. v Centru lékařské genetiky a fetální medicíny Gennet, s.r.o. nalezena u jednoho pacienta varianta c.194A>G (p.Tyr65Cys) v exonu 5 genu *REEPI* pomocí Sangerova sekvenování. Varianta byla uznána za kauzální. Potíže u pacienta (nar. 2006) začaly ve 3 letech, ve 4 letech i spasticita. Stejně problémy má i jeho otec, který byl do té doby veden s diagnózou DMO (dětské mozkové obrny). Další informace nejsou k dispozici. Vzhledem k tomu, že ke zmapování celkového genetického pozadí českých pacientů s hereditární spastickou paraparézou je vhodné zahrnout i výsledky předchozího Sangerova sekvenování, byl stručně uveden i tento pacient.

1.4.2. Kauzalita nalezených variant v genu *REEPI*

Dle databáze HGMD je v genu *REEPI* popsáno poměrně vysoký počet jiných než missense variant (celkem uvedených 11 missense, 4 nonsense, 11 splice site a 13 frameshift - viz HGMD Professional databáze). V případě nových variant je třeba postupovat uvážlivě při posuzování kauzality, nicméně v databázích ExAC a GnomAD se závažné varianty v genu *REEPI* vůbec nevyskytují.

Sestřihové varianty c.33-2A>G a c.182+2T>C

Dvě nalezené varianty jsou sestřihové, obě považujeme za kauzální, ačkoliv u c.182+2T>C prozatím nebyla provedena segreganční analýza v rodině a patogenitu předpokládáme na základě in silico predikcí a popsaného fenotypu pacienta a nulové frekvenci v populačních databázích, varianta je v invariantním +2 nukleotidu, vliv na splicing je vysoce pravděpodobný.

U druhé sestřihové varianty c.33-2A>G byl proveden MiniGene Splicing Assay s prokázaným vlivem na sestřih RNA a dále byla provedena segreganční analýza v rodině s průkazem segregace varianty s onemocněním. Varianta byla však v rodině nalezena u zdravé probandky, což může kauzalitu zpochybnit. Zdravá přenašečka však dosud nebyla neurologicky vyšetřena a je možné, že i přes chybění subjektivních potíží, neurologický náález ukáže příznaky HSP nebo se mohou rozvinout až později.

V úvahu připadá zmíněná možnost rozdílné penetrance a nástupu nemoci u žen a mužů. Údajně bezpříznaková nosička varianty je nyní 46 letá. U jejího syna jsou projevy nemoci od 10 let (na úrovni DNA ale nebyl vyšetřen), u jejího bratra byl nástup nemoci už v dětství, ale u jejich společné matky až ve 40 letech (viz rodokmen Obr.9). Nástup onemocnění je velice rozdílný, u mužů v dětství a u žen v dospělosti. Do schématu ale nezapadá matčin bratr (na úrovni DNA nevyšetřen) s nástupem kolem 40. roku věku. Variantu

však i přes výskyt bezpříznakové nosičky považujeme za kauzální, neboť pravděpodobnost náhodné segregace varianty s onemocněním v celkem pěti meiózách (dle rodokmenu) je velmi nízká. Mohla by však teoreticky existovat i možnost, že nalezená varianta nekauzální, ale je ve vazbě s jinou (kauzální) variantou, např. v genu, který dosud nebyl popsán.

Frameshift varianta c.318_321del (p.Cys106Trpfs*20)

Segregační analýza byla provedena i u jedné rodiny s c.318_321del, kde byla varianta také nalezena u zatím bezpříznakové nosičky, nyní 43 leté. V rodině ale chybí více informací ohledně věku nástupu nemoci, v jedinou případě uveden nástup v 31 letech. Informace o věku nástupu chybí i u dalších dvou rodin s touto variantou. Podobně jako u varianty c.33-2A>G je ale z rodokmenu patrné, že pravděpodobnost náhodné segregace varianty s onemocněním tentokrát u šesti meióz je minimální a variantu proto považujeme za kauzální. U bezpříznakových přenašeček je u obou variant pravděpodobně nástup nemoci otázkou času, závažnost projevů také může být mírná.

Nonsense varianta c.431T>A (p.Leu144*)

Varianta c.431T>A (p.Leu144*) je nonsense, které mají obecně závažnější predikce, protože vedou k předčasnému ukončení syntézy proteinu. S kauzalitou této varianty jsme dlouho váhali, neboť byla nalezena u zdravé matky obou bratrů, a to by kauzalitu vylučovalo. U bratrů je popisován nástup v dětství, projevy nemoci má i jejich 5-letá sestra, u které byla varianta potvrzena. U obou bratrů i jejich matky bylo provedeno celoxomové sekvenování (WES) bez nálezu vysvětlující, kauzální varianty (viz dále Kapitola 2.4.). Poté, co byla ve dvou dalších rodinách s variantou v *REEPI* genu (c.33-2 A>G a c.318_321del) pozorována přítomnost bezpříznakových nosiček varianty, připouštíme kauzalitu i u varianty c.431T>A (p.Leu144*) i vzhledem k tomu, že ani WES neodhalilo žádnou suspektní variantu.

1.4.3. Fenotyp pacientů s SPG31 (variantami v genu *REEPI*)

U všech pacientů s variantami v genu *REEPI* (tedy s SPG31, včetně pacientky s variantou nalezenou Sanger sekvenováním), je popisován nástup v dětství, krom jedné pacientky s variantou c.318_321del, u které ale máme nedostatek informací. Progrese onemocnění je pomalá, pacienti jsou schopni i po několika letech trvání samostatné chůze, nejvíce závažná je chůze s pomocí dvou francouzských holí. Ani u jednoho pacienta nebyla popsána dysartrie, u některých pacientů se ale po delším trvání nemoci objevují poruchy čítí, u jedné pacientky mírně i na horních končetinách. Ostatní příznaky odpovídají typické nekomplikované HSP.

1.5 Gen *SPG7*; HSP typu *SPG7*

Bialelické patogenní varianty v genu *SPG7* jsou popisovány jako příčina HSP typu *SPG7* s autozomálně recesivní dědičností. V souboru vyšetřených pacientů pomocí sekvenování panelu genů byly nalezeny celkem čtyři bodové varianty celkem u čtyř pacientů (NM_003119.3). Všechny varianty byly nalezeny v heterozygotním stavu, krom jedné c.233T>A (p.Leu78*), ta byla u jedné pacientky nalezena v homozygotním stavu. Z nalezených variant je jedna missense, dvě sestřihové a jedna nonsense. Krom jedné (c.1553-2_1553-1del) byly všechny varianty již dříve popsány jako patogenní s fenotypem autozomálně recesivně dědičné spastické paraparézy.

1.5.1. Nalezené varianty v genu *SPG7*

c.233T>A (p.Leu78*)

Varianta c.233T>A (p.Leu78*) v exonu 2 byla nalezena u dvou pacientů respektive ve dvou rodinách, v prvním případě v homozygotním stavu, podruhé v kombinaci se sestřihovou variantou c.1553-2_1553-1del, která byla také v heterozygotním stavu. Varianta c.233T>A (p.Leu78*) byla již popsána jako patogenní a kauzální pro autozomálně recesivní spastickou paraparézu (Arnoldi et al., 2008, Iqbal et al., 2017, Pfeffer et al., 2015), je uvedena i v databázi ClinVar (RCV000200640.1) a dbSNP (rs121918358) jako patogenní, ACMG kritéria: pathogenic. Varianta má poměrně vysokou frekvenci v populačních databázích, např. ExAC_All 0,047 %. Jde o nonsense variantu, která vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vzniku terminačního kodonu.

c.1553-2_1553-1del

Dosud nepopsaná varianta c.1553-2_1553-1del v intronu 11 byla nalezena v heterozygotním stavu u dvou pacientů, resp. rodin. Jedenkrát v kombinaci s nonsense variantou c.233T>A (p.Leu78*), podruhé s missense variantou c.1529C>T (p.Ala510Val). Všichni postižení jedinci byli složení heterozygoti.

Varianta c.1553-2_1553-1del je uvedena v databázi ClinVar a dbSNP jako patogenní. Varianta má uvedenou frekvenci v populačních databázích, např. ExAC_All 0,0012 %. Varianta způsobuje delecii dvou invariantních nukleotidů v akceptorovém sestřihovém místě a proto s vysokou pravděpodobností ovlivňuje normální sestřih RNA, jako vysoce riziková je hodnocena i predikčními programy (MaxEnt: -100 %, NNSPLICE: -100 %), ACMG kritéria: pathogenic.

c.1529C>T (p.Ala510Val)

Varianta c.1529C>T (p.Ala510Val) v exonu 11 byla nalezena v heterozygotním stavu u dvou pacientů, resp. ve dvou rodinách. V obou případech vždy v kombinaci se splice site variantou 1) c.1552+1G>T a 2) c.1553-2_1553-1del také v heterozygotním stavu. Všichni postižení jedinci tedy byli složeni heterozygoti.

Nalezená missense varianta c.1529C>T (p.Ala510Val) byla popsána jako patogenní a kauzální pro autozomálně recesivně dědičnou spastickou paraparézu (Brugman et al., 2008, Chrestian et al., 2017), byla opakovaně uvedena i v databázi ClinVar jako patogenní v databázi dbSNP jako patogenní. Varianta má velmi vysokou frekvenci v populačních databázích, např. ExAC_All 0,29 %, v non-Finish evropské populaci dle ExAC dokonce 0,49 %. Varianta je v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, predikčními programy hodnocena jako závažná: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, dle ACMG kritérií: pathogenic, varianta je ve funkční proteinové doméně.

c.1552+1G>T

U jedné pacientky byla nalezena již dříve popsána (Warnecke et al., 2010) sestřihová varianta c.1552+1G>T v intronu 11 v heterozygotním stavu v kombinaci s missense variantou c.1529C>T (p.Ala510Val). Nalezená splice site varianta má frekvenci v populačních databázích, ExAc_All 0,002 %, je uvedena i v dbSNP. Je na donor sestřihovém místě invariantního +1 nukleotidu, s vysokou pravděpodobností tak ovlivňuje sestřih mRNA, i predikčními programy je hodnocena jako vysoce riziková: MaxEnt: -100 %, NNSPLICE: -100 %, dle ACMG pathogenic.

1.5.2. Pacienti s variantami v *SPG7* genu

Pacientka s homozygotní variantou c.233T>A (p.Leu78*)

Nonsense varianta c.233T>A (p.Leu78*) byla nalezena v homozygotním stavu u pacientky nar. 1946, pacientka má stejně postiženou sestru, která nebyla vyšetřena. Problémy popisuje od 50. roku věku, stejně i u sestry. V poslední zprávě z roku 2014 je uvedeno, že je schopna chůze s holí do 100 m, o dalším progresu nemoci nemáme informace. Dále je uvedena dysartrie, lehká spasticita na HK, na DK hypertonie, zvýšené reflexy, čítí beze změn.

Rodina s variantami c.233T>A (p.Leu78*) a c.1553-2_1553-1del

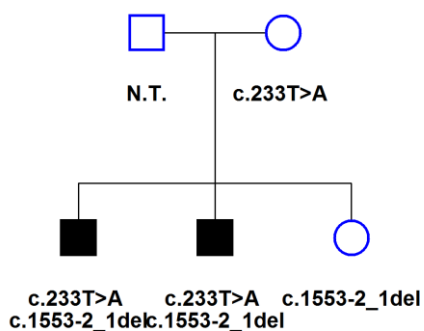
Kombinace dvou popsanych variant ve heterozygotním stavu c.233T>A (p.Leu78*) a c.1553-2_1553-1del byla nalezena pomocí NGS sekvenování nejprve u jednoho z postižených

bratrů, poté byla potvrzená pomocí Sanger sekvenování i u druhého stejně postiženého bratra. Bratři mají ještě zdravou sestru, u které byla potvrzena jen jedna z nalezených variant v heterozygotním stavu (c.1553-2_1553-1del), druhá varianta (c.233T>A, p.Leu78*) byla potvrzena u zdravé matky obou bratrů. DNA otce nemáme k dispozici, předpokládáme, že je nosič splice site varianty c.1553-2_1553-1del. (viz rodokmen na Obr.13).

První bratr (50 let) měl počáteční projevy nemoci kolem 35. roku života. Chůze nyní obtížná, ale stále samostatná, na dolních končetinách hyperreflexie, klonus nohy, bez poruch čítí, horní končetiny jsou nepostiženy. Pacient má nystagmus, mírnou dysartrii, MEP abnormální výsledek svědčící pro lézi motoneuronu k oběma DK. MRI mozku a hrudní páteře bez nálezu. Pacient udává imperativní mikci.

U druhého bratra (52 let) se první projevy objevily až v 45 letech, nyní obtížná chůze, má dysartrii, potíže s mikcí, neurologicky na DK hyperreflexie, výbavné pyramidové iritační jevy, na rozdíl od bratra se na DK rozvíjí poruchy čítí, mírně pak i na prstech horních končetin. Klonus a nystagmus neuveden. MEP vyšetření není k dispozici/neprovedeno.

Obr.13: Rodokmen rodiny s variantami c.233T>A (p.Leu78*) a c.1553-2_1553-1del v genu SPG7. (N.T. not tested). Vytvořeno za použití HaploPainter1.043.



Pacientka s dvěma heterozygotními variantami c.1529C>T (p.Ala510Val) a c.1552+1G>T

Kombinace missense a splice site variant v genu *SPG7* byla nalezena u nyní 68 leté pacientky s nekomplikovanou HSP, první obtíže charakteru HSP se objevily kolem 60. roku života. Postupně progredují obtíže s chůzí, spasticita a slabost DK. Horní končetiny jsou bez postižení, problémy s mikcí nemá. Na dolních končetinách byla hyperreflexie a výbavné pyramidové iritační jevy, čítí je v normě. Rodinná anamnéza je stran HSP negativní.

Pacient s variantami c.1529C>T (p.Ala510Val) a c.1553-2_1553-1del

U nyní 59-letého pacienta s prvními příznaky po 50. roce věku byla nalezena kombinace missense a splice site variant v heterozygotním stavu v genu *SPG7*, obě varianty byly nalezeny i u jiných pacientů s potvrzenou *SPG7* v našem souboru. Stejná kombinace variant byla potvrzena i u jeho stejně postižené sestry, rodiče vyšetřeni nebyli. V rodině nejsou další postižení jedinci.

U pacienta je popisována mírná ptóza očí (snad už od dětství), lehká hypomimie, mírná dysartrie. Na dolních končetinách byla hyperreflexie, porucha čítí zhoršující se směrem od kolen dolů. Horní končetiny byly bez postižení. Pacient je schopen samostatné chůze. Jeho mladší sestra má problémy s chůzí již od 38 let. Další informace nemáme k dispozici.

1.5.3. Kauzalita variant v *SPG7* genu

Nalezené varianty považujeme za kauzální, jednak byly již popsány krom jedné (ta je ale uvedena v databázi ClinVar jako patogenní) a fenotyp našich pacientů odpovídá. Také fakt, že byly nalezeny u více pacientů se stejným fenotypem dále podporuje jejich kauzalitu, a krom jedné (c.1552+1G>T) byla u všech provedena segregáční analýza alespoň v jedné rodině, kde se vyskytovaly.

1.5.4. Fenotyp pacientů s *SPG7*

U všech českých pacientů s *SPG7* je nástup onemocnění až v dospělosti, dokonce spíše až v pozdních dekádách. U všech pacientů je popisována dysartrie. Stupeň postižení chůze není většinou přímo uveden, u žádného ale není informace o tom, že byl upoután na vozík. U některých pacientů se rozvíjí poruchy čítí na DK, u jednoho dokonce i mírně na prstech HK. Dva bratři se stejnou kombinací kauzálních variant (c.233T>A a c.1553-2_1553-1del) udávají oba problémy s mikcí.

U nalezených variant v *SPG7* genu je ve dvou rodinách pozorována intrafamiální variabilita nástupu onemocnění: věk nástupu 35 let /45 let, poruchy čítí nepřítomny/přítomny (u dvou sourozenců s c.233T>A a c.1553-2_1553-1del) a 50 let/38 let u sourozenců s c.1529C>T a c.1553-2_1553-1del.

1.6. Gen *SPG11*; HSP typu *SPG11*

Bialelické patogenní varianty v genu *SPG11* jsou popisovány jako příčina *SPG11* s autozomálně recesivní dědičností. V souboru vyšetřených pacientů pomocí sekvenování panelu genů bylo nalezeno celkem pět bodových variant a jedna velká delece exonů 16 - 18

v genu *SPG11* (NM_025137.3) celkem u čtyř pacientů, resp. rodin. Všechny varianty byly nalezeny v heterozygotním stavu krom jedné (c.3075dup), ta byla u jedné pacientky nalezena v homozygotním stavu. Z pěti bodových variant je jedna missense, dvě jsou nonsense, jedna frame shift a jedna sestřihová.

Všechny nalezené varianty krom sestřihové varianty c.1603-1G>A a velké delecce tří exonů byly již dříve popsány jako patogenní s fenotypem autozomálně recesivní HSP.

1.6.1. Varianty nalezené v genu *SPG11*

c.1603-1G>A

Varianta byla nalezena v heterozygotním stavu u jednoho pacienta v kombinaci s velkou delecí tří exonů. Varianta c.1603-1G>A nebyla zatím popsána, nemá uvedenou frekvenci v populačních databázích, je v místě invariantního nukleotidu na akceptorovém sestřihovém místě a proto s vysokou pravděpodobností ovlivňuje normální sestřih RNA, jako vysoce riziková je hodnocena i predikčními programy (MaxEnt: -100 %, NNSPLICE: -100 %). Dle ACMG: pathogenic.

c.3075dup (p.Glu1026Argfs*)

Varianta c.3075dup (p.Glu1026Argfs*) v exonu 17 byla nalezena v homozygotní sestavě u jedné pacientky. Varianta c.3075dup již byla popsána jako patogenní a jako příčina autozomálně recesivní HSP (Hehr et al., 2007, Gunther et al., 2016), je uvedena i databázi ClinVar (RCV000001176.5) i dbSNP (rs312262752) jako patogenní, i dle ACMG pathogenic. Varianta vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vzniku terminačního kodonu. V populačních databázích je uvedena s nízkou frekvencí např. ExAC_All 0,00083 %.

c.5381T>C (p.Leu1794Pro)

Missense varianta c.5381T>C (p.Leu1794Pro) v exonu 30 byla nalezena u dvou pacientů, vždy v heterozygotním stavu v kombinaci jinou variantou, v obou případech nonsense.

Varianta c.5381T>C (p.Leu1794Pro) již byla dříve popsána jako patogenní s autozomálně recesivní HSP (Lynch et al., 2016), je uvedena i v databázích ClinVar (RCV000414944.1) a dbSNP (rs201689565) jako pravděpodobně patogenní. Varianta má uvedenou nízkou frekvenci v populačních databázích, např. ExAC_All 0,0041 %. Je v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, predikčními

programy hodnocena jako závažná: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, ACMG kritéria: pathogenic.

c.5623C>T (p.Gln1875*)

Varianta c.5623C>T (p.Gln1875*) v exonu 30 byla nalezena u jednoho pacienta v heterozygotním stavu v kombinaci s variantou c.5381T>C také v heterozygotním stavu. Varianta c.5623C>T byla již popsána jako patogenní a kauzální pro autozomálně recesivní HSP (Paisan-Ruiz et al., 2008), je uvedena i v databázi ClinVar (RCV000001175.5) a dbSNP (rs141848292) jako patogenní, ACMG kritéria: pathogenic. Varianta má uvedenou nízkou frekvenci v populačních databázích, např. ExAC_All 0,0041 %. Jde o nonsense variantu, která vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vzniku terminačního kodonu.

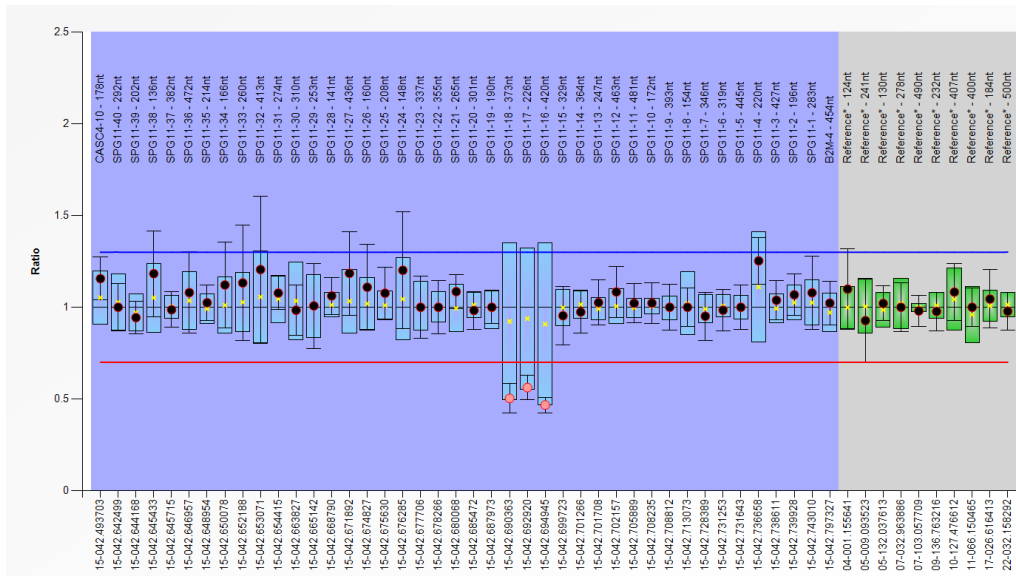
c.7138G>T (p.Glu2380*)

Varianta c.7138G>T (p.Glu2380*) v exonu 39 byla nalezena u jednoho pacienta v heterozygotním stavu v kombinaci s variantou c.5381T>C také v heterozygotním stavu. Varianta c.7138G>T byla již popsána jako patogenní a kauzální s fenotypem Kjellin syndrom, což je typ komplikované spastické paraparézy SPG15 (Puech et al., 2011). Varianta má uvedenou nízkou frekvenci v populačních databázích, např. ExAC_All 0,0017 %. Jde o nonsense variantu, která vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vzniku terminačního kodonu a tím k předčasnému ukončení syntézy proteinu, ACMG kritéria: pathogenic.

Delece exonů 16-18

Velká delece v genu SPG11 v rozsahu chr15: 44,903,038 – 44,907,746 v heterozygotním stavu zasahující exony 16, 17 a 18 byla zachycena pomocí CNV (copy number variantion) analýzy hodnocení NGS dat a následně potvrzena pomocí MLPA (Obr.14). Delece vede k posunu čtecího rámce a předčasnému vzniku terminačního kodonu a tím k předčasnému ukončení syntézy proteinu. Tato delece nebyla zatím popsána jako příčina HSP a není uvedena ani v populačních databázích.

Obr.14: *MLPA, heterozygotní delece exonů 16-18 v genu SPG11*. Vyhodnoceno za použití programu Coffalyzer (MRC-Holland, Nizozemsko).



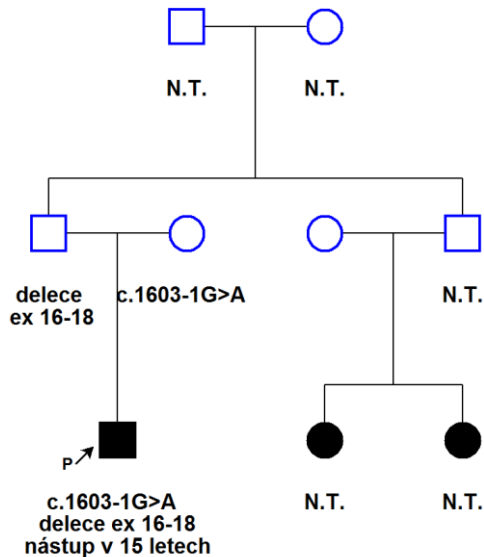
1.6.2. Pacienti s variantami v genu *SPG11*

Pacient s c.1603-1G>A a delecí exonů 16–18

Kombinace dvou heterozygotních variant, nové, dosud nepopsané sestříhové varianty *c.1603-1G>A* v intronu 7 a dosud nepopsané velké delece tří exonů genu *SPG11* byla nalezena u 26-letého pacienta romského původu. Sestříhová varianta *c.1603-1G>A* byla prokázána v heterozygotním stavu u zdravé matky probanda a delece tří exonů 16-18 byla prokázána v heterozygotním stavu u zdravého otce probanda. Obě varianty jsou tedy u pacienta na rozdílných alelách v pozici *trans*.

Pacient má problémy od 15 let věku, je u něho popisována progresivní porucha chůze, spasticita, bolest a slabost dolních končetin (DK), hyperreflexie a oboustranně výbavné pyramidové jevy iritační na DK. Informace o vyšetření MRI nejsou. Rodinná anamnéza je stran HSP pozitivní, stejné potíže jako má pacient jsou popsány i u dvou paternálních sester (Obr.15).

Obr.15: Rodokmen rodiny s variantou *c.1603-1G>A* a delecí exonů 16-18 v genu *SPG11*. (N.T. not tested). Vytvořeno za použití HaploPainter1.043.



Pacientka s homozygotní *c.3075dup* (*p.Glu1026Argfs)**

Popsaná varianta *c.3075dup* (*p.Glu1026Argfs**) v exonu 17 byla nalezena v homozygotním stavu u 33-leté pacientky. Varianta byla pomocí DNA vyšetření rodičů prokázána v heterozygotním stavu u obou zdravých rodičů pacientky.

Problémy charakteru HSP se u pacientky objevily v 18 letech, od té doby je patrná postupná progresse obtíží, nyní je pacientka téměř neschopna samostatné chůze, používá vozík. Rozvíjí se u ní dysartrie, mírné změny kognitivních funkcí, přítomen nystagmus. Poruchy mikce nejsou. Na DK jsou výbavné pyramidové jevy iritační, klonus, je patrný pes cavus, čítí je v normě. Na horních končetinách je přítomna hyperreflexie. MEP v normě, SEP (somatosenzorické evokované potenciály) jsou abnormální. V EMG je lehká senzitivní neuropatie, na MRI mozku jsou hypersignální ložiska.

Pacientka s variantou *c.5381T>C* (*p.Leu1794Pro*) a *c.5623C>T* (*p.Gln1875)**

Kombinace dvou heterogenních variant (missense a nonsense) v genu *SPG11* byla nalezena u 68-leté pacientky s nástupem obtíží zhruba v 60 letech věku, rodinná anamnéza je negativní. Ve zprávě je uvedena jen pozvolná progresse onemocnění a problémy s urgentní mikcí, další informace nejsou dostupné.

Pacient s variantou c.5381T>C (p.Leu1794Pro) a c.7138G>T (p.Glu2380*)

Kombinace těchto dvou heterozygotních variant byla nalezena u pacienta nar. 1946, první problémy s chůzí u něj začaly v 53 letech. Dostupné máme pouze kusé informace z roku 2006, kde je uvedena progresivní potíže, chůze s pomocí dvou francouzských holí. Dále hypotrofie svalstva a oslabení dolních končetin, výbavné pyramidové jevy iritační, čítí bylo normální. Pacient má údajně stejně postiženého bratra, rozvoj nemoci u něho je zhruba od stejného věku. Rodiče a pacientova dcera jsou zdraví.

1.6.3. Kauzalita variant v *SPG11* genu

U všech nalezených variant předpokládáme jejich kauzalitu. Krom jedné varianty byly všechny již dříve popsány s fenotypem HSP, což podporuje jejich kauzalitu. Varianta c.3075dup byla nalezena v homozygotním stavu u pacientky s HSP a u rodičů bylo potvrzeno, že jsou zdraví přenašeči. Popsaná varianta c.5381T>C byla nalezena u dvou nepříbuzných pacientů s fenotypem HSP, což dále podporuje její kauzalitu.

U pacienta s novou dosud nepopsanou variantou c.1603-1G>A a delecí exonů 16-18 byly vyšetřeni rodiče, u každého byla jedna z nalezených variant v heterozygotním stavu. To potvrzuje, že jsou nalezené varianty u pacienta v *trans* pozici a podporuje to jejich kauzalitu.

1.6.4. Fenotyp pacientů s *SPG11*

Mezi pacienty s nalezenými variantami v genu *SPG11* mají dva popisované nástup během druhé dekády (cca 15-20 let), dva nástup až po 50. roce věku. U jedné pacientky je popisována rovíjející se dysartrie, mírné změny kognitivních funkcí. U další pacientky jsou popisovány problémy s urgentní mikcí. Další podrobnější informace o pacientech nemáme k dispozici a fenotyp *SPG11* pacientů tak nelze zobecnit.

1.7. Gen *KIF5A*; HSP typu *SPG10*

Heterozygotní patogenní varianty v genu *KIF5A* jsou příčinou *SPG10* s autozomálně dominantní dědičností. V souboru vyšetřených pacientů pomocí NGS panelu genů byly nalezeny tři varianty v genu *KIF5A*, všechny typu missense, všechny v heterozygotním stavu, ani jedna nemá uvedenou frekvenci v populačních databázích. Dvě z nalezených variant byly již dříve popsány jako patogenní s fenotypem HSP, jedna varianta je nová, zatím nepopsaná, ale ve stejném nukleotidu, ve kterém již byla popsána jiná patogenní záměna s fenotypem HSP.

1.7.1. Nalezené varianty v genu *KIF5A*

c.610C>T (p.Arg204Trp)

Varianta *c.610C>T (p.Arg204Trp)* v exonu 8 byla nalezena v heterozygotním stavu u 49-leté pacientky, problémy se u ní objevily ve věku 45 let. Pacientka si stěžuje na nestabilitu při chůzi, slabost dolních končetin, chodí s francouzskou holí. Citlivost na dolní části těla je snížena. Pacientka dále popisuje zhoršení motoriky i na horních končetinách. Problémy s mikcí nejsou. Na MRI mozku z roku 2014 je popisována difuzní atrofie mozku, na MEP (motorické evokované potenciály) je průkaz postižení pyramidové dráhy v oblasti spinální do dolních končetin. Pacientky dcera (25 let) má údajně projevy DMO, další rodinná anamnéza je stran HSP negativní.

Nalezená varianta byla popsána jako patogenní (Tessa et al., 2008) u pacientky s podobným fenotypem včetně nástupu obtíží v dospělosti, poměrně rychlá progresse obtíží a snížení citlivosti na DK. Varianta je uvedena i v databázi ClinVar (RCV000516107.1), je v místě středně konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, predikce: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, ACMG kritéria: likely pathogenic, varianta je ve funkční motorické proteinové doméně.

c.759G>T (p.Lys253Asn)

Varianta *c.759G>T (p.Lys253Asn)* v exonu 9 byla nalezena v heterozygotním stavu u nyní 75-leté pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou stran HSP. Podobné obtíže jsou popisovány u jejího syna, který ale nebyl vyšetřen. Z osobní anamnézy máme jen informace, že obtíže začaly ve věku 45 let. Další informace nejsou k dispozici.

Varianta byla popsána jako patogenní a jako příčina SPG10 (Schule et al., 2008, Ebbing et al., 2008), s variabilním nástupem od 2 do 30 let s pomalou progresí, se sníženým vibračním čítím a subklinickou periferní neuropatií. Varianta je v místě slabě konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, predikce: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, ACMG kritéria: likely pathogenic, varianta je ve funkční motorické proteinové doméně.

c.838C>G (p.Arg280Gly)

Nová, dosud nepopsaná varianta *c.838C>G (p.Arg280Gly)* v exonu 10 byla nalezena v heterozygotním stavu u nyní 17-letého pacienta s nekomplikovanou HSP. První projevy jsou popisovány přibližně v pěti letech, podobně i u pacientova otce, který ale nebyl vyšetřen na DNA úrovni.

U pacienta je popisována spastická paraparéza dolních končetin (DK), výbavné pyramidové jevy iritační jevy na DK, pseudoklonus, nápadné dystonické držení nohy, třes na horních končetinách. Dále hraniční kognitivní funkce, bilaterální strabismus a progredující nápadná obezita. Sfinkterové poruchy nejsou. MRI mozku i hrudní míchy bylo s normálním nálezem. Na MEP vyšetření (motorické evokované potenciály) z roku 2013 jsou prokázány patologické hodnoty svědčící pro lézi pyramidové dráhy bilaterálně k dolním končetinám. U pacientova otce je popsána spastická paraparéza rozvíjející se od 5 roku věku. Nyní je otec upoután na vozík, je u něho popsán nystagmus, dysartrie, porucha jemné motoriky na horních končetinách. Na DK výbavné pyramidové jevy iritační, poruchy čítí, hybnost nohy v hleznu je nulová. Udává urgentní mikci.

Nalezená varianta dosud nebyla popsána, nicméně ve stejném kodonu již byly popsány dvě patogenní záměny c.839G>A a c.839G>T a dokonce ve stejném nukleotidu již byla popsána záměna c.838C>T (p.Arg280Cys) (Fichera et al., 2004, Ebbing et al., 2008, Liu et al., 2014), u pacienta s nástupem nemoci v 8 letech, nyní 39 let, upoután na vozík. Je u něho popisováno snížené vibrační čítí a zvýšený tonus na DK, dále kognitivní deficit. Fenotyp odpovídá našemu pacientovi: nástup v 5 letech, i u jeho otce, poruchy čítí, hraniční kognitivní funkce, dystonické držení nohy.

Jedná se tedy o hot-spot místo pro vznik mutací. Nalezená varianta je v místě středně konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, predikce: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, varianta je ve funkční motorické proteinové doméně, dle ACMG kritérií: likely pathogenic.

Ani u jedné varianty nebyla provedena segreganční analýza v rodině, ale u všech předpokládáme z výše uvedených důvodů kauzalitu.

1.7.2. Fenotyp pacientů s variantami v genu *KIF5A*

U pacientů s patogenními variantami v genu *KIF5A* nelze zobecnit fenotyp u SPG10. Nicméně u všech je popisována porucha čítí na DK. U jedné pacientky je popisováno lehké postižení motoriky na horních končetinách. Věk nástupu u našich třech pacientů je rozdílný – ve dvou případech ve věku 45 let, u posledního pacienta v 5 letech (stejně jako u jeho otce, který ale nebyl geneticky vyšetřen a můžeme tak jen předpokládat, že trpí SPG typu 10 s kauzální variantou nalezenou u jeho syna).

1.8. Gen *CYP7B1*; HSP typu SPG5

Bialelické patogenní varianty v genu *CYP7B1* jsou příčinou SPG5 s autozomálně recesivní dědičností. V genu *CYP7B1* byla nalezena v souboru vyšetřených pacientů jedna, již dříve popsaná, missense varianta c.889A>G (p.Thr297Ala) v homozygotním stavu.

c.889A>G (p.Thr297Ala)

Varianta c.889A>G (p.Thr297Ala) v exonu 4 genu *CYP7B1* (NM_004820.3) byla nalezena v homozygotním stavu u 38-letého pacienta s negativní rodinnou anamnézou. Pacient je dlouhodobě neurologicky sledován, první obtíže začaly kolem 5-6 roku života. Progrese onemocnění je velmi pomalá, ve věku 30 let byl pacient stále schopen samostatné chůze, dokonce jezdil na kole, řídil auto. V posledních letech se údajně obtíže zhoršují zejména při chůzi do schodů. Chůze je spastická s vtáčením špiček, dolní končetiny jsou výrazně ztuhlé. Sfincterové obtíže nemá. Na dolních končetinách jsou dle zprávy výbavné pyramidové jevy iritační, pseudoklonus, poruchy čítí. Neurologický nález na horních končetinách je normální, MRI mozku a hrudní míchy bylo s normálním nálezem.

Nalezená missense varianta c.889A>G (p.Thr297Ala) v genu *CYP7B1* byla již popsána jako patogenní (Goizet et al., 2009a, Di Fabio et al., 2014), jako patogenní je uvedena i v databázi ClinVar (RCV000106302.4) i dbSNP (rs587777222). V databázi ExAC je uvedena s nízkou frekvencí ExAC_All 0,0034 %. Varianta je v místě středně konzervovaného nukleotidu a vysoce konzervované aminokyseliny, predikčními programy je hodnocena jako závažná: PolyPhen 0,999 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, dle ACMG kritérií: likely pathogenic. je přítomna v proteinové doméně. Varianty v genu *CYP7B1* byly opakovaně popsány jako příčina SPG5.

Segregační analýza u pacienta nebyla provedena, variantu ale považujeme za kauzální, vzhledem k nízké frekvenci, homozygotní sestavě a fenotypu a rodinné anamnéze pacienta odpovídající AR dědičnosti. Varianta byla popsána v homozygotní sestavě již opakovaně, věk nástupu je však variabilní v různých rodinách od dětství do 3. až 4. dekády. U všech jedinců jsou popsány spíše závažné poruchy chůze, ataxie, závažné poruchy čítí na DK a problémy s močením. U některých je MRI mozku normální, u některých změny v bílé hmotě (Goizet 2009 Brain, DiFabio 2014 J Neurol). U našeho pacienta je progrese po době trvání nemoci cca 25 let prozatím mírná, nástup byl v dětství, jsou popisovány mírné poruchy čítí.

1.9. Gen *NIPAI*; HSP typu SPG6

Heterozygotní patogenní varianty v genu *NIPAI* jsou popsány jako příčina SPG10 s autozomálně dominantní dědičností. V genu *NIPAI* byla v souboru vyšetřených pacientů nalezena jedna, již dříve popsaná, kauzální missense varianta c.316G>A (p.Gly106Arg) v heterozygotním stavu.

c.316G>A (p.Gly106Arg)

Varianta c.316G>A (p.Gly106Arg) v exonu 4 genu *NIPAI* (NM_144599.4) v heterozygotním stavu byla nalezena u 42-leté pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou. Pacientka má zdravou sestru, u matky jsou uváděny obtíže s chůzí, stejně tak i u matčina bratra. Otec matky měl mít ve vyšším věku také problémy s chůzí, ale údajně spíše pourazové. Výsledek neurologického vyšetření nemáme k dispozici, ve zprávě od odesílajícího lékaře je pouze uvedeno, že problémy začaly v dětském věku.

Nalezená missense varianta c.316G>A (p.Gly106Arg) byla již popsána jako patogenní s fenotypem autozomálně dominantní HSP (Chen et al., 2005, Botzolakis et al., 2011, Goytain et al., 2007). Jako patogenní je uvedena i v databázi ClinVar (RCV000002631.2). Varianta je v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a středně konzervované aminokyseliny. Predikčními programy je hodnocena jako závažná: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, dle predikčních programů pro splicing je možné, že by mohla ovlivňovat sestřih mRNA (MaxEnt : + 20,9%, NNSPLICE: + 9,1%). Dle ACMG kritérií je hodnocena jako pathogenic. Varianta je přítomna v proteinové doméně proteinu DUF803 jehož funkce je zatím neznámá. Nalezená varianta nemá žádnou frekvenci v populačních databázích.

V genu *NIPAI* bylo dosud popsáno jen 5 variant s fenotypem HSP, všechny popsané varianty jsou missense. Jedna z popsaných pěti variant c.316G>A byla nalezena i u české pacientky. Variantu považujeme za kauzální, i když nebyla provedena segregáční analýza. Varianta byla však opakovaně popsána jako patogenní, místo c.316 je popisováno jako hot-spot pro vznik mutací (Hedera, 2013). Rodinná anamnéza pacientky odpovídá AD výskytu HSP. Varianta je popisována s variabilním nástupem onemocnění od dětství po dospělost (Chen et al., 2005, Hedera, 2013) u některých pacientů s poruchami čítí.

1.10. Gen *FA2H*; HSP typu SPG35

Bialelické patogenní varianty v genu *FA2H* jsou popisovány jako příčina HSP typu 35 s autozomálně recesivní dědičností. V genu *FA2H* byla v souboru pacientů vyšetřených sekvenováním panelu genů nalezena nová, dosud nepopsaná missense varianta c.130C>T (p.Pro44Ser) v homozygotním stavu.

c.130C>T (p.Pro44Ser)

Varianta c.130C>T (p.Pro44Ser; NM_024306.4) v homozygotním stavu v exonu 1 byla nalezena u pacienta pocházejícího z české menšiny v Rumunsku (z Banátu). Prvních projevů nemoci, (poruch stability a problémů s chůzí) si pacient všiml v 16-ti letech. Problémy se od té doby postupně zhoršovaly, ve věku 30 let je však pacient stále schopen samostatné chůze, i když s námahou a velkými obtížemi. V neurologickém nálezu je u pacienta bilaterální symetrická hyperreflexie na dolních končetinách, pozitivní příznak Babinski, klonus, pes cavus. U pacienta se rozvíjí dysartrie, mírný mozečkový syndrom s nystagmem, na horních končetinách je mírná dystonie. U pacienta je pozorován mírný kognitivní deficit, ačkoliv pacient sám si na změny v tomto směru nestěžuje. Pacient nemá problémy s polykáním ani s dysfunkcí sfinkterů. V roce 2007 byly normální hodnoty SEP i MEP. Na MRI mozku v roce 2009 nebyly patrné ještě žádné změny, ale v roce 2014 již byly patrné změny v bílé hmotě, mírná atrofie mozku i mozečku a atrofie corpus callosum (Obr.17).

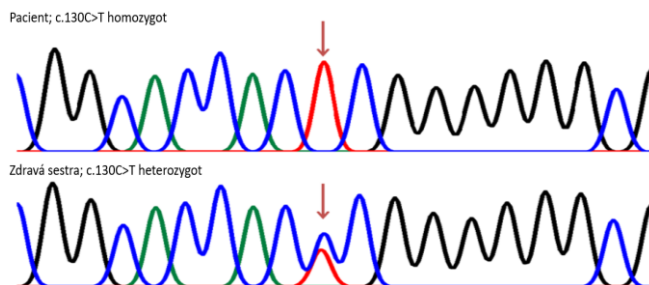
Nalezená varianta není popsána v populačních databázích, není uvedena v HGMD databázi, je lokalizována ve vysoce konzervovaném nukleotidu i aminokyselině (až k *Saccachoromyces caerevisiae*). Predikčními programy je hodnocena jako závažná: PolyPhen 0,999 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, ACMG kritéria: pathogenic. V segregační analýze byla varianta potvrzena v heterozygotním stavu u zdravé sestry pacienta a jejího zdravého syna. Pro další segregační analýzu nebyly dosud získány vzorky DNA od rodičů, žijících v Rumunsku.

SPG35 je vzácný typ HSP, celkově byla prozatím popsána přibližně jen v 30 rodinách celosvětově, typicky s časným nástupem do začátku druhé dekády, na MRI jsou typické změny v bílé hmotě (leukodystrofie), atrofie mozku i mozečku, tenké corpus callosum. U pacientů se projevuje zhoršením kognitivních funkcí, mentální deteriorací, dysarthrií, později dysfágií, přítomna může být i dystonie a prognóza je spíše špatná (Dick et al., 2010, Donkervoort et al., 2014, Magariello et al., 2017). Bialelické patogenní varianty v genu *FA2H*

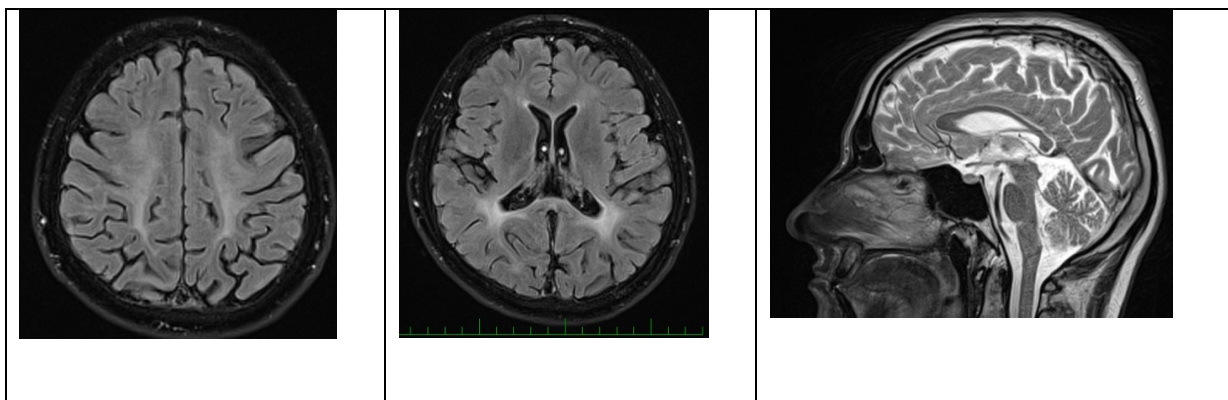
vedou k fenotypu tzv. FAHN (fatty acid hydroxylase associated neurodegeneration), které se projevují buď jako spastická paraparéza nebo leukodystrofie nebo neurodegenerace s akumulací Fe iontů v mozku.

Fenotyp pacienta odpovídá již jiným popsaným pacientům s SPG35. U pacienta je dle rodinné anamnézy možná AR dědičnost, variantu proto považujeme za kauzální. Varianta byla nalezena v heterozygotním stavu u zdravých příbuzných (sestry a synovce), což podporuje kauzalitu (Obr.18). Pacientovi rodiče mají pravděpodobně společného předka a varianta může mít vyšší frekvenci v české menšině v Rumunsku.

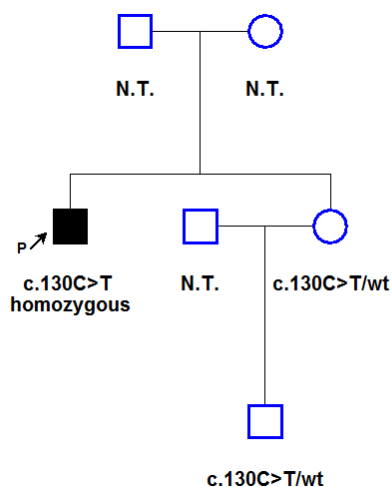
Obr.16: *Sekvence s variantou c.130C>T v genu FA2H u pacienta s SPG35 a jeho zdravé sestry.*



Obr.17: *Snímky z MRI mozku pacienta s SPG35 s hypersignálními ložisky a mírnou atrofií mozku a mozečku*



Obr.18: Rodokmen rodiny s variantou *c.130C>T* v genu *FA2H*. (N.T. not tested, WT wild type). Vytvořeno za použití HaploPainter 1.034



1.11. Gen *FARS2*; HSP typ SPG77

Varianty v genu *FARS2* byly vzácně popsány s fenotypem HSP jako SPG77. Pomocí NGS sekvenování panelu HSP genů byly u pacienta s nekomplikovanou HSP nalezeny dvě heterozygotní varianty v genu *FARS2*.

U pacienta byla nalezena missense varianta *c.1082C>T* (p.Pro361Leu) v exonu 6 genu *FARS2* (NM_001318872.1) v heterozygotním stavu a pomocí CNV analýzy NGS dat byla nalezena delece prvních dvou exonů (první nekódující, druhý je prvním kódujícím exonem) genu *FARS2* v heterozygotním stavu, která byla potvrzena pomocí ArrayCGH. Pacient je tedy složený heterozygot pro dvě heterozygotní pravděpodobně kauzální varianty v genu *FARS2*.

Pacientovi je nyní 21 let, první obtíže udává od 4-5 let. Rodinná anamnéza je stran HSP negativní, pacient je jediný postižený v rodině, pacient je romského původu. Progrese onemocnění je pomalá, v současnosti je pacient bez problémů schopen samostatné chůze, i když ta je spastická s vtáčením špiček. Neurologicky je u pacienta hyperreflexie na dolních končetinách, klonus, normální cití. Neurologický nález na horních končetinách je normální. Nerozvíjí se dysartrie, mentální deteriorace, urgentní mikce, není přítomen nystagmus. MRI mozku a míchy, EMG a SEP vyšetření jsou v normě.

Missense varianta byla nyní nově popsána jako patogenní (Vantroys et al., 2017) s fenotypem komplikované HSP. Varianta je v místě vysoce konzervované nukleotidu i aminokyseliny, predikčními programy je hodnocena jako závažná: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT : deleterious. Varianta je uvedena v databázi dbSNP jako pravděpodobně

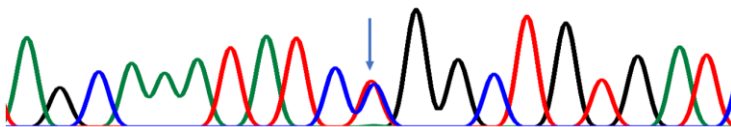
patogenní (rs751459058), dle ACMG likely pathogenic. Varianta má poměrně vysokou frekvenci, v ExAC_All 0,013 %.

Delece exonů 1 a 2 byla potvrzena pomocí ArrayCGH, byla nalezena delece v oblasti 6p25.1 o minimální velikosti 100,4 kb a maximální velikosti 151,6 kb, která zasahuje dva geny: *LYRM4* (deletovaný je 1. exon) a *FARS2* (delece zasahuje 1. a 2. exon a končí v 2. intronu).

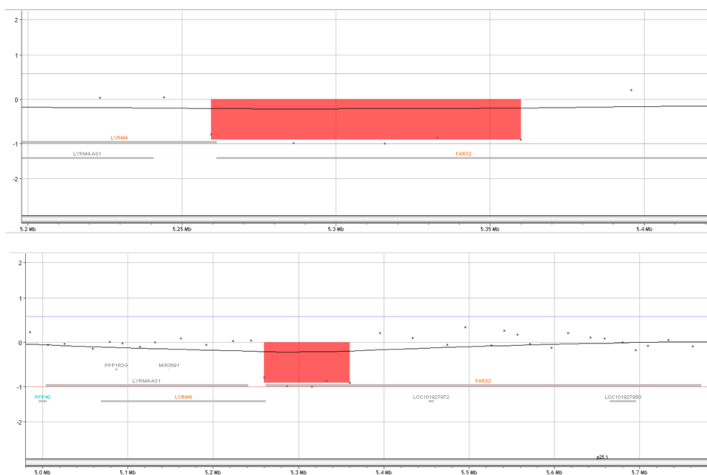
Kombinaci těchto dvou variant považujeme u pacienta pravděpodobně za kauzální, dědičnost odpovídá sporadickému výskytu HSP v rodině. Je však třeba prokázat tyto dvě varianty jednotlivě u rodičů pacienta a u pacienta tedy v *trans* pozici.

Missense varianta c.1082C>T byla v heterozygotním stavu potvrzena u zdravé matky pacienta, v současnosti čekáme na DNA vzorky zdravého otce a zdravého bratra pacienta.

Obr.19: Sekvence s variantou c.1082C>T v genu *FARS2* v heterozygotním stavu u pacienta s *SPG77*



Obr.20: Výsledek z SNP Chip Array s delecí zasahující dva exony genu *FARS2* a jeden exon sousedního genu *LYRM4*. (Použitý chip SurePrint CGH 4x180K G3 ISCA_V2, Agilent Technologies, US)



1.12. Varianta nejasného významu v genu *WASHC5* (KIAA0196)

Heterozygotní patogenní varianty v genu *WASHC5/KIAA0196* byly opakovaně popsány jako příčina autozomálně dominantního typu nekomplikované HSP typu SPG8. V genu bylo dosud popsáno 11 variant (všechny missense) s fenotypem nekomplikované HSP, s nástupem onemocnění v dospělosti, z ostatních znaků jsou popisovány pouze porucha čítí na DK a problémy s inkontinencí.

U 46-leté pacientky s pozitivní rodinnou anamnézou stran HSP byla nalezena nová, dosud nepopsaná varianta c.553G>A (p.Asp185Asn) v exonu 6 genu *WASHC5* (NM_014846.3) v heterozygotním stavu. V rodině jsou popisovány obtíže u pacientčina bratra, jejich otce a strýce (otcova bratra) a u pacientčiny dcery. Podrobná neurologická zpráva není k dispozici, začátek obtíží je uveden mezi 20 a 30 lety.

Nalezená varianta je v místě vysoce konzervovaného nukleotidu a středně konzervované aminokyseliny, predikčními programy je hodnocena různě: PolyPhen 0,999 Probably damaging, SIFT: tolerated, Mutation Taster: disease causing, dle ACMG uncertain significance. Varianta nemá uvedenou frekvenci v populačních databázích a je přítomna v proteinové doméně.

U nalezené varianty c.553G>A (p.Asp185Asn) v exonu 6 genu *WASHC5* není možné zatím potvrdit ani vyloučit kauzalitu. U pacientky nemáme ani dostatek informací k porovnání fenotypu. Je známo pouze, že v rodině je výskyt onemocnění s AD dědičností. Nalezená varianta je sice nová, neuvedená v populačních databázích, nicméně je třeba ji posuzovat velmi obezřetně. Varianta je sice ve funkční proteinové doméně, ale i predikčními programy je hodnocena různě. Navíc v genu existuje dle (Jahic et al., 2014) množství vzácných, dosud nepopsaných variant s nespolehlivou predikcí. Bez provedené segregační analýzy není možné rozhodnout o její kauzalitě.

1.13. Patogenní varianta v genu *SPAST* nezachycená pomocí předchozího Sangerova sekvenování

U 60-ti leté pacientky s typickými příznaky nekomplikované HSP byla pomocí NGS panelu genů (design verze 1; 28 genů) nalezena nová, dosud nepopsaná varianta c.1321+2 T>G v intronu 10 genu *SPAST* v heterozygotním stavu (NM_014946.3). Vzhledem k dříve popsáným kritériím výběru pacientky šlo o překvapivý nálezn, neboť všechny kódující

a přilehlé intronové oblasti genu *SPAST* byly již dříve osekvenovány klasicky dle Sangerova s negativním výsledkem.

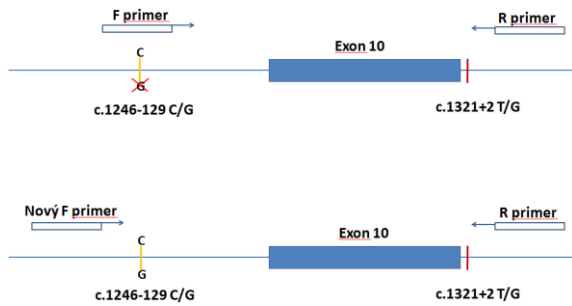
Při vizualizaci NGS sekvenačních dat (tzv. BAM files) programem AlamutVisual byla zřejmá ještě jedna varianta u této pacientky v intronu 9: c.1246-129C>G v heterozygotním stavu. Po kontrole sekvence primerů pro PCR se ukázalo, že forward primer nasedal přímo v místě této velmi vzácné intronové varianty a došlo tedy k nenednutí primeru s důsledkem výpadku amplifikace jedné alely, tzv. allele drop-out (a to zrovna alely s kauzální variantou) a preferenční amplifikaci produktů nemutované (wild typem) alely. Obě varianty jsou tedy pravděpodobně v pozici cis.

Zajímavý je dále fakt, že intronová varianta c.1246-129C>G nebyla dosud popsána v populačních databázích a nemohlo s ní být tak počítáno při návrhu primerů. Jedná se pravděpodobně o vzácnou benigní intronovou variantu. Při zopakování Sangerova sekvenování s jiným párem PCR primerů došlo ke správnému naamplifikování obou alel a potvrzení heterozygotního stavu varianty (Obr.23).

Nalezenou dosud nepopsanou sestřihovou variantu c.1321+2 T>G v intronu 10 genu *SPAST* považujeme s největší pravděpodobností patogenní a kauzální. Změna v invariantním +2 nukleotidu s vysokou pravděpodobností ovlivňuje sestřih RNA i dle *in silico* predikcí: MaxEnt: -100%, NNSPLICE: -100%. Dle ACMG kritérií hodnocena jako pathogenic. Ve stejném nukleotidu již byla popsána jiná patogenní záměna c.1321+2 T>A (Elert-Dobkowska et al., 2015) u pacienta s nekomplikovanou SPG4.

Fenotypově pacientka odpovídá nekomplikované SPG4, s poruchami chůze, hyperreflexií na dolních končetinách, výbavnými pyramidovými jevy iritačními, urgentní mikcí. Nástup obtíží byl v 53 letech, stejné obtíže měla dle rodinné anamnézy i její matka, což vše odpovídá SPG4 s autozomálně dominantním typem dědičnosti. Neurologické zprávy ani další anamnestické údaje ostatních členů rodiny, ani vzorky DNA nebyly k dispozici, nicméně vzhledem k výše uvedeným skutečnostem považujeme nalezenou variantu c.1321+2 T>G za kauzální pro SPG4 u pacientky.

Obr.21: Grafické znázornění principu allele drop-out u varianty c.1321+2 T>G v genu SPAST



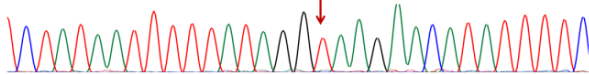
Obr.22: Vizualizace BAM files v místě obou variant v genu SPAST: benigní varianta c.1246-129C>G v místě forward PCR rimeru a kauzální varianta c.1321+2 T>G v intronu 10.

Vizualizace pomocí AlamutVisual, Interactive Biosoftware.

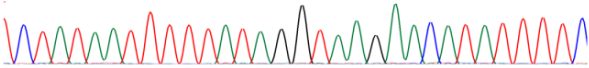


Obr.23: Sekvence s kauzální variantou c.1321+2 T>G v genu SPAST; zdravá kontrola (a), allele drop-out (b) a heterozygotní signál při použití nového forward primeru (c).

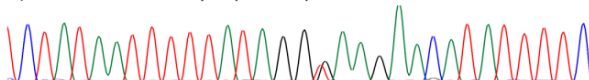
a) Zdravá kontrola (WT)



b) Allele drop-out, sekvenování původní párem primerů



c) Sekvenování novým párem primerů



1.14. Varianta v genu *ATL1* ; HSP typ SPG3

Heterogenní patogenní varianty v genu *ATL1* jsou příčinou SPG typu 3 typickým zejména pro pacienty s časným nástupem onemocnění a pomalou progresí. V genu *ATL1* (NM_181598.3) byla ze všech vyšetřených pacientů pomocí NGS sekvenování panelu genů nalezena pouze jedna suspektní varianta c.402A>C (p.Lys134Asn) v exonu 4 v heterozygoním stavu.

c.402A>C (p.Lys134Arg)

Varianta není uvedena v populačních databázích, jedná se o novou, zatím nepopsanou variantu v místě nekonzervovaného nukleotidu a slabě konzervované aminokyseliny. Mezi lysinem a asparaginem je jen malá fyziologická odlišnost, predikčními programy je varianta hodnocena různě: SIFT: tolerated, Mutation Taster: disease causing, PolyPhen 0,001 Benign, dle ACMG likely pathogenic.

Varianta byla nalezena u nyní desetileté pacientky zdravých rodičů, v rodině nejsou udávány žádné neurologické obtíže. Od šesti let se u pacientky začala projevovat porucha chůze. Ve zprávě z roku 2015 (věk 7 let) je popisována paraparetická chůze s addukcí kolen a vtáčením špiček, neurologicky údajně naznačené pyramidové jevy iritační, vše ostatní bylo v normě včetně MRI mozku. Nemáme bohužel k dispozici novější neurologické vyšetření, a tedy ani informaci o progresu onemocnění. Nalezená varianta byla klasickým sekvenováním potvrzena u zdravé matky pacientky, což významně zpochybňuje její kauzalitu.

2. Celoxomové sekvenování (WES)

U šesti jedinců bylo provedeno celoxomové sekvenování (WES), jednalo se o čtyři pacienty se suspektní HSP a dva příbuzné jednoho z pacientů.

U tří ze čtyř pacientů bylo předtím provedeno NGS sekvenování panelu genů tak, jak bylo popsáno výše. U dvou pacientů nebyla nalezena kauzální varianta pomocí NGS panelu genů, a proto bylo dále provedeno WES. U jednoho pacienta bylo provedeno WES, protože u něho byla pomocí NGS panelu genů nalezena podezřelá nonsense varianta v genu *REEPI* (p.Leu144*), která byla potvrzena i u jeho zdravé matky, což významně zpochybnilo kauzalitu varianty (viz dříve IV:/1.4.2.). Ani WES u něho však neodhalilo žádnou kauzální nebo podezřelou variantu, a proto byl dále WES provedeno i u jeho stejně postiženého bratra a jejich zdravé matky, aby mohl být porovnán status zygotity případných podezřelých variant (heterozygot/homozygot) u obou bratrů a matky.

U posledního ze šesti pacientů bylo provedeno WES rovnou bez předchozího vyšetření NGS panelu genů, neboť na základě indikace byla zvažována komplikovaná HSP, jejíž příčina by nemusela být nalezena sekvenováním panelu genů navržených pro nekomplikovanou HSP.

2.1. Výsledky WES

U dvou ze čtyř vyšetřovaných pacientů pomocí WES byla nalezena kauzální varianta. Pro přehlednost označím pacienty vyšetřené pomocí WES čísly 1 až 4.

Pacient 1: U pacientky vyšetřené dříve pomocí sekvenování panelu genů (verze 1, 28 genů), byly nalezeny dvě kauzální varianty v heterozygotním stavu v genu *ALS2*.

Pacient 2: U pacienta, který nebyl vyšetřen pomocí sekvenování panelu genů, byla překvapivě nalezena kauzální varianta v genu *SPG11*.

Pacient 3: U pacienta, u kterého byla předtím nalezena nonsense varianta p.Leu144* v genu *REEPI* nebyla ani pomocí WES nalezena kauzální varianta, dokonce ani po společném vyhodnocení WES dat jeho stejně postiženého bratra a jejich společné zdravé matky.

Pacient 4: U posledního pacienta vyšetřeného dříve sekvenováním panelu genů (verze 1, 28 genů), byla pomocí WES nalezena suspektní de novo varianta v dosud nepopsaném genu *KLC3*, nalezenou variantu nicméně zatím považujeme za nekauzální.

2.2. Pacientka 1:

Pacientka je od 4 let sledována pro atypickou chůzi. Nyní v 17 letech je stále schopna samostatné chůze, ujde i delší vzdálenosti v pomalejším tempu, není schopna běhu. Intelekt je normální. Na DK je hyperreflexie, pseudoklonus, výbavné pyramidové jevy iritační jevy na DK i na HK. Je přítomen nystagmus, progreduje rozvoj dysartrie. MRI mozku i míchy, EMG byly s normálním nálezem. Rodinná anamnéza je stran HSP negativní, pacientka má zdravého bratra.

WES odhalilo dvě nové, dosud nepopsané varianty v genu *ALS2*, obě v heterozygotním stavu: c.575C>T (p.Pro192Leu) v exonu 4 a c.2237_2238del (p.Cys746Leufs*) v exonu 11. V genu *ALS2* je popisována autozomálně recesivní dědičnost.

Varianta **c.575C>T (p.Pro192Leu)** je v místě vysoce konzervované nukleotidu a středně konzervované aminokyseliny, predikčními programy hodnocena jako závažná: PolyPhen 1,000 Probably damaging, SIFT: deleterious, Mutation Taster: disease causing, ACMG likely pathogenic. Varianta je ve funkční proteinové doméně. Varianta nemá uvedenou frekvenci v populačních databázích, není uvedena ani v HGMD databázi jako patogenní, nebyla dosud popsána. Varianta byla prokázána v heterozygotním stavu u zdravé matky pacientky.

Frame shift varianta **c.2237_2238del (p.Cys746Leufs*)** je taktéž nová, dosud nepopsaná, není uvedena s žádnou frekvencí v populačních databázích. Vede k předčasnému vzniku terminačního kodonu, dle ACMG pathogenic. Varianta byla prokázána v heterozygotním stavu u zdravého otce pacientky.

Nalezené varianty jsou v pozici *trans* a považujeme je za kauzální. Pacientka je složená heterozygotka pro dvě nepopsané patogenní varianty v genu *ALS2*. Každý z rodičů je bezpříznakovým heterozygotním nosičem jedné z variant, což podporuje kauzalitu.

Také fenotyp pacientky naprosto odpovídá fenotypu již popsáným pacientům s tzv. IAHSPP s variantami v genu *ALS2* s časným nástupem, postižením nejprve dolních končetin, později horních a postupně se rozvíjející dysartrie, později i dysfágie, bez postižení intelektu. Bialelické patogenní varianty v genu *ALS2* jsou popisovány buď s fenotypem ALS (amyotrofické laterální sklerózy) nebo juvenilní ALS (Sheerin et al., 2014) nebo právě IAHSPP (Eymard-Pierre et al., 2002).

2.3. Pacient 2:

Nyní 22-letý pacient nebyl zařazen k vyšetření sekvenování panelu genů, neboť byl popisován spíše jako komplikovaný fenotyp. Od dětství je u něho popisována lehká mentální retardace, opoždění vývoje i řeči. V 15 letech se začaly projevovat problémy s chůzí, pomalu progredující, nyní stále schopen samostatné chůze. Ve zprávě z roku 2012 je na DK hyperreflexie, klonus nohy, výbavné pyramidové iritační jevy, dále počínající poruchy cití od kolen. Na HK také hyperreflexie, porucha jemné i hrubé motoriky. Na MRI mozku jsou změny v bílé hmotě, počínající leukodystrofie. EEG je nápadně pomalé, VEP, BAEP (vizuální a sluchové evokované potenciály) jsou abnormní. Novější zprávy nemáme k dispozici.

U pacienta byla při vyhodnocení dat z celoexomového sekvenování nalezena nová, dosud nepopsaná vysoce suspektní sestřihová varianta c.3454-2A>G v intronu 19 genu *SPG11* v heterozygotním stavu. Varianta nebyla dosud popsána, nemá uvedenou frekvenci. Je v akceptorovém sestřihovém místě v invariantním -2 nukleotidu, s největší pravděpodobností tak ovlivňuje normální sestřih RNA. Predikčními programy je též hodnocena jako závažná: MaxEnt: -100 %, NNSPLICE: -100 %. ACMG kritéria: pathogenic.

Další suspektní bodová varianta v genu *SPG11* nebyla nalezena, v genu je popisována autozomálně recesivní dědičnost, bylo proto provedeno vyšetření pomocí MLPA kitem P306 *SPG11* obsahující proby pro všechny kódující exony genu *SPG11* k ověření přítomnosti velké delecce v genu *SPG11* na opačné alele. Vyšetření pomocí MPLA prokázalo heterozygotní delecí exonů 37, 38 a 39 genu *SPG11* (Obr.24).

Pacient je tedy pravděpodobně složený heterozygot pro dvě nové varianty patogenní varianty v genu *SPG11*: c.3454-2A>G a delecce exonů 37-39 genu *SPG11*. Předpokládáme jejich kauzalitu vzhledem k závažnosti obou variant, bylo by však třeba vyšetřit rodiče pro potvrzení, že jsou obě varianty v pozici trans, tedy na různých alelách.

2.4. Pacient 3:

U pacienta s dříve nalezenou suspektní variantou p.Leu144* v exonu 7 genu *REEPI*, u které ale není jistá kauzalita, bylo provedeno WES. Ani pomocí této metody však nebyla nalezena žádná podezřelá varianta, která by mohla vysvětlovala fenotyp.

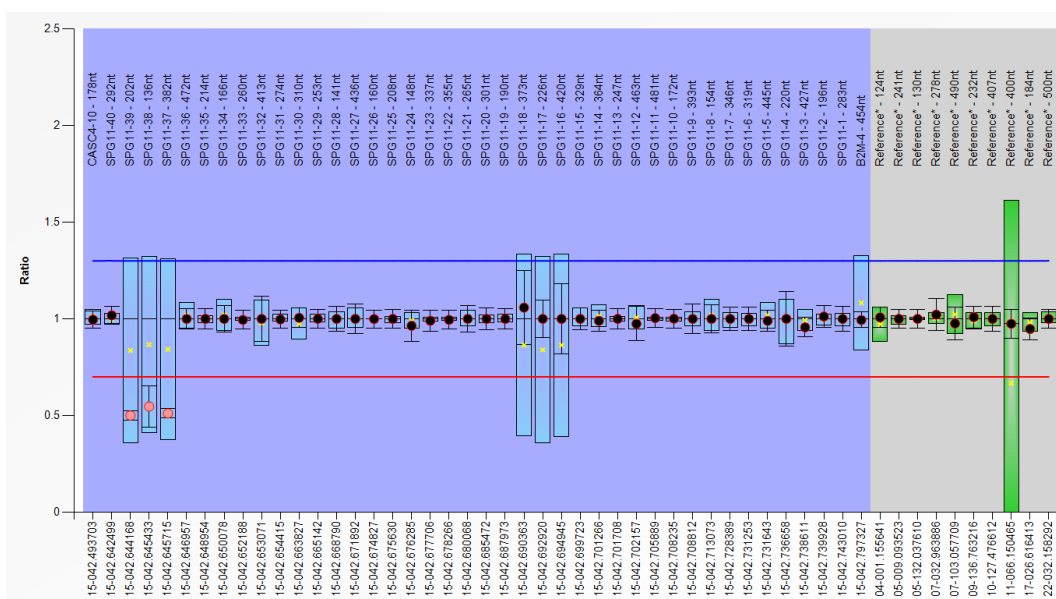
Byla nalezena varianta c.1529C>T (p.Ala510Val) v exonu 11 genu *SPG7* v heterozygotním stavu. U *SPG7* je popisována autozomálně recesivní dědičnost. Tato varianta byla opakovaně popsána jako patogenní např. (Brugman et al., 2008, Bonn et al., 2010), v HGMD s fenotypem postižení centrálního motoneuronu (kam patří i HSP), jako

patogenní byla uvedena opakovaně i v databázi ClinVar a dbSNP. Varianta má uvedenou poměrně vysokou frekvenci v populačních databázích: ExAc_All 0,25 %. Je v místě vysoce konzervované nukleotidu i aminokyseliny, predikčními programy je hodnocena jako závažná. Byla provedena segregace v rodině a varianta segregovala s onemocněním, resp. byla přítomna v heterozygotním stavu jen u postižených členů rodiny (oba bratři a sestra s počínajícím postižením) a nebyla přítomna u zdravé matky a zdravé sestry. Jiná další bodová varianta v genu *SPG7* však nebyla v datech z celoxomového sekvenování nalezena, bylo proto provedeno vyšetření pomocí MLPA kitem P213 HSP pro ověření přítomnosti velké delecce v genu *SPG7* s negativním výsledkem. Samotná heterozygotní varianta v genu *SPG7* fenotyp pacienta nevysvětluje.

Také byla nalezena varianta c.1327del (p.Glu443Lysfs*64) v exonu 12 genu *CHRNE* v heterozygotním stavu. Tato varianta je popisována s fenotypem kongenitální myastenický syndrom a má vyšší frekvenci přenašečů v romské populaci. V heterozygotním stavu však nevysvětluje fenotyp pacienta ani jeho bratra, oba jsou jen bezpříznakoví přenašeči této varianty.

WES bylo poté provedeno i u stejně postiženého bratra a jejich zdravé matky (DNA otce není k dispozici pro provedení trio analýzy) a byly hledány vzácné společné varianty (a zejména homozygotní varianty) u obou postižených bratrů. Ani po srovnání dat těchto tří jedinců nebyla nalezena žádná další dostatečně suspektní varianta.

Obr.24: MLPA, heterozygotní delecce exonů 37-39 v genu *SPG11*. Vyhodnoceno pomocí Coffalyzer, MRC Holland, Nizozemsko.



2.5. Pacient 4:

Poslední pacient vyšetřený pomocí WES je chlapec nyní 10-letý, dlouhodobě hypotrofický, s normálním intelektem. Je u něho popisována hypotrofie svalů a hyperreflexie na HK i DK, na DK spasticita, stigmatizace, mírná ptóza, hypomimie. Pacient je již dlouhodobě neschopen samostatné chůze. Má pozitivní perinatální anamnézu, ve 13. týdnu těhotenství úmrtí dvojčete. V rodině je popisována spastická paraparéza u pacientovy babičky a jejích dvou sester. Fenotyp pacienta však celkově neodpovídá fenotypu nekomplikované HPS

U pacienta bylo dříve provedeno sekvenování panelu genů (28 genů, verze1) s negativním výsledkem. V datech z WES nebyla nalezena žádná suspektní varianta v OMIM genech. Nalezené varianty ve vcf souboru byly dále filtrovány na základě informací z databáze UniProt a byla nalezena suspektní nonsense varianta c.953T>A (p.Leu318*) v heterozygotním stavu v exonu7 genu *KLC3*, který dosud nebyl popsán s žádným fenotypem. Varianta je u pacienta vzniklá *de novo*, nebyla prokázána ani u jednoho z rodičů, dle ACMG kritérií je hodnocena jako pathogenic. Variantu nicméně nepovažujeme za kauzální.

3. Dříve diagnostikovaní pacienti s SPG4 a SPG3

3.1. SPG4 pacienti diagnostikovaní v rámci DNA diagnostiky v centru Gennet

K doplnění celkového přehledu o genetickém pozadí HSP u českých pacientů byly vyhodnoceny i výsledky dřívějšího klasického/Sangerova sekvenování genu *SPAST* u českých pacientů provedeného v Centru lékařské genetiky a fetální medicíny GENNET, s.r.o., i když toto není původním záměrem dizertační práce. Geny *SPAST* i *ATL1* jsou však dlouhodobě vyšetřovány v České republice pouze právě v laboratoři této kliniky, nalezené kauzální varianty v těchto genech a jejich počet jsou tak reprezentativní pro skupinu českých pacientů s HSP a spojení těchto výsledků s výsledky dizertační práce dovolí zmapovat genetické charakteristiky českých HSP pacientů.

Pomocí klasického sekvenování všech 17 kódujících včetně přilehlých intronových oblastí genu *SPAST* bylo vyšetřeno 396 nepříbuzných pacientů s podezřením na HSP a dále 78 jejich příbuzných, celkem 474 jedinců. Mezi 396 nepříbuznými pacienty bylo 154 (39 %) familiárních pacientů, 163 (41 %) sporadických, u zbylých 79 (20 %) nebyly žádné další informace a nebyly tedy známy ani údaje z genealogie. Kauzální varianta byla nalezena u 53 nepříbuzných pacientů (13,4 %) z celé skupiny 396 nepříbuzných pacientů. Z těchto pozitivních pacientů bylo 38 ze skupiny familiárních a jen 5 ze skupiny sporadických, zbylých 10 je ze skupiny pacientů s neznámým rodinným statutem, což představuje 24,7 % (38 ze 154) objasněných ve skupině familiárních pacientů a jen 3,1 % (5 ze 163) objasněných ve skupině sporadických vyšetřených pomocí klasického sekvenování genu *SPAST*. Ze všech SPG4 pozitivních pak tvoří familiární pacienti 72 % (38 z 53).

Celkem 146 nepříbuzných pacientů se suspektní HSP bylo také vyšetřeno pomocí MLPA na přítomnost velké delece kódujících oblastí *SPAST* genu (kit P-165 HSP). Již dříve byly vyšetřeni všichni pacienti zaslání v letech 2005 – 2009, v rámci této práce pak byli pomocí MPLA vyšetřeni všichni vybraní pro NGS sekvenování panelu HSP genů. Ze všech vyšetřených 146 pacientů byla u 4 byla nalezena velká delece genu *SPAST* (jen 3 % ze všech vyšetřených).

Podrobnosti jsou uvedeny v publikaci Meszarosova et al., 2016.

3.2. SPG3 pacienti diagnostikovaní v rámci DNA diagnostiky v centru Gennet

Vyhodnoceny byly též výsledky předchozího klasického sekvenování všech 13 kódujících exonů plus přilehlých intronových oblastí genu *ATL1* v Centru lékařské genetiky a fetální medicíny GENNET, s.r.o. u celkem 111 pacientů. Bylo nalezeno celkem 5 variant

(NM_181598.3), všechny missense. Jedna z nalezených variant je již popsáný málo častý polymorfismus (c.311A>G, p.Asn104Ser, rs3777736535) s frekvencí 0.01% u non-Finish evropské populace dle ExAC, nalezená u pacientky s nástupem nemoci po 50. roce věku, což neodpovídá fenotypu SPG3A.

Všechny ostatní čtyři nalezené varianty byly nové, zatím nepopsané, nicméně pouze dvě byly nakonec vyhodnoceny a interpretovány jako kauzální: c.1039A>C a c.1064A>T. Varianta c.1039A>C (p.Met347Leu) byla nalezena u pacientky s nástupem prvních obtíží ve dvou letech, dívka žije v adoptivní rodině, nicméně se podařilo získat lékařské zprávy jejího biologického otce, kde je v rodině popisována HSP ve více generacích (biologický otec, jeho bratr, jejich matka – všichni s nástupem v dětství). Varianta c.1064A>T byla nalezena u pacientky s nástupem prvních obtíží ještě před ukončením 1. roku života. V rodině nejsou popsány neurologické obtíže, nicméně varianta byla později potvrzena v mozaice u pacientčina zdravého otce jak ve vzorku z periferní krve (mezodermální tkáň), tak ze vzorku ze slin (ektodermální tkáň) a předpokládáme, že vznikla de novo u pacientčina otce během raného zárodečného vývoje.

Další dvě nalezené varianty c.505A>G a c. 916A>G byly obě nalezeny u pacientů s nástupem v dětství, nicméně nebyly uznány kauzálními, neboť byly nalezeny vždy u jednoho ze zdravých rodičů pacientů.

U všech tří pacientů, u kterých byla Sangerovým sekvenováním nalezena nekauzální varianta v genu *ATLI*, bylo následně provedeno NGS sekvenování panelu genů (vyšetření ve verzi 2, 38 genů), ani u jednoho z nich nebyla nalezena kauzální varianta v některém z vyšetřovaných 38 genů.

Vzhledem k tomu, že klasické Sangerovo sekvenování genu *ATLI* není původním cílem této práce, pro podrobnější informace o pacientech a nalezených variantách odkazují na svůj článek (Meszarosova et al., 2017).

3.3. Celkový počet SPG3 pacientů mezi českými pacienty s HSP

Gen *ATLI* (resp. všechny jeho kódující oblasti plus přilehlé intronové) byl tedy vyšetřen u celkem 204 pacientů (111 pomocí Sangerova sekvenování, 96 pomocí NGS, ale 3 oběma metodami). Z vyšetřených pacientů bylo 103 sporadických a 75 familiárních, u 26 pacientů Sanger sekvenovaných nebyl znám bližší rodinný status. Ve skupině všech vyšetřených bylo 49 pacientů mladších 18 let.

Kauzální varianta byla nalezena pouze u dvou pacientů (varianty c.1039A>C a c.1064A>T) v obou případech u pacientů s nástupem v dětství. To představuje jen 1% ze

všech vyšetřených (2 z 204) a 4 % (2 ze 49) ze skupiny pacientů mladších 18 let. Výskyt SPG3 je tedy mezi českými HSP pacienty velice nízký.

V rámci testování genu *SPAST* na přítomnost velkých delecí pomocí MLPA kitu P-165 HSP byl u všech pacientů testován automaticky také gen *ATLI*, protože kit obsahuje proby pro oba geny. Pro přítomnost delece pomocí MLPA bylo tedy vyšetřeno celkem 146 pacientů, ani u jednoho z nich nebyla nalezena delece v genu *ATLI*.

4. Spektrum genetických typů HSP (včetně SPG4 a SPG3) u českých pacientů s nekomplikovanou formou nemoci.

Sumarizace dlouhodobých výsledků ze všech provedených vyšetření

4.1. Celkový přehled provedených vyšetření u českých pacientů s HSP.

Počet objasněných pacientů

V celém souboru českých pacientů se suspektní HSP byla u různých a rozdílně velkých skupin pacientů provedena tato vyšetření:

- 1/ Sangerovo sekvenování *SPAST* genu: celkem u 396 nepříbuzných pacientů, počet objasněných: 53 pacientů.
- 2/ Sangerovo sekvenování genu *ATLI*: celkem u 111 *SPAST* negativních pacientů, počet objasněných: 2 pacienti.
- 3/ MLPA genu *SPAST* a *ATLI*: celkem u 146 pacientů, počet objasněných: 4 pacienti s velkou delecí genu *SPAST*.
- 4/ NGS sekvenování panelu genů: celkem u 96 *SPAST* negativních (Sanger i MLPA) pacientů, počet objasněných: 22 pacientů.
- 5/ WES: celkem u 4 pacientů, počet objasněných: 2 pacienti.

4.2. Celkový počet pacientů u jednotlivých typů HSP

Celkem byla dosud pomocí různých vyšetření mezi českými HSP pacienty nalezena kauzální varianta (a tedy potvrzen typ HSP) u celkem 84 pacientů, dohromady bylo v souboru nalezeno 11 typů HSP:

- SPG3 (gen *ATLI*): 2 pacienti. Oba objasnění pomocí Sanger sekvenování.
- SPG4 (gen *SPAST*): celkem 58 pacientů. Objasnění pomocí: 53 Sanger sekvenování, 4 MLPA, 1 NGS.
- SPG5 (gen *CYP7B1*): 1 pacient. Objasněn pomocí NGS.
- SPG6 (gen *NIPAI*): 1 pacient. Objasněn pomocí NGS.
- SPG7 (gen *SPG7*): 4 pacienti. Všichni objasnění pomocí NGS.
- SPG10 (gen *KIF5A*): 3 pacienti. Všichni objasnění pomocí NGS.
- SPG11 (gen *SPG11*): 5 pacientů. Pomocí NGS objasnění 4 pacienti, pomocí WES 1 pacient.

- SPG31 (gen *REEP1*): 7 pacientů. Pomocí NGS objasněno 6 pacientů, pomocí Sanger sekvenování 1 pacient.
- SPG35 (gen *FA2H*): 1 pacient. Objasněn pomocí NGS.
- SPG77 (gen *FARS2*): 1 pacient. Objasněn pomocí NGS.
- IAHSP (gen *ALS2*): 1 pacient. Objasněn pomocí WES.

4.3. Procentuální zastoupení jednotlivých typů HSP mezi objasněnými pacienty

Nejčastějším typem HSP je dle očekávání SPG4 (69 % mezi objasněnými), následován SPG31 (8,2 %). Dále se zhruba se stejnou frekvencí vyskytují SPG11 (5,9 %) a SPG7 (4,7 %), SPG11 mírně převažuje. Častěji se též vyskytla SPG10 (3,5 %). S nízkou frekvencí se vyskytuje SPG3 (2,4 %) a vzácně se vyskytují ostatní zachycené typy HSP: SPG5, SPG6, SPG35, SPG77 a IAHSP (1,2 %). (Tab.9)

Tab.9: Procentuální zastoupení jednotlivých typů HSP u českých pacientů
(řazeno dle frekvence)

Typ HSP	Gen	Počet pacientů	Procento z objasněných pacientů	Dědičnost	Počet familiárních	Počet sporadických
SPG4	<i>SPAST</i>	58	69 %	AD	43	5 *
SPG31	<i>REEP1</i>	7	8,3 %	AD	7	-
SPG11	<i>SPG11</i>	5	6,0 %	AR	1	4
SPG7	<i>SPG7</i>	4	4,8 %	AR	3	1
SPG10	<i>KIF5A</i>	3	3,6 %	AD	3	-
SPG3	<i>ATL1</i>	2	2,4 %	AD	1	1
SPG5	<i>CYP7B1</i>	1	1,2 %	AR	-	1
SPG6	<i>NIPAI</i>	1	1,2 %	AD	1	-
SPG35	<i>FA2H</i>	1	1,2 %	AR	-	1
SPG77	<i>FARS2</i>	1	1,2 %	AR	-	1
IAHSP	<i>ALS2</i>	1	1,2 %	AR	-	1
Celkem	11	84	100,1 %		59	15

* (zbylých 10 pacientů neznámý rodinný status)

4.3.1. Zastoupení jednotlivých typů HSP mezi objasněnými familiárními pacienty

Mezi diagnostikovanými 84 pacienty bylo celkem 60 familiárních případů. Největší procento tvoří pochopitelně pacienti s SPG4, kterých je mezi objasněnými nejvíc. Dále jsou to pacienti s typem SPG31, kde nebyl ani jeden pacient sporadický. Ve skupině autozomálně recesivně dědičné SPG7 jsou 3 familiární pacienti, ale ve všech případech jde o pacienty, kteří jsou zařazeni do skupiny familiárních, neboť mají postiženého sourozence. Stejně je tomu i u familiárního pacienta s SPG11. Ve skupině pacientů s dalšími autozomálně dominantně dědičnými typy SPG10 i u pacientky s SPG6 jsou všichni pacienti familiární.

4.3.2. Zastoupení jednotlivých typů HSP mezi objasněnými sporadickými pacienty

Mezi všemi objasněnými pacienty bylo 15 sporadických, většina v genech s autozomálně recesivní dědičností. Výjimkou je 5 pacientů s SPG4 s AD dědičností a jedna pacientka s SPG3 také s AD dědičností, kde ale vznikla kauzální varianta *de novo* u otce pacientky.

V. Diskuze

Bioinformatické zpracování

Pro bioinformatické zpracování sekvenačních raw dat z NGS panelu genů byly použity dva software NextGene (Softgenetics, US) a SureCall (Agilent Technologies, US). Software NextGene má pro variant calling s defaultním nastavením volnější kritéria, což vede k vyššímu počtu falešně pozitivních variant. Na druhou stranu je možné nastavit kritéria pro variant calling tak, aby zachytila variantu i ve velmi špatně pokrytých oblastech, což bylo výhodné u vzorků u nichž byla k přípravě DNA knihovny použita metoda HaloPlex Target Enrichment (Agilent Technologies, US). Sekvenační data DNA knihoven připravených touto metodou měla obecně daleko nižší pokrytí analyzovaných genomických oblastí a stalo se, že kvůli nízkému pokrytí nebyla zachycena kauzální varianta pomocí software SureCall.

Nezávislé hodnocení dvěma různými software se nám tak osvědčilo zejména u DNA knihoven připravených pomocí metody HaloPlex Target Enrichment. Raw data z DNA knihoven připravených později používanou metodou SureSelect Target Enrichment (Agilent Technologies, US) má daleko vyšší pokrytí a všechny kauzální varianty byly shodně zachyceny pomocí obou software (NextGene i SureCall).

Výběr genů

V první verzi panelu genů jsme vybrali pouze 28 genů, vybrány byly pouze geny popsané s čistě nekomplikovanou formou HSP. Do dalších dvou verzí panelu genů jsme pravidla pro výběr genů zmírnili ve smyslu, že byly zařazeny i geny u nichž byly popsány i komplikující znaky např. atrofie optiku, ataxie, změny kognitivních funkcí. Nikdy však nebyly zařazeny geny popsané s těžkým komplikovaným fenotypem ve smyslu mentální retardace, vrozené těžké poruchy intelektu a chování, fenotypy s epilepsií, vrozenou hluchotou apod.

Panely genů verze 2 a 3 byly rozšířeny o další geny. Byl zařazen např. gen *FA2H*, pomocí čehož byl objasněn jeden pacient s novou variantou v tomto genu. Podobně, kdyby byl gen *ALS2* zařazen již v první verzi panelu genů, byla by objasněna pacientka s dvěma heterozygotními variantami, která byla objasněna až pomocí WES. Další verze panelů genů byly také vždy optimalizovány o nově popsané geny, např. *FARS2* nebo o naše zkušenosti s nálezem kauzální varianty až pomocí WES v genu, který jsme v panelu neměli. Verze 3 byla rozšířena až na 43 genů, ale ve skupině pacientů vyšetřených touto verzí panelu genů byly nalezeny kauzální varianty jen v relativně běžných genech HSP typu SPG7, SPG31, SPG10.

Širší výběr genů tak procento objasněnosti pravděpodobně nezvýší. V případě, že vyšetření panelu genu neobjasní příčinu, je možné pacienty dál vyšetřit pomocí WES. Do panelu genů je optimální zařadit hlavní základní geny/typy HSP a v případně negativního výsledku pak pokračovat s WES. Z tohoto pohledu se tak optimálním jeví panel genů Verze 2. Matoucí může být i sám fenotyp pacientů, viz např. pacient s objasněnou SPG11 pomocí WES, který nebyl z důvodu komplikovaného fenotypu vyšetřen panelem genů, neboť nebyl předpokládán úspěch vyšetření.

Rozdělení fenotypu na komplikovaný a nekomplikovaný je samo o sobě mírně zavádějící. Většina nejčastějších typů HSP začíná jako nekomplikovaný fenotyp, ale s postupem nemoci se přidávají i různé komplikující klinické příznaky. Například u SPG11 se ve skutečnosti finálně rozvine komplikovaný fenotyp, SPG11 je vlastně nejčastěji se vyskytující komplikovaný typ HSP. I v našem souboru pacientů jsme pozorovali komplikující znaky krom SPG11 u SPG35 (změny v bílé hmotě, aj.), dysartrii u IAHSPP a SPG7, u jednoho pacienta s SPG10 (hraniční kognitivní funkce, aj.). Procento komplikovaných HSP je tak pravděpodobně vyšší než u uváděných 10 % HSP pacientů.

Kauzalita nalezených variant

K uznání kauzality nalezených variant bylo přistupováno velice obezřetně. I v případě, že již byla varianta popsána jako patogenní, byl porovnán popsáný fenotyp s fenotypem našeho konkrétního pacienta. Ve dvou případech jsme našli variantu, kdy ve stejném nukleotidu již byla popsána jiná patogenní varianta (c.1321+2T>G v *SPAST* a c.838C>G v *KIF5A*). To podporuje kauzalitu nalezené varianty, i fenotyp pacientů odpovídá a je vysvětlitelný nalezenými variantami, nicméně je třeba i tak velké opatrnosti a obezřetnosti při interpretaci, ne vždy je možná jistota. V každém případě je ideální provést segregáční analýzu v rodině, zda varianta se v rodině dědí s onemocněním. U všech složených heterozygotů s recesívními variantami platí, že nalezené varianty musí být v pozici *trans*, tedy na různých alelách (od každého z rodičů jedna varianta). Kauzalitu také dál podporuje to, že jinak vzácná varianta byla nalezena v našem souboru u více pacientů s fenotypem HSP (u SPG7, SPG11 a SPG31).

Spektrum genetických typů HSP u českých pacientů

Pomocí metod NGS (sekvenování panelu genů a WES) bylo u českých pacientů nalezeno celkem 10 typů HSP (SPG4, SPG5, SPG6, SPG7, SPG10, SPG11, SPG31, SPG35, SPG77 a IAHSPP). Nebyl nalezen žádný pacient s SPG3.

Spolu s dříve objasněnými pacienty s SPG4 a SPG3 se tedy v české populaci pacientů se suspektní HSP vyskytuje 11 genetických typů HSP (11. typ je SPG3). Nejčastější typ je SPG4 u 69 % ze všech objasněných pacientů.

Mezi non-SPG4 pacienty byl nejčastěji zachycen typ SPG31 (varianty v genu *REEP1*), celkově i mezi typy s AD dědičností. Výskyt SPG31 je tedy oproti jiným populacím mezi českými HSP pacienty poměrně dost vysoký, jako druhý nejčastější typ se vyskytuje u 8,2 % objasněných. SPG31 je sice popisována jako jeden z nejčastějších typů nemoci (McCorquodale et al., 2011, Beetz et al., 2008, Zuchner et al., 2006). Při pohledu na konkrétní počty pacientů z novějších studií, jsou ale čísla nižší: 2 ze 47, tzn. 4,2 % (Iqbal et al., 2017), dokonce jen 2 z 216, tzn. 0,9 % (Elert-Dobkowska et al., 2015) v polské populaci, nízký výskyt SPG31 byl popsán i v japonské populaci (Ishiura et al., 2014).

Není bohužel mnoho článků, které by popisovaly spektra HSP v jednotlivých populacích. Pokud ale přesto porovnáme s několika publikovanými údaji, v různých populacích se data shodují, že se mezi HSP s AD dědičností (krom SPG4, což je všude zdaleka nejčastější typ) s vyšší frekvencí vyskytuje SPG10 s variantami v *KIF5A* genu (Goizet et al., 2009b, Lynch et al., 2016), což bylo pozorováno i u českých pacientů.

Mezi typy HSP s AR dědičností byly u českých pacientů nejčastější SPG11 s mírnou převahou nad SPG7. Tyto dva typy jsou popisovány i v literatuře jako nejčastější mezi HSP typy s AR dědičností. V některých populacích převažuje SPG11 (Ishiura et al., 2014, Burguez et al., 2017), v jiných SPG7 (Sanchez-Ferrero et al., 2013, Chrestian et al., 2017, Yoon et al., 2013, Kumar et al., 2013). Patogenní varianty v genu SPG7 se však také mohou maskovat za fenotyp ataxie (Hadjivassiliou et al., 2017).

Relativně častěji jsou v některých populacích popsány SPG5 (*CYP7B1* gen) (Burguez et al., 2017, Iqbal et al., 2017, Kumar et al., 2013, Ishiura et al., 2014), v našem souboru jsme našli jednoho pacienta s SPG5. Ostatní typy HSP jsou poměrně vzácné a není typ, který by byl častější. V různých populacích se vyskytují jen u jednotlivých pacientů/rodin, jejich výskyt je všeobecně nízký a lze ho proto těžko procentuálně vyčíslit. I mezi českými pacienty jsme našli málo časté typy HSP.

Nalezené spektrum genetických typů HSP u českých HSP pacientů s převahou SPG4 a častým výskytem SPG31, SPG11 a SPG7 se dalo očekávat a je ve shodě s publikovanými údaji.

S překvapivě nízkou frekvencí se však mezi českými pacienty vyskytuje SPG3, i když nízký výskyt již byl také popsán, nejbliž například i mezi polskými HSP pacienty (Elert-Dobkowska et al., 2015).

SPG77 u českého pacienta

SPG77 je velice vzácný typ HSP, bylo zatím popsáno jen několika jedinců celosvětově s tímto fenotypem. Varianty v genu *FARS2* jsou popisovány převážně s epilepsiemi se závažnou prognózou. Fenotyp SPG77 byl popsán pouze 2x, jednou jako závažný, s nástupem v dětství, opožděním vývoje, dysartrií, závažnou poruchou chůze (Vantroys et al., 2017). V druhé publikaci však byly popsáni tři jedinci s nekomplikovanou formou SPG77, s nástupem v dětství, bez záchvatů a s normálním MRI mozku (Yang et al., 2016).

U našeho pacienta byla nalezena kombinace missense varianty c.1082C>T (p.Pro361Leu) v exonu 6, která byla nedávno popsána jako patogenní, ale se závažným komplikovaným HSP fenotypem (Vantroys et al., 2017) a delece prvních dvou exonů genu *FARS2*, první exon je nekódující. Tato delece byla také již popsána, ale s fenotypem závažné encefalopatie s časným nástupem s epilepsií (Raviglione et al., 2016). Zajímavé je, že varianta c.1082C>T má poměrně vysokou frekvenci v populačních databázích (ExAC 0,013 %) s ohledem na fakt, že je SPG77 velmi vzácný typ HSP. V genu *FARS2* bylo dosud popsáno 15 patogenních variant, ale kromě tří všechny s fenotypem epileptické encefalopatie, zbylé tři s fenotypem HSP.

Frekvence kauzálních patogenních variant

Většina nalezených variant byla nalezena v heterozygotním stavu a to i v genech s autozomálně recesivní dědičností. Z 11 pacientů s kauzálními variantami v genech s AR dědičností byli jen u 4 pacientů v homozygotním stavu. Vzhledem k tomu, že recesivní patogenní varianty mají obvykle určitou, velmi nízkou frekvenci v populaci, je pravděpodobnější, že se potkají dva nosiči různých variant, byť ve stejném genu. To, že se v souboru objasněných pacientů vyskytují homozygoti pro vzácné varianty spíše svědčí o tom, že varianta má v oblasti vyšší frekvenci, než je udávána v populačních databázích, nebo že jde o endogamii rodičů.

Tak například předpokládáme, že varianta c.130C>T má vyšší frekvenci v české menšině v Rumunsku, odkud pochází náš pacient s diagnostikovanou SPG35. Podobně lze předpokládat, že rodiče pacientky s homozygotní variantou c.3075dup v genu *SPG11* (u obou potvrzena varianta v heterozygotním stavu) mají společného předka, i třeba před několika generacemi, aniž o tom sami vědí. Pacientka pochází z Pelhřimovska z Vysočiny, frekvence varianty může být i vyšší v této oblasti. U dalších dvou pacientů s homozygotní variantou nebyla provedena segreganční analýza, fakt, že jsou/byli oba rodiče heterozygoti lze tak jen předpokládat. Pacient s variantou v genu *CYP7B1* (ročník 1980) žije v Praze, nemáme

informace, zda třeba nepochází z jiného kraje a mohlo by pro něho platit totéž co bylo popsáno u předchozí pacientky. Nalezená varianta c.899A>G má frekvenci v ExAc pro non-finskou evropskou populaci (NFE) 0,0061 %, to znamená cca 6 heterozygotů na 100 tisíc lidí. Pravděpodobnost, že se setkají dva heterozygoti je velmi nízká, nicméně existuje. S velmi nízkou pravděpodobností by mohla u pacienta varianta na druhé alele vzniknout také *de novo*. Homozygotita pro variantu může vzácně vzniknout i v důsledku isodisomie oblasti, kde varianta leží, třeba jen parciální části chromozomu obsahující gen s kauzální variantou. S takovou vzácnou možností jsme se ale již opakovaně setkali, viz (Safka Brozkova et al., 2016, Borgulova et al., 2018). U pacientky s homozygotní variantou p.Leu78* v genu *SPG7* platí totéž, pacientka (ročník 1946) žije v oblasti Broumova, podobné postižení je popisované i u její sestry. Varianta má v non-finské evropské populaci (NFE) frekvenci o něco vyšší: 0,012 %.

Tato varianta v genu *SPG7* p.Leu78* je však dokonce variantou, kterou jsme v našem souboru pacientů zachytili nejvícekrát – ve třech alelách. (Ve třech alelách byla ještě zachycena varianta c.318_321del v genu *REEPI* – bude diskutováno dále.) Varianta p.Leu78* v genu *SPG7* by tedy teoreticky mohla mít vyšší frekvenci v naší populaci nebo třeba i v širším evropském regionu. K tomuto předpokladu nás vede i publikace týkající se maďarského souboru pacientů s HSP, kde byla stejná varianta p.Leu78* v genu *SPG7* nejčastěji se opakující variantou mezi objasněnými HSP pacienty (20 objasněných HSP pacientů z 58, varianta u 4 jedinců) (Balicza et al., 2016).

Třikrát (u třech pacientů) byla ještě zachycena nová, dosud nepopsaná varianta c.318_321del v genu *REEPI* s AD dědičností vždy v heterozygotním stavu. Varianta byla interpretována jako kauzální. Předpokládáme, že všechny tři rodiny jsou příbuzné, měli společného předka. Všechny tři rodiny totiž pocházejí z Plzeňska, dvě rodiny mají dokonce stejné příjmení, zatím se bohužel nepodařilo dopátrat konkrétní příbuzenské vztahy rodin.

Nejvyšší frekvence ze všech nalezených patogenních variant je uvedena u varianty c.1529C>T v genu *SPG7* (s AR dědičností) s frekvencí 0,29 % v ExAC_All. Tato varianta je uváděna jako nejčastější mezi *SPG7* pacienty ve více populacích (Rydning et al., 2016, Sanchez-Ferrero et al., 2013). Obecně je frekvence u nalezených variant v *SPG7* genu poměrně vysoká, což je u *SPG7* genu možné vzhledem k faktu, že *SPG7* je uváděn jako jeden ze dvou nejčastějších typů HSP s AR dědičností (Yoon et al., 2013, Kumar et al., 2013, Orsucci et al., 2014, Chrestian et al., 2017). I v souboru českých pacientů je *SPG7* čtvrtý nejčastější typ a mezi recesivními typy je na druhém místě.

Všechny nalezené kauzální varianty v genech s AD dědičností nemají žádnou uvedenou frekvenci v populačních databázích. Obecně se udává prevalence HSP v průměru 5 : 100 000. To znamená, že maximální frekvence varianty v genu s AD dědičností by mohla být 0,005 %. To by ale platilo, jen pokud by byla nemoc způsobena pouze jednou variantou v jednom genu. Vzhledem k faktu, že více než polovina HSP pacientů má kauzální variantu v genu *SPAST*, varianty v ostatních genech jsou příčinou onemocnění u jednotek procent pacientů a také až dvě třetiny všech HSP genů mají AR dědičnost, frekvence patogenních variant v HSP genech krom s AD dědičností kromě genu *SPAST* by měla být prakticky nulová.

Velké delece jako příčina HSP

V některých HSP genech jsou popsány velké delece jako příčina HSP. Heterozygotní velké delece v genu *SPAST* byly opakovaně uvedeny jako příčina HSP, dokonce až u 21 % mezi SPG4 pacienty (Schule et al., 2016), stejně i v genu *SPG11* jsou popisovány delece s vysokou frekvencí, je udáváno, že až 19 % všech patogenních variant v SPG11 mohou být CNV (copy number variants) (Gunther et al., 2016). V obou genech se vyskytuje vysoké procentu *Alu* repetice, které vedou k nestabilitě a ke vzniku velkého počtu přestaveb a tedy CNV (Conceicao Pereira et al., 2012, Depienne et al., 2007).

Mezi objasněnými SPG4 pacienty v našem souboru jsou velké delece jako příčina HSP jen u 4 pacientů ze všech 58 diagnostikovaných s SPG4, což představuje 7 %. Naproti tomu velká delece v genu *SPG11* byla nalezena u dvou pacientů z pěti diagnostikovaných s *SPG11*.

Byla nalezena i heterozygotní delece v genu *FARS2*, která je v kombinaci s missense variantou ve stejném genu příčinou HSP u pacienta.

Varianta c.953T>C (p.Leu318*) v genu KLC3

U pacienta vyšetřeného pomocí WES byla nalezena *de novo* vzniklá heterozygotní nonsense varianta c.953T>C (p.Leu318*) v genu *KLC3*, který nebyl dosud popsán s žádným fenotypem.

Protein kódovaný genem *KLC3* hraje dle databází UniProt (www.uniprot.org/) a GeneCards (<https://www.genecards.org/>) roli v axonálním transportu, v motorické aktivitě mikrotubulů a také ve vazbě kinezinových řetězců. Měl by také interagovat s proteinem kódovaným genem *KIF5A*, varianty v němž jsou příčinou SPG10. Kinesin je protein nezbytný pro transport molekul v buňkách, pro posun transportovaných molekul podél mikrotubulů. Skládá se ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců.

Nalezená varianta v genu *KLC3* je právě ve funkční doméně lehkého řetězce. Toto vše by poměrně slibně podporovalo kauzalitu spolu s de novo původem. Geny *KLC2* a *KLC4* kódující také řetězce kinezinu jsou zařazeny jako HSP geny, ale oba s autozomálně recesivní dědičností. Gen *KLC2* však se závažným komplikovaným typem HSP. V rodině jsou udávány neurologické obtíže/suspektní HSP u babičky a jejích sester, ale dle zprávy se pravděpodobně jedná o jinou etiologii a jiné klinické příznaky.

Nalezenou variantu v genu *KLC3* nakonec uzavíráme jako nekauzální ze dvou důvodů:
1/ Geny *KLC2* i *KLC4* jsou popisovány jako geny s AR dědičností, vzhledem k tomu, že kódují protein podobné funkce, předpokládáme spíš také AR typ dědičnosti v genu *KLC3*.
2/ V genu *KLC3* je popsáno 8 jiných nonsense variant, které jsou nepatogenní. Jen o 8 nukleotidů dál je popsána jiná nonsense varianta c.961C>T (p.Arg321*) ve stejné proteinové doméně, tzn. se stejným potenciálním funkčním vlivem. Tato varianta má navíc frekvenci 0,0016 % v ExAC_All. Pokud by tato varianta byla patogenní, určitě by vzhledem k frekvenci musela být s AR dědičností. V tom případě chybí u pacienta druhá kauzální varianta v tomto genu.

Věk objasněných pacientů a věk nástupu onemocnění

Stran průměrného věku pacientů se nelze sumárně vyjádřit vzhledem k různorodosti SPG typů a malému počtu pacientů, a to ani ve skupinách typů SPG, které se opakují. Mezi pěti pacienty s SPG11 je velmi rozdílný věk nástupu: 3x ve věku do 18 let, 2x v pozdních dekádách. Podobně i u pacientů s SPG10 (*KIF5A* gen) jsou dva pacienti s nástupem v dospělosti ve 4. dekádě, ale jeden pacient s nástupem v dětství, stejně časný nástup je popisován i u jeho otce, který ale nebyl geneticky vyšetřen. I např. u SPG4 je popisován typicky věk nástupu v dospělosti viz např. (McDermott et al., 2006, Fink, 2013, Lo Giudice et al., 2014), ale v našem souboru SPG4 pacientů je u některých variant nástup již v dětství, viz (Meszarosova et al., 2016). Navíc jsou u některých variant pozorovány interfamiliární a dokonce intrafamiliární rozdíly, například u dvou bratrů s variantami c.233T>A (p.Leu78*) a c.1553-2_1553-1del v genu *SPG7* nebo u varianty c.33-2A>G v genu *REEP1*.

Existuje i možnost neúplné penetrance, ač je problematické ji spolehlivě dokázat. Byla již popsána například v genu *ATL1* (Durr et al., 2004, D'Amico et al., 2004), v tomto genu byla popsána dokonce i rozdíly ve věku nástupu onemocnění a penetrance u mužů a žen (Varga et al., 2013). Ve všech genech vyšetřovaných v rámci tohoto projektu je však popisována klasická mendelovská dědičnost, neúplnou penetranci nepředpokládáme, nepochybně však

existuje rozdílná penetrance vzhledem k věku. Nicméně rozdíly v nástupu onemocnění v závislosti na pohlaví jedinců by se mohl týkat variant v genu *REEPI*.

Fenotypy u častěji se vyskytujících typů HSP

U jednotlivých typů HSP, kde jsme v souboru našli více pacientů byly na základě dostupných informací v rámci možností popsány společné klinické znaky pacientů s jedním typem HSP. Typický fenotyp je však těžké popsat jednak protože počet pacientů je malý, a také vycházíme pouze z indikací a neurologických zpráv zaslaných různými neurology a genetiky. Objem informací o konkrétních pacientech tak není jednotný, někde jsou informace velice kusé. Přesto lze konstatovat, že v hlavních rysech fenotyp našich pacientů odpovídá fenotypům jednotlivých typů HSP tak, jak jsou popsány v literatuře.

SPG31

Fenotyp SPG31 je popisován s klasickými příznaky nekomplikované HSP, u některých pacientů jsou popisovány poruchy vibračního cití, urgentní mikce, postižení horních končetin mírné. Věk nástupu je v publikaci (Beetz et al., 2008) bimodální buď v první nebo druhé dekádě anebo potom po 30 roku věku, (Zuchner et al., 2006) uvádí u jedné rodiny průměrný věk nástupu 27 let, u druhé 11 let s tím, že někteří členové mají nástup až v pozdních dekádách.

(Hewamadduma et al., 2009) popisuje i poměrně závažný fenotyp s rychlou progresí, většinou postižení i horních končetin, poruchy cití, závažné postižení chůze a nutnost používání invalidního vozíku už cca po 30. roce věku, u jedné pacientky dokonce po 18 letech trvání nemoci závažnou tetraparézu, dysartrii a dysfágií.

V našem souboru pacientů s pravděpodobně kauzálními variantami v genu *REEPI*, a tedy s SPG31, je u všech pacientů, kde máme dostatek informací, popisován nástup v dětství s celkem pomalou progresí, nejsou popsány významné přidružené příznaky krom mírných poruch cití po delší době trvání nemoci. Fenotyp našich pacientů s SPG31 tak převážně odpovídá nekomplikovanému fenotypu tak, jak je popisován v literatuře.

SPG7

Společným znakem u všech pacientů s SPG7 v našem souboru je nástup v dospělosti a také je u všech popisována dysatrie. U dvou pacientů též urgentní mikce. To odpovídá fenotypu SPG7 jak je popisován v literatuře. Ve dvou rodinách také pozorujeme intrafamiliární rozdíl ve věku nástupu obtíží charakteru HSP.

Typicky je SPG7 popisována s nástupem v dospělosti a velmi často s komplikujícími znaky, nejčastěji dysartrií, ataxií, atrofií mozečku a atrofií optiku. Mohou být poruchy čítí a urgentní mikce (Elleuch 2006, Warnecke 2007, Sanchez Ferrero 2013).

SPG11

Typický fenotyp SPG11 je popisován krom klasických příznaků HSP zejména s tenkým corpus callosum na MRI (tzv. TCC-HSP). NA MRI může být dále kortikální atrofie. U pacientů se postupně objevuje mentální deteriorace, dysartrie, často se objevuje periferní neuropatie. Popisován je nástup spíš v dětství s poměrně rychlou progresí a upoutáním na vozík. (Stevanin et al., 2007, Hehr et al., 2007, Denora et al., 2009).

U většiny z pěti diagnostikovaných pacientů s SPG11 není dostatek informací a jejich fenotyp tak nelze blíže zobecnit a porovnat s údaji z literatury. U jednoho je pacienta je popisována lehká mentální retardace již od narození a celkově komplikovanější fenotyp.

Zajímavý je u dvou pacientů s SPG11 nástup až v pozdní dospělosti. Oba tito pacienti mají jednu stejnou variantu c.5381T>C v kombinaci s nonsense variantou. Varianta c.5381T>C již byla popsána v literatuře (Lynch et al., 2016) mezi řeckými pacienty s HPS u třech pacientů. Vždy v kombinaci s jinou variantou v genu *SPG11*, dvakrát s nonsense variantou - tedy jako u našich pacientů, potřetí s frame shift variantou, která vede ale také ke vzniku stop kodonu a předčasnému ukončení syntézy proteinu. Nástup onemocnění u těchto tří řeckých pacientů vždy v dospělosti: 60 let, komplikovaný fenotyp; 39 let, komplikovaný fenotyp; 41 let, nekomplikovaný fenotyp, ale se změnami v bílé hmotě.

SPG10

Pacienti s kauzální variantou v genu *KIF5A* a tedy diagnostikovanou SPG10 mají rozdílný nástup onemocnění od dětství do dospělosti. Kvůli nedostatku bližších informací nelze fenotyp zobecnit, nicméně u všech je popisována porucha čítí na DK.

SPG10 je i v literatuře popisován s variabilním fenotypem, jak s nekomplikovaným, tak komplikovaným. Nejčastěji je popisováno právě snížení čítí na dolních končetinách a dále periferní neuropatie s atrofií svalstva připomínající onemocnění CMT. Jako komplikující klinický znak je popisován kognitivní deficit. Věk nástupu je velmi různorodý od dětství po dospělost. (Goizet 2009, Crimella 2012, Blair 2006, Carosi 2015)

Záchytnost DNA diagnostických metod u HSP

Klasické sekvenování genu SPAST a ATLI

Mezi českými pacienty bylo již dříve pomocí Sangerova sekvenování potvrzen typ SPG4 u 53 nepříbuzných pacientů. Pouze pět SPG4 pacientů je sporadických, což představuje 9 % ze všech SPG4 a jen 3,1 % mezi sporadickými pacienty vyšetřeny klasickým sekvenováním genu *SPAST*. U těchto pěti pacientů však jen u dvou byl potvrzen de novo výskyt varianty v genu *SPAST* (varianta nenalezena ani u jednoho z rodičů). Ostatní tři byli sice na základě dodaných informací zařazeni mezi sporadické, ale vzhledem k nedostatečným a neúplným informacím není sporadický výskyt jistý.

U familiárních pacientů je daleko větší šance, že bude typ nemoci diagnostikován na základě Sangerova sekvenování genu *SPAST*. V souboru českých pacientů byla záchytnost SPG4 u familiárních pacientů necelých 25 %. Ze všech objasněných SPG4 pacientů tvoří familiární pacienti dokonce 72 %. Podobně vysoký záchyt familiárních pacientů byl popsán v Evropě například i mezi dánskými a rumunskými SPG4 pacienty (de Bot et al., 2010, Orlacchio et al., 2008a), v Asii mezi korejskými a japonskými SPG4 pacienty (Kim et al., 2014, Ishiura et al., 2014). Sangerovo sekvenování kódujících oblastí genu *SPAST* má proto stále smysl, zejména u familiárních pacientů.

Pomocí MLPA genu *SPAST* byly zachyceny 4 velké delece, záchytnost vyšetření, resp. objasnitelnost je tedy pouze 3 %. Vyšetření má smysl spíše jen u pacientů s vysoce suspektní HSP, kteří jsou dále indikováni pro sekvenování panelu genů.

Oproti vysoké záchytnosti SPG4 zejména u familiárních pacientů je záchytnost variant v genu *ATLI* u českých pacientů obecně výrazně nízká, pouhé 1 % u všech vyšetřených. SPG3 je popisována s nástupem onemocnění v dětství, což platí u obou českých SPG3 diagnostikovaných pacientů, ale i tak je záchytnost mezi pacienty mladšími 18 let jen 4 %. Podobně nízký výskyt byl již popsán v Evropě i v Asii (Kim et al., 2014, Lu et al., 2014, Elert-Dobkowska et al., 2015, Park et al., 2015).

V souboru českých pacientů byly dále nalezeny ještě čtyři další potenciálně kauzální varianty v genu *ATLI* (3x Sangerovým sekvenováním, 1x pomocí NGS), ale ani jedna z nich nebyla nakonec interpretována jako kauzální. V jednom případě šlo o vzácný, ale benigní polymorfismus. V ostatních třech případech byla vždy varianta nalezena u zdravého rodiče, což kauzalitu de facto vylučuje. V genu *ATLI* byla nicméně popsána neúplná penetrance (D'Amico et al., 2004, Varga et al., 2013), což je třeba vzít v potaz. I tak by ale byla záchytnost vyšetření velice nízká, jen 2,5 %. Varianty ale nemají ani příliš přesvědčivě závažnou *in silico* predikci, s největší pravděpodobností opravdu nejsou kauzální.

V genu *ATL1* nebyla nalezena ani jedna velká delece, což odpovídá literatuře, dosud byla popsána pouze jedna velká delece celosvětově jako příčina SPG3 (Sulek et al., 2013). Gen *ATL1* proto nemá smysl vyšetřovat samostatně ani u dětských pacientů pomocí Sangerova sekvenování a je vhodné ho zařadit rovnou do vyšetření pomocí NGS panelu HSP genů.

Sekvenování panelu genů a WES

V rámci dizertační práce bylo během čtyř let vyšetřeno 96 českých non-SPG4 pacientů s klinickým podezřením na HSP pomocí NGS sekvenování panelu genů spojených s nekomplikovanou HSP. U čtyř pacientů bylo provedeno WES, tři z nich byli předem vyšetřeni sekvenováním panelu genů s negativním výsledkem.

Pomocí těchto dvou NGS metod byla příčina HSP objasněna u 24 pacientů. Což představuje 24,7 % (24 z 97) vybraných non-SPG4 pacientů, samostatně pomocí sekvenování panelu genů je to 22,9 % (22 z 96). Je možné, že kdyby bylo WES provedeno u všech panel-negativních pacientů, procento objasněných pomocí obou NGS metod by se mohlo zvýšit. Limitem jsou však celkové náklady a také obvykle potřeba segreganční analýzy nalezených variant v rodině, kdy zdaleka ne u všech pacientů jsou k dispozici vzorky DNA od příbuzných a výsledky jejich neurologických vyšetření.

K podobným číslům jako my došli například (Iqbal et al., 2017), kteří pomocí vybraného panelu genů objasnili 19 % pacientů, u nichž předem vyloučili kauzální variantu pro SPG4 a u většiny i SPG3 a SPG31. Podobně (Kumar et al., 2013) objasnili rovněž 25 % non-SPG4 pacientů pomocí vyšetření panelu genů. Různé výzkumné skupiny však používají různé přístupy, některé zahrnují všechny pacienty včetně těžkých komplikovaných fenotypů, většina dnes již opouští předchozí Sanger sekvenování genu *SPAST* samostatně a gen *SPAST* zahrnují rovnou do panelu genů, získaná procenta tak nejsou mezi jednotlivými studii úplně srovnatelná viz (Burguez et al., 2017, Balicza et al., 2016).

Ze všech vyšetřených pacientů pomocí NGS panelu genů bylo větší procento objasněných mezi pacienty s vícečetným výskytem HSP v rodině, tedy mezi familiárními případy: celkem 15 z 51, což je 29,4 %, zatímco u sporadických jich bylo jen 7 z 45, což je 15,5 %.

V takto malých číslech nelze udělat přesnější závěry, nicméně je zřejmé, že procento objasněných bude vždy mezi familiárními případy vyšší. Může to souviset primárně už s přesnější klinickou diagnostikou, kdy familiární výskyt svědčí pro genetické onemocnění,

jakým HSP je, a také je možné klinické srovnání u více postižených členů rodiny pro přesnější diagnostiku. Podobně tomu může být i u dětských pacientů, kde familiární výskyt spíše svědčí pro HSP. V našem souboru byli z 22 pacientů mladších 18 let objasněni dva, oba familiární. Ostatní pacienti mladší 18 let byli sporadičtí, ani jeden nebyl objasněn.

Ve skupině objasněných familiárních pacientů pomocí NGS byla většina s autozomálně dominantním typem HSP (11 pacientů) a 4 pacienti s autozomálně recesivními typy SPG7 (3x) a SPG11 (1x). Všichni tito familiární autozomálně recesivní (AR) pacienti měli stejně postižené sourozence, v generaci rodičů ani dříve se postižení nevyskytlo, což odpovídá AR typu dědičnosti. Všichni sporadičtí objasnění pacienti měli kauzální varianty v genech s AR dědičností.

Je ale rozdíl v pojmenování familiární ve smyslu AD familiární pacient a AR familiární pacient. AD familiární pacient znamená pacient s postižením v několika generacích v rodině a u takového lze očekávat kauzální variantu v AD genu. AR familiární pacient je s postiženými sourozenci (různého pohlaví) a zdravými rodiči. Pro přesnější rozlišení a zejména pak pro větší skupiny pacientů je možná vhodnější a názornější používat rozdělení rodinného statusu pacientů na tři skupiny tak, jak ho používá Schule et al (Schule et al., 2016): dominantní, recesivní a simplex (tedy sporadičtí).

NGS sekvenování panelu genů se za určitých okolností ukázalo být dokonce citlivějším než Sangerovo sekvenování. Pomocí NGS byla zachycena varianta v genu *SPAST* předtím nedetekovaná kvůli přítomnosti vzácného nepopsaného polymorfismu pod PCR primerem a allele drop-outu v PCR amplifikaci. Proto je dobré zařadit gen *SPAST* znovu do panelu genů pro NGS, i když už byl předtím vyšetřen. Polymorfismy v místě PCR primerů (a i např. MLPA sond) jsou známým úskalím těchto metod.

Stran efektivity WES se nelze vyjádřit, za prvé bylo provedeno u velmi malého počtu pacientů, za druhé oba objasnění pacienti by byli bývali objasněni už pomocí sekvenování panelu HSP genů. V jednom případě jsme z důvodu komplikovaného fenotypu nepředpokládali kauzální varianty v genu *SPG11*, který je vždy zařazen do panelu genů. V druhém případě zase nebyl gen *ALS2* zařazen v první verzi vyšetřovaných genů. Pro tento panel byla zvolena příliš přísná pravidla pro zařazení genů do panelu a ukázalo se, že to není optimální.

Spojením výsledků NGS sekvenování u 96 pacientů (resp. 97 i s WES) a předchozích výsledků DNA diagnostiky SPG4 a SPG3 bylo vyhodnoceno, že z celkového počtu 396 nepříbuzných českých pacientů se suspektní HSP byla nalezena kauzální varianta (a tedy potvrzen typ HSP) u 84 pacientů, což představuje 21 %. Ze všech 84 objasněných nepříbuzných pacientů bylo 60 popsanych jako familiární a jen 15 jako sporadický případ. Nelze však přesně vyčíslit, jaké je celkové procento objasnitelnosti u familiárních a sporadických pacientů, protože jednotlivé skupiny pacientů vyšetřovaných různými metodami jsou nestejně a překrývající se a u řady pacientů nebyly k dispozici všechny potřebné údaje.

Kritéria pro zařazení pacientů na vyšetření byla rozdílná: gen *SPAST* byl vyšetřován v rámci DNA diagnostiky z indikace různých lékařů, genetiků a neurologů a to u všech zaslaných pacientů, resp. vzorků, ale u některých pacientů může být diagnóza nejasná a nemusí se ve skutečnosti ani jednat o HSP pacienta – to potom snižuje procento objasnitelnosti. Pro NGS panelu genů byli pacienti vybíráni podle určitých kritérií, a to již zkušeným týmem, přednostně byli zařazováni familiární pacienti a pak vysoce suspektní pacienti, což zvyšuje procento objasnitelnosti a objasněnost mezi familiárními pacienty. K celoexomovému vyšetření zas byli vybráni jen vysoce suspektní pacienti, ve většině případů již s provedeným vyšetřením pomocí NGS panelu genů.

Algoritmus vyšetření pacientů se suspektní HSP

Vzhledem k výše popsaným faktům se jako optimální jeví následující postup vyšetření u pacientů se suspektní HSP.

1/ Pomocí Sangerova sekvenování vyšetřit všech 17 kódujících oblastí genu *SPAST*, zejména u pacientů s familiárním výskytem HSP. U pacientů, kde klasické sekvenování *SPAST* genu neobjasní příčinu HSP, může být následně indikováno vyšetření NGS panelu genů, ale před ním provést MLPA vyšetření pro vyloučení velkých delecí ve *SPAST*.

2/ NGS panelu HSP genů. V případě negativního výsledku zvážit možnost WES.

3/ WES a s odstupem času hodnotit znovu WES data proti tzv. OMIM genům.

4/ WGS (whole genome sequencing).

Takový algoritmus vyšetření v zásadě logicky vychází z geneticky heterogenního charakteru nemoci a procentuálního zastoupení jednotlivých genetických typů nemoci. Při použití popsaného algoritmu vyšetření pacientů se suspektní HSP lze u klasického sekvenování genu *SPAST* očekávat záchytnost 25 % u familiárních pacientů, ale u sporadických velice nízkou. Familiární pacienti tvoří 72 % všech diagnostikovaných s SPG4.

Místo klasického sekvenování genu *ATL1* by mohlo u indikovaných případů být efektivnější klasické sekvenování genu *REEPI*, který má jen 6 exonů.

U NGS sekvenování panelu genů u non-SPG4 pacientů bude pak záchytnost opět vyšší u familiárních pacientů, cca 29 %, u sporadických pacientů lze očekávat objasněnost 15 %.

NGS sekvenování panelu genů vs. WES

Teoreticky by bylo možné pacienty již po negativním výsledku Sangerova sekvenování genu *SPAST* rovnou vyšetřit pomocí WES. Vyšetření NGS panelu genů je však za prvé o cca 50 % levnější ale hlavně z hlediska pokrytí cílových oblastí je řádově vyšší a tím výrazně spolehlivější a srovnatelné s klasickým sekvenováním. WES (konkrétně námi použitým kit SureSelect All Exon Kit, Agilent Technologies) slibuje pokrytí alespoň 10x u 97,5 % cílových oblastí a více než 20x u 94,4 % cílových oblastí (<https://www.agilent.com/en/promotions/sureselect-human-all-exon-v7>). Kit pokrývá oblast 35,7 Mb, to znamená, že méně než 10x bude pokryto 2,5 %, což je 892,5 kb. Oblast zahrnutá pro sekvenování panelu genů je např. u verze 2 dohromady 427 kb, oblast pokrytá méně než 10x pomocí WES je v podstatě dvakrát větší. To znamená, že WES sebou nese riziko mnohem více hůře nebo nedostatečně pokrytých oblastí v genech, které nás zajímají. WES je dobrá volba u vysoce suspektních pacientů, u kterých se pomocí vyšetření sekvenování panelu genů nepodařilo odhalit příčinu nemoci.

Získaná a popsána data jsou prozatím první data o genetickém pozadí českých HSP pacientů. Centrum lékařské genetiky a fetální medicíny GENNET a DNA laboratoř kliniky dětské neurologie, 2.LF UK a FN Motol jsou jediné pracoviště v ČR, kam jsou pacienti se suspektní HSP zasíláni a kde jsou dále vyšetřováni na úrovni DNA diagnostiky. Data získaná v této dizertační práci a informace o nalezeném spektru a procentuálním zastoupení jednotlivých typů HSP v české populaci jsou unikátní a přispívají do molekulárně epidemiologických dat o nemoci v evropském ale i celosvětovém měřítku.

VI. Závěr

Pomocí NGS/MPS sekvenování panelu genů spojených s nekomplikovanou hereditární spastickou paraparézou (HSP) bylo vyšetřeno 96 českých pacientů s klinickým podezřením na nekomplikovanou HSP, u kterých byla předem vyloučena patogenní varianta v genu *SPAST* jako příčina nemoci. Dále bylo u 4 pacientů provedeno celoxomové sekvenování (WES) ke zjištění příčiny onemocnění. Celkem bylo pomocí těchto dvou metod objasněno 24 pacientů, stanovena jejich diagnóza a upřesněn typ nemoci vč. typu dědičnosti u sporadických případů. Celkem bylo mezi vyšetřenými non-SPG4 pacienty nalezeno 10 typů HSP. Spojením dat získaných pomocí těchto dvou metod NGS a dat z již dříve provedeného Sangerova sekvenování genu *SPAST* a částečně i *ATL1* u souboru pacientů bylo možno vytvořit dosud jedinečný přehled o spektru typů HSP a genetických příčinách u českých pacientů. Jde o prozatím první data tohoto typu týkající se onemocnění HSP v ČR, která jsou u nás publikována. Data přispívají do celoevropských a potažmo i celosvětových geneticko-epidemiologických dat týkajících se onemocnění HSP. Podobná data jsou velmi přínosná, publikací popisujících procentuální zastoupení typů HSP v jednotlivých populacích není dosud mnoho. Až s rozvojem metod NGS, tedy během posledních pár let bylo možné zmapovat podrobněji genetické pozadí nemoci.

U českých HSP pacientů se s vysokou převahou nejčastěji vyskytuje typ SPG4, což je obecně platné i v jiných populacích. Překvapivě je však nízký výskyt typu SPG3 v ČR, který byl uváděn v literatuře jako druhý nejčastější. V české populaci to zřejmě neplatí, naše výsledky tomu nenasvědčují, dokonce ani mezi pacienty s časným nástupem, který je pro SPG3 typický. Častěji se vyskytuje typ SPG31, z recesivních typů pak SPG11 a SPG7, což také odpovídá údajům z literatury.

V souboru pacientů se objevily i poměrně vzácné typy nemoci: SPG35, kde popisujeme novou, zatím nepopsanou variantu v genu *FA2H*, dále SPG77, která byla popsána teprve nedávno. SPG77 byla popsána jen u několika pacientů na světě a většinou se závažným fenotypem. U našeho pacienta však pozorujeme fenotyp nekomplikované HSP. U jedné pacientky byly nalezeny dvě nové varianty v genu *ALS2* a byl tak u ní potvrzen vzácný typ nemoci IAHS (infantile-onset ascending HSP).

Bylo nalezeno několik nových variant v HSP genech, v genu *REEP1* (SPG31) dokonce všechny. Zajímavý je nález dosud nepopsané varianty v genu *REEP1* hned u tří

pacientů nezávisle na sobě zaslaných k vyšetření, což nás vede k předpokladu, že jsou navzájem příbuzní.

U typů HSP, kde bylo objasněno více pacientů byl v rámci možností popsán typický fenotyp pacientů a diskutovány klinické příznaky našich pacientů s uvedenými v literatuře pro jednotlivé typy nemoci.

V genu *REEPI* byl pozorován v tomto genu zatím nepopsaný fenomén neúplné penetrance onemocnění v závislosti na pohlaví pacientů.

Byl navržen diagnostický postup u pacientů se suspektní hereditární spastickou parapézou: klasické sekvenování genu *SPAST* je efektivní jen u pacientů s familiárním výskytem nemoci. U *SPAST* negativních pacientů nemá dál smysl vyšetřovat klasickým sekvenováním gen *ATLI* (SPG3), vyšší záchyt by mohl být spíš u klasického sekvenování genu *REEPI*. Pacienty pak indikovat k MLPA genu *SPAST* a dál k NGS sekvenování panelu HSP genů.

Metody masivně paralelního sekvenování (MPS) neboli sekvenování nové generace (NGS) jsou v nezbytné pro diagnostiku pacientů s vzácnějšími typy, resp. příčinami u tak geneticky heterogenního onemocnění jako je HSP. Za největší přínos předkládané práce považujeme příspěvek prozatím unikátních molekulárně epidemiologických dat o populaci českých pacientů s hereditární spastickou parapézou.

Použitá literatura:

- ABRAHAO, A., PEDROSO, J. L., BRAGA-NETO, P., BOR-SENG-SHU, E., DE CARVALHO AGUIAR, P. & BARSOTTINI, O. G. 2015. Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics*, 16, 151-60.
- AFGAN, E., BAKER, D., VAN DEN BEEK, M., BLANKENBERG, D., BOUVIER, D., CECH, M., CHILTON, J., CLEMENTS, D., CORAOR, N., EBERHARD, C., GRUNING, B., GUERLER, A., HILLMAN-JACKSON, J., VON KUSTER, G., RASCHE, E., SORANZO, N., TURAGA, N., TAYLOR, J., NEKRUTENKO, A. & GOECKS, J. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res*, 44, W3-W10.
- ARNOLDI, A., TONELLI, A., CRIPPA, F., VILLANI, G., PACELLI, C., SIRONI, M., POZZOLI, U., D'ANGELO, M. G., MEOLA, G., MARTINUZZI, A., CRIMELLA, C., REDAELLI, F., PANZERI, C., RENIERI, A., COMI, G. P., TURCONI, A. C., BRESOLIN, N. & BASSI, M. T. 2008. A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat*, 29, 522-31.
- BALICZA, P., GROSZ, Z., GONZALEZ, M. A., BENCSIK, R., PENTELENYI, K., GAL, A., VARGA, E., KLIVENYI, P., KOLLER, J., ZUCHNER, S. & MOLNAR, J. M. 2016. Genetic background of the hereditary spastic paraplegia phenotypes in Hungary - An analysis of 58 probands. *J Neurol Sci*, 364, 116-21.
- BEETZ, C., NYGREN, A. O., DEUFEL, T. & REID, E. 2007. An SPG3A whole gene deletion neither cosegregates with disease nor modifies phenotype in a hereditary spastic paraplegia family with a pathogenic SPG4 deletion. *Neurogenetics*, 8, 317-8.
- BEETZ, C., NYGREN, A. O., SCHICKEL, J., AUER-GRUMBACH, M., BURK, K., HEIDE, G., KASSUBEK, J., KLIMPE, S., KLOPSTOCK, T., KREUZ, F., OTTO, S., SCHULE, R., SCHOLS, L., SPERFELD, A. D., WITTE, O. W. & DEUFEL, T. 2006. High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 67, 1926-30.
- BEETZ, C., SCHULE, R., DECONINCK, T., TRAN-VIET, K. N., ZHU, H., KREMER, B. P., FRINTS, S. G., VAN ZELST-STAMS, W. A., BYRNE, P., OTTO, S., NYGREN, A. O., BAETS, J., SMETS, K., CEULEMANS, B., DAN, B., NAGAN, N., KASSUBEK, J., KLIMPE, S., KLOPSTOCK, T., STOLZE, H., SMEETS, H. J., SCHRANDER-STUMPEL, C. T., HUTCHINSON, M., VAN DE WARRENBURG, B. P., BRAASTAD, C., DEUFEL, T., PERICAK-VANCE, M., SCHOLS, L., DE JONGHE, P. & ZUCHNER, S. 2008. REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain*, 131, 1078-86.
- BONN, F., PANTAKANI, K., SHOUKIER, M., LANGER, T. & MANNAN, A. U. 2010. Functional evaluation of paraplegin mutations by a yeast complementation assay. *Hum Mutat*, 31, 617-21.
- BORGULOVA, I. 2018. Genome-wide uniparental diploidy of all paternal chromosomes in an 11-year-old girl with deafness and without malignancy. *J Hum Genet*, 10, eprint.
- BOTZOLAKIS, E. J., ZHAO, J., GURBA, K. N., MACDONALD, R. L. & HEDERA, P. 2011. The effect of HSP-causing mutations in SPG3A and NIPA1 on the assembly, trafficking, and interaction between atlastin-1 and NIPA1. *Mol Cell Neurosci*, 46, 122-35.
- BRASCHINSKY, M., LUUS, S. M., GROSS-PAJU, K. & HALDRE, S. 2009. The prevalence of hereditary spastic paraplegia and the occurrence of SPG4 mutations in Estonia. *Neuroepidemiology*, 32, 89-93.
- BRUGMAN, F., SCHEFFER, H., WOKKE, J. H., NILLESEN, W. M., DE VISSER, M., ARONICA, E., VELDINK, J. H. & VAN DEN BERG, L. H. 2008. Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *Neurology*, 71, 1500-5.
- BURGUEZ, D., POLESE-BONATTO, M., SCUDEIRO, L. A. J., BJORKHEM, I., SCHOLS, L., JARDIM, L. B., MATTE, U., SARAIVA-PEREIRA, M. L., SIEBERT, M. & SAUTE, J. A. M. 2017. Clinical and molecular characterization of hereditary spastic paraplegias: A next-generation sequencing panel approach. *J Neurol Sci*, 383, 18-25.
- CASARI, G., DE FUSCO, M., CIARMATORI, S., ZEVIANI, M., MORA, M., FERNANDEZ, P., DE MICHELE, G., FILLA, A., COCOZZA, S., MARCONI, R., DURR, A., FONTAINE, B. & BALLABIO, A. 1998. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, 93, 973-83.
- CHEN, S., SONG, C., GUO, H., XU, P., HUANG, W., ZHOU, Y., SUN, J., LI, C. X., DU, Y., LI, X., LIU, Z., GENG, D., MAXWELL, P. H., ZHANG, C. & WANG, Y. 2005. Distinct novel mutations affecting the same base in the NIPA1 gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia in two Chinese families. *Hum Mutat*, 25, 135-41.
- CHOQUET, K., TETREAU, M., YANG, S., LA PIANA, R., DICAIRE, M. J., VANSTONE, M. R., MATHIEU, J., BOUCHARD, J. P., RIOUX, M. F., ROULEAU, G. A., BOYCOTT, K. M.,

- MAJEWSKI, J. & BRAIS, B. 2016. SPG7 mutations explain a significant proportion of French Canadian spastic ataxia cases. *Eur J Hum Genet*, 24, 1016-21.
- CHRESTIAN, N., DUPRE, N., GAN-OR, Z., SZUTO, A., CHEN, S., VENKITACHALAM, A., BRISSON, J. D., WARMAN-CHARDON, J., AHMED, S., ASHTIANI, S., MACDONALD, H., MOHSIN, N., MOURABIT-AMARI, K., PROVENCHER, P., BOYCOTT, K. M., STAVROPOULOS, D. J., DION, P. A., RAY, P. N., SUCHOWERSKY, O., ROULEAU, G. A. & YOON, G. 2017. Clinical and genetic study of hereditary spastic paraplegia in Canada. *Neurol Genet*, 3, e122.
- CLEMEN, C. S., TANGAVELOU, K., STRUCKSBERG, K. H., JUST, S., GAERTNER, L., REGUS-LEIDIG, H., STUMPF, M., REIMANN, J., CORAS, R., MORGAN, R. O., FERNANDEZ, M. P., HOFMANN, A., MULLER, S., SCHOSER, B., HANISCH, F. G., ROTTBAUER, W., BLUMCKE, I., VON HORSTEN, S., EICHINGER, L. & SCHRODER, R. 2010. Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases. *Brain*, 133, 2920-41.
- CONCEICAO PEREIRA, M., LOUREIRO, J. L., PINTO-BASTO, J., BRANDAO, E., MARGARIDA LOPES, A., NEVES, G., DIAS, P., GERALDES, R., MARTINS, I. P., CRUZ, V. T., KAMSTEEG, E. J., BRUNNER, H. G., COUTINHO, P., SEQUEIROS, J. & ALONSO, I. 2012. Alu elements mediate large SPG11 gene rearrangements: further spatascsin mutations. *Genet Med*, 14, 143-51.
- COOPER, T. A. 2005. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods*, 37, 331-40.
- COUTINHO, P., BARROS, J., ZEMMOURI, R., GUIMARAES, J., ALVES, C., CHORAO, R., LOURENCO, E., RIBEIRO, P., LOUREIRO, J. L., SANTOS, J. V., HAMRI, A., PATERNOTTE, C., HAZAN, J., SILVA, M. C., PRUD'HOMME, J. F. & GRID, D. 1999. Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: analysis of 106 patients in 46 families. *Arch Neurol*, 56, 943-9.
- COUTINHO, P., RUANO, L., LOUREIRO, J. L., CRUZ, V. T., BARROS, J., TUNA, A., BARBOT, C., GUIMARAES, J., ALONSO, I., SILVEIRA, I., SEQUEIROS, J., MARQUES NEVES, J., SERRANO, P. & SILVA, M. C. 2013. Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal: a population-based prevalence study. *JAMA Neurol*, 70, 746-55.
- D'AMICO, A., TESSA, A., SABINO, A., BERTINI, E., SANTORELLI, F. M. & SERVIDEI, S. 2004. Incomplete penetrance in an SPG3A-linked family with a new mutation in the atlastin gene. *Neurology*, 62, 2138-9.
- DE BOT, S. T., VAN DEN ELZEN, R. T., MENSENKAMP, A. R., SCHELHAAS, H. J., WILLEMSSEN, M. A., KNOERS, N. V., KREMER, H. P., VAN DE WARRENBURG, B. P. & SCHEFFER, H. 2010. Hereditary spastic paraplegia due to SPAST mutations in 151 Dutch patients: new clinical aspects and 27 novel mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81, 1073-8.
- DE BOT, S. T., VERMEER, S., BUIJSMAN, W., HEISTER, A., VOORENDT, M., VERRIPS, A., SCHEFFER, H., KREMER, H. P., VAN DE WARRENBURG, B. P. & KAMSTEEG, E. J. 2013. Pure adult-onset spastic paraplegia caused by a novel mutation in the KIAA0196 (SPG8) gene. *J Neurol*, 260, 1765-9.
- DENORA, P. S., SCHLESINGER, D., CASALI, C., KOK, F., TESSA, A., BOUKHRIS, A., AZZEDINE, H., DOTTI, M. T., BRUNO, C., TRUCHETTO, J., BIANCHERI, R., FEDIRKO, E., DI ROCCO, M., BUENO, C., MALANDRINI, A., BATTINI, R., SICKL, E., DE LEVA, M. F., BOESPFLUG-TANGUY, O., SILVESTRI, G., SIMONATI, A., SAID, E., FERBERT, A., CRISCUOLO, C., HEINIMANN, K., MODONI, A., WEBER, P., PALMERI, S., PLASILOVA, M., PAURI, F., CASSANDRINI, D., BATTISTI, C., PINI, A., TOSETTI, M., HAUSER, E., MASCIULLO, M., DI FABIO, R., PICCOLO, F., DENIS, E., CIONI, G., MASSA, R., DELLA GIUSTINA, E., CALABRESE, O., MELONE, M. A., DE MICHELE, G., FEDERICO, A., BERTINI, E., DURR, A., BROCKMANN, K., VAN DER KNAAP, M. S., ZATZ, M., FILLA, A., BRICE, A., STEVANIN, G. & SANTORELLI, F. M. 2009. Screening of ARHSP-TCC patients expands the spectrum of SPG11 mutations and includes a large scale gene deletion. *Hum Mutat*, 30, E500-19.
- DEPIENNE, C., FEDIRKO, E., FORLANI, S., CAZENEUVE, C., RIBAI, P., FEKI, I., TALLAKSEN, C., NGUYEN, K., STANKOFF, B., RUBERG, M., STEVANIN, G., DURR, A. & BRICE, A. 2007. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet*, 44, 281-4.
- DEPIENNE, C., TALLAKSEN, C., LEPHAY, J. Y., BRICKA, B., POEA-GUYON, S., FONTAINE, B., LABAUGE, P., BRICE, A. & DURR, A. 2006. Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases. *J Med Genet*, 43, 259-65.
- DI FABIO, R., MARCOTULLI, C., TESSA, A., LEONARDI, L., STORTI, E., PIERELLI, F., SANTORELLI, F. M. & CASALI, C. 2014. Sensory ataxia as a prominent clinical presentation in three families with mutations in CYP7B1. *J Neurol*, 261, 747-51.
- DICK, A. P. & STEVENSON, C. J. 1953. Hereditary spastic paraplegia; report of a family with associated extrapyramidal signs. *Lancet*, 1, 921-3.

- DICK, K. J., ECKHARDT, M., PAISAN-RUIZ, C., ALSHEHHI, A. A., PROUKAKIS, C., SIBTAIN, N. A., MAIER, H., SHARIFI, R., PATTON, M. A., BASHIR, W., KOUL, R., RAEBURN, S., GIESELMANN, V., HOULDEN, H. & CROSBY, A. H. 2010. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat*, 31, E1251-60.
- DONKERVOORT, S., DASTGIR, J., HU, Y., ZEIN, W. M., MARKS, H., BLACKSTONE, C. & BONNEMANN, C. G. 2014. Phenotypic variability of a likely FA2H founder mutation in a family with complicated hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet*, 85, 393-5.
- DURR, A., CAMUZAT, A., COLIN, E., TALLAKSEN, C., HANNEQUIN, D., COUTINHO, P., FONTAINE, B., ROSSI, A., GIL, R., ROUSSELLE, C., RUBERG, M., STEVANIN, G. & BRICE, A. 2004. Atlastin1 mutations are frequent in young-onset autosomal dominant spastic paraplegia. *Arch Neurol*, 61, 1867-72.
- EBBING, B., MANN, K., STAROSTA, A., JAUD, J., SCHOLS, L., SCHULE, R. & WOHLKE, G. 2008. Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet*, 17, 1245-52.
- ELERT-DOBKOWSKA, E., STEPNIAK, I., KRYSIA, W., RAJKIEWICZ, M., RAKOWICZ, M., SOBANSKA, A., RUDZINSKA, M., WASIELEWSKA, A., PILCH, J., KUBALSKA, J., LIPCZYNSKA-LOJKOWSKA, W., KULCZYCKI, J., KURDZIEL, K., SIKORSKA, A., BEETZ, C., ZAREMBA, J. & SULEK, A. 2015. Molecular spectrum of the SPAST, ATL1 and REEP1 gene mutations associated with the most common hereditary spastic paraplegias in a group of Polish patients. *J Neurol Sci*, 359, 35-9.
- ERICHSEN, A. K., INDERHAUG, E., MATTINGSDAL, M., EIKLID, K. & TALLAKSEN, C. M. 2007. Seven novel mutations and four exon deletions in a collection of Norwegian patients with SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur J Neurol*, 14, 809-14.
- EYMARD-PIERRE, E., LESCA, G., DOLLET, S., SANTORELLI, F. M., DI CAPUA, M., BERTINI, E. & BOESPFLUG-TANGUY, O. 2002. Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. *Am J Hum Genet*, 71, 518-27.
- FASSIER, C., HUTT, J. A., SCHOLPP, S., LUMSDEN, A., GIROS, B., NOTHIAS, F., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., HOUART, C. & HAZAN, J. 2010. Zebrafish atlastin controls motility and spinal motor axon architecture via inhibition of the BMP pathway. *Nat Neurosci*, 13, 1380-7.
- FERREIRINHA, F., QUATTRINI, A., PIROZZI, M., VALSECCHI, V., DINA, G., BROCCOLI, V., AURICCHIO, A., PIEMONTE, F., TOZZI, G., GAETA, L., CASARI, G., BALLABIO, A. & RUGARLI, E. I. 2004. Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest*, 113, 231-42.
- FICHERA, M., LO GIUDICE, M., FALCO, M., STURNIO, M., AMATA, S., CALABRESE, O., BIGONI, S., CALZOLARI, E. & NERI, M. 2004. Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 63, 1108-10.
- FINK, J. K. 2003. Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol*, 184 Suppl 1, S106-10.
- FINK, J. K. 2013. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*, 126, 307-28.
- FONKNECHTEN, N., MAVEL, D., BYRNE, P., DAVOINE, C. S., CRUAUD, C., BONSCH, D., SAMSON, D., COUTINHO, P., HUTCHINSON, M., MCMONAGLE, P., BURGUNDER, J. M., TARTAGLIONE, A., HEINZLEF, O., FEKI, I., DEUFEL, T., PARFREY, N., BRICE, A., FONTAINE, B., PRUD'HOMME, J. F., WEISSENBAACH, J., DURR, A. & HAZAN, J. 2000. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 9, 637-44.
- FREEMAN, C., SEAMAN, M. N. & REID, E. 2013. The hereditary spastic paraplegia protein strumpellin: characterisation in neurons and of the effect of disease mutations on WASH complex assembly and function. *Biochim Biophys Acta*, 1832, 160-73.
- GOIZET, C., BOUKHRIS, A., DURR, A., BEETZ, C., TRUCHETTO, J., TESSON, C., TSAOUSIDOU, M., FORLANI, S., GUYANT-MARECHAL, L., FONTAINE, B., GUIMARAES, J., ISIDOR, B., CHAZOULLERES, O., WENDUM, D., GRID, D., CHEVY, F., CHINNERY, P. F., COUTINHO, P., AZULAY, J. P., FEKI, I., MOCHEL, F., WOLF, C., MHIRI, C., CROSBY, A., BRICE, A. & STEVANIN, G. 2009a. CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5. *Brain*, 132, 1589-600.
- GOIZET, C., BOUKHRIS, A., MUNDWILLER, E., TALLAKSEN, C., FORLANI, S., TOUTAIN, A., CARRIERE, N., PAQUIS, V., DEPIENNE, C., DURR, A., STEVANIN, G. & BRICE, A. 2009b. Complicated forms of autosomal dominant hereditary spastic paraplegia are frequent in SPG10. *Hum Mutat*, 30, E376-85.
- GOYTAIN, A., HINES, R. M., EL-HUSSEINI, A. & QUAMME, G. A. 2007. NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J Biol Chem*, 282, 8060-8.

- GUNTHER, S., ELERT-DOBKOWSKA, E., SOEHN, A. S., HINREINER, S., YOON, G., HELLER, R., HELLENBROICH, Y., HUBNER, C. A., RAY, P. N., HEHR, U., BAUER, P., SULEK, A. & BEETZ, C. 2016. High Frequency of Pathogenic Rearrangements in SPG11 and Extensive Contribution of Mutational Hotspots and Founder Alleles. *Hum Mutat*, 37, 703-9.
- HABERLOVA, J., CLAEYS, K. G., ZAMECNIK, J., DE JONGHE, P. & SEEMAN, P. 2008. Extending the clinical spectrum of SPG3A mutations to a very severe and very early complicated phenotype. *J Neurol*, 255, 927-8.
- HADJIVASSILIOU, M., MARTINDALE, J., SHANMUGARAJAH, P., GRUNEWALD, R. A., SARRIGIANNIS, P. G., BEAUCHAMP, N., GARRARD, K., WARBURTON, R., SANDERS, D. S., FRIEND, D., DUTY, S., TAYLOR, J. & HOGGARD, N. 2017. Causes of progressive cerebellar ataxia: prospective evaluation of 1500 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88, 301-309.
- HARDING, A. E. 1981. Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 44, 871-83.
- HARDING, A. E. 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, 1, 1151-5.
- HAZAN, J., FONKNECHTEN, N., MAVEL, D., PATERNOTTE, C., SAMSON, D., ARTIGUENAVE, F., DAVOINE, C. S., CRUAUD, C., DURR, A., WINCKER, P., BROTTIER, P., CATTOLICO, L., BARBE, V., BURGUNDER, J. M., PRUD'HOMME, J. F., BRICE, A., FONTAINE, B., HEILIG, B. & WEISSENBACH, J. 1999. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet*, 23, 296-303.
- HEDERA, P. 2013. Recurrent de novo c.316G>A mutation in NIPA1 hotspot. *J Neurol Sci*, 335, 231-2.
- HEDERA, P., ELDEVİK, O. P., MALY, P., RAINIER, S. & FINK, J. K. 2005. Spinal cord magnetic resonance imaging in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neuroradiology*, 47, 730-4.
- HEHR, U., BAUER, P., WINNER, B., SCHULE, R., OLMEZ, A., KOEHLER, W., UYANIK, G., ENGEL, A., LENZ, D., SEIBEL, A., HEHR, A., PLOETZ, S., GAMEZ, J., ROLFS, A., WEIS, J., RINGER, T. M., BONIN, M., SCHUIERER, G., MARIENHAGEN, J., BOGDÄHN, U., WEBER, B. H., TOPALOGLU, H., SCHOLS, L., RIESS, O. & WINKLER, J. 2007. Long-term course and mutational spectrum of spatacin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol*, 62, 656-65.
- HEWAMADDUMA, C., MCDERMOTT, C., KIRBY, J., GRIERSON, A., PANAYI, M., DALTON, A., RAJABALLY, Y. & SHAW, P. 2009. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP). *Neurogenetics*, 10, 105-10.
- INOUE, K. 2005. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. *Neurogenetics*, 6, 1-16.
- IQBAL, Z., RYDNING, S. L., WEDDING, I. M., KOHT, J., PIHLSTROM, L., RENGMARK, A. H., HENRIKSEN, S. P., TALLAKSEN, C. M. & TOFT, M. 2017. Targeted high throughput sequencing in hereditary ataxia and spastic paraplegia. *PLoS One*, 12, e0174667.
- ISHIURA, H., TAKAHASHI, Y., HAYASHI, T., SAITO, K., FURUYA, H., WATANABE, M., MURATA, M., SUZUKI, M., SUGIURA, A., SAWAI, S., SHIBUYA, K., UEDA, N., ICHIKAWA, Y., KANAZAWA, I., GOTO, J. & TSUJI, S. 2014. Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *J Hum Genet*, 59, 163-72.
- IVANOVA, N., CLAEYS, K. G., DECONINCK, T., LITVINENKO, I., JORDANOVA, A., AUERGRUMBACH, M., HABERLOVA, J., LOFGREN, A., SMEYERS, G., NELIS, E., MERCELIS, R., PLECKO, B., PRILLER, J., ZAMECNIK, J., CEULEMANS, B., ERICHSEN, A. K., BJORCK, E., NICHOLSON, G., SEREDA, M. W., SEEMAN, P., KREMENSKY, I., MITEV, V. & DE JONGHE, P. 2007. Hereditary spastic paraplegia 3A associated with axonal neuropathy. *Arch Neurol*, 64, 706-13.
- JACOBI, H., BAUER, P., GIUNTI, P., LABRUM, R., SWEENEY, M. G., CHARLES, P., DURR, A., MARELLI, C., GLOBAS, C., LINNEMANN, C., SCHOLS, L., RAKOWICZ, M., ROLA, R., ZDZIENICKA, E., SCHMITZ-HUBSCH, T., FANCELLU, R., MARIOTTI, C., TOMASELLO, C., BALIKO, L., MELEGH, B., FILLA, A., RINALDI, C., VAN DE WARRENBURG, B. P., VERSTAPPEN, C. C., SZYMANSKI, S., BERCIANO, J., INFANTE, J., TIMMANN, D., BOESCH, S., HERING, S., DEPONDY, C., PANDOLFO, M., KANG, J. S., RATZKA, S., SCHULZ, J., TEZENAS DU MONTCEL, S. & KLOCKGETHER, T. 2011. The natural history of spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6: a 2-year follow-up study. *Neurology*, 77, 1035-41.
- JAHIC, A., KREUZ, F., ZACHER, P., FIEDLER, J., BIER, A., REIF, S., RIEGER, M., KRUGER, S., BEETZ, C. & PLASCHKE, J. 2014. A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. *J Neurol Sci*, 347, 372-4.
- JOUET, M., ROSENTHAL, A., ARMSTRONG, G., MACFARLANE, J., STEVENSON, R., PATERSON, J., METZENBERG, A., IONASESCU, V., TEMPLE, K. & KENWRICK, S. 1994. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet*, 7, 402-7.

- KIM, T. H., LEE, J. H., PARK, Y. E., SHIN, J. H., NAM, T. S., KIM, H. S., JANG, H. J., SEMENOV, A., KIM, S. J. & KIM, D. S. 2014. Mutation analysis of SPAST, ATLL1, and REEP1 in Korean Patients with Hereditary Spastic Paraplegia. *J Clin Neurol*, 10, 257-61.
- KJELLIN K. 1959. Familial spastic paraplegia with amyotrophy, oligophrenia and central retinal degeneration. *Arch Neurol*, 1, 133-40.
- KLEBE, S., DEPIENNE, C., GERBER, S., CHALLE, G., ANHEIM, M., CHARLES, P., FEDIRKO, E., LEJEUNE, E., COTTINEAU, J., BRUSCO, A., DOLLFUS, H., CHINNERY, P. F., MANCINI, C., FERRER, X., SOLE, G., DESTEE, A., MAYER, J. M., FONTAINE, B., DE SEZE, J., CLANET, M., OLLAGNON, E., BUSSON, P., CAZENEUVE, C., STEVANIN, G., KAPLAN, J., ROZET, J. M., BRICE, A. & DURR, A. 2012. Spastic paraplegia gene 7 in patients with spasticity and/or optic neuropathy. *Brain*, 135, 2980-93.
- KOPPEN, M., METODIEV, M. D., CASARI, G., RUGARLI, E. I. & LANGER, T. 2007. Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Biol*, 27, 758-67.
- KUMAR, K. R., BLAIR, N. F., VANDEBONA, H., LIANG, C., NG, K., SHARPE, D. M., GRUNEWALD, A., GOLNITZ, U., SAVIOUK, V., ROLFS, A., KLEIN, C. & SUE, C. M. 2013. Targeted next generation sequencing in SPAST-negative hereditary spastic paraplegia. *J Neurol*, 260, 2516-22.
- LAMARI, F., MOCHEL, F., SEDEL, F. & SAUDUBRAY, J. M. 2013. Disorders of phospholipids, sphingolipids and fatty acids biosynthesis: toward a new category of inherited metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis*, 36, 411-25.
- LANGER, T. 2000. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 25, 247-51.
- LI, H. & DURBIN, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-60.
- LIM, W. L., MARTINS, I. J. & MARTINS, R. N. 2014. The involvement of lipids in Alzheimer's disease. *J Genet Genomics*, 41, 261-74.
- LIM, Y., CHO, I. T., SCHOEL, L. J., CHO, G. & GOLDEN, J. A. 2015. Hereditary spastic paraplegia-linked REEP1 modulates endoplasmic reticulum/mitochondria contacts. *Ann Neurol*, 78, 679-96.
- LIU, Y. T., LAURA, M., HERSHESON, J., HORGA, A., JAUNMUKTANE, Z., BRANDNER, S., PITTMAN, A., HUGHES, D., POLKE, J. M., SWEENEY, M. G., PROUKAKIS, C., JANSSEN, J. C., AUERGRUMBACH, M., ZUCHNER, S., SHIELDS, K. G., REILLY, M. M. & HOULDEN, H. 2014. Extended phenotypic spectrum of KIF5A mutations: From spastic paraplegia to axonal neuropathy. *Neurology*, 83, 612-9.
- LO GIUDICE, T., LOMBARDI, F., SANTORELLI, F. M., KAWARAI, T. & ORLACCHIO, A. 2014. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*, 261, 518-39.
- LO, K. Y., KUZMIN, A., UNGER, S. M., PETERSEN, J. D. & SILVERMAN, M. A. 2011. KIF1A is the primary anterograde motor protein required for the axonal transport of dense-core vesicles in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 491, 168-73.
- LU, X., CEN, Z., XIE, F., OUYANG, Z., ZHANG, B., ZHAO, G. & LUO, W. 2014. Genetic analysis of SPG4 and SPG3A genes in a cohort of Chinese patients with hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci*, 347, 368-71.
- LYNCH, D. S., KOUTSIS, G., TUCCI, A., PANAS, M., BAKLOU, M., BREZA, M., KARADIMA, G. & HOULDEN, H. 2016. Hereditary spastic paraplegia in Greece: characterisation of a previously unexplored population using next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*, 24, 857-63.
- MAGARIELLO, A., RUSSO, C., CITRIGNO, L., ZUCHNER, S., PATITUCCI, A., MAZZEI, R., CONFORTI, F. L., FERLAZZO, E., AGUGLIA, U. & MUGLIA, M. 2017. Exome sequencing reveals two FA2H mutations in a family with a complicated form of Hereditary Spastic Paraplegia and psychiatric impairments. *J Neurol Sci*, 372, 347-349.
- MALTECCA, F., MAGNONI, R., CERRI, F., COX, G. A., QUATTRINI, A. & CASARI, G. 2009. Haploinsufficiency of AFG3L2, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28, causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. *J Neurosci*, 29, 9244-54.
- MANGANELLI, F., PISCIOTTA, C., DUBBIOSO, R., IODICE, R., CRISCUOLO, C., RUGGIERO, L., DE MICHELE, G. & SANTORO, L. 2011. Electrophysiological characterisation in hereditary spastic paraplegia type 5. *Clin Neurophysiol*, 122, 819-22.
- MARELLI, C., LAMARI, F., RAINTEAU, D., LAFOURCADE, A., BANNEAU, G., HUMBERT, L., MONIN, M. L., PETIT, E., DEBS, R., CASTELNOVO, G., OLLAGNON, E., LAVIE, J., PILLIOD, J., COUPRY, I., BABIN, P. J., GUISSART, C., BENYOUNES, I., ULLMANN, U., LESCA, G., THAUVIN-ROBINET, C., LABAUGE, P., ODENT, S., EWENCZYK, C., WOLF, C., STEVANIN,

- G., HAJAGE, D., DURR, A., GOIZET, C. & MOCHEL, F. 2018. Plasma oxysterols: biomarkers for diagnosis and treatment in spastic paraplegia type 5. *Brain*, 141, 72-84.
- MARTINEZ, A. R., MORO, A., ABRAHAO, A., FABER, I., BORGES, C. R., REZENDE, T. J., MARTINS, C. R., JR., MOSCOVICH, M., MUNHOZ, R. P., SEGAL, S. L., ARRUDA, W. O., SARAIVA-PEREIRA, M. L., KARUTA, S., PEDROSO, J. L., D'ABREU, A., JARDIM, L. B., LOPES-CENDES, I., BARSOTTINI, O. G., TEIVE, H. A. & FRANCA, M. C., JR. 2017. Nonneurological Involvement in Late-Onset Friedreich Ataxia (LOFA): Exploring the Phenotypes. *Cerebellum*, 16, 253-256.
- MARTINEZ MURILLO, F., KOBAYASHI, H., PEGORARO, E., GALLUZZI, G., CREEL, G., MARIANI, C., FARINA, E., RICCI, E., ALFONSO, G., PAULI, R. M. & HOFFMAN, E. P. 1999. Genetic localization of a new locus for recessive familial spastic paraparesis to 15q13-15. *Neurology*, 53, 50-6.
- MCCORQUODALE, D. S., 3RD, OZOMARO, U., HUANG, J., MONTENEGRO, G., KUSHMAN, A., CITRIGNO, L., PRICE, J., SPEZIANI, F., PERICAK-VANCE, M. A. & ZUCHNER, S. 2011. Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet*, 79, 523-30.
- MCDERMOTT, C. J., BURNES, C. E., KIRBY, J., COX, L. E., RAO, D. G., HEWAMADDUMA, C., SHARRACK, B., HADJIVASSILIOU, M., CHINNERY, P. F., DALTON, A., SHAW, P. J., UK & IRISH, H. S. P. C. 2006. Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation. *Neurology*, 67, 45-51.
- MEIJER, I. A., DION, P., LAURENT, S., DUPRE, N., BRAIS, B., LEVERT, A., PUYMIRAT, J., RIOUX, M. F., SYLVAIN, M., ZHU, P. P., SODERBLUM, C., STADLER, J., BLACKSTONE, C. & ROULEAU, G. A. 2007. Characterization of a novel SPG3A deletion in a French-Canadian family. *Ann Neurol*, 61, 599-603.
- MESZAROSOVA, A. U., GRECMALOVA, D., BRAZDILOVA, M., DVORACKOVA, N., KALINA, Z., CERMAKOVA, M., VAVROVA, D., SMETANOVA, I., STANEK, D. & SEEMAN, P. 2017. Disease-Causing Variants in the ATLL1 Gene Are a Rare Cause of Hereditary Spastic Paraplegia among Czech Patients. *Ann Hum Genet*, 81, 249-257.
- MESZAROSOVA, A. U., PUTZOVA, M., CERMAKOVA, M., VAVROVA, D., DOLEZALOVA, K., SMETANOVA, I., STEJSKAL, D., BEETZ, C. & SEEMAN, P. 2016. SPAST mutation spectrum and familial occurrence among Czech patients with pure hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet*, 61, 845-850.
- METZ, G., COPPARD, N., COOPER, J. M., DELATYCKI, M. B., DURR, A., DI PROSPERO, N. A., GIUNTI, P., LYNCH, D. R., SCHULZ, J. B., RUMMEY, C. & MEIER, T. 2013. Rating disease progression of Friedreich's ataxia by the International Cooperative Ataxia Rating Scale: analysis of a 603-patient database. *Brain*, 136, 259-68.
- MIGNARRI, A., MALANDRINI, A., DEL PUPPO, M., MAGNI, A., MONTI, L., GINANNESCHI, F., TESSA, A., SANTORELLI, F. M., FEDERICO, A. & DOTTI, M. T. 2014. Hereditary spastic paraplegia type 5: a potentially treatable disorder of cholesterol metabolism. *J Neurol*, 261, 617-9.
- MONTECCHIANI, C., PEDACE, L., LO GIUDICE, T., CASELLA, A., MEARINI, M., GAUDIELLO, F., PEDROSO, J. L., TERRACCIANO, C., CALTAGIRONE, C., MASSA, R., ST GEORGE-HYSLOP, P. H., BARSOTTINI, O. G., KAWARAI, T. & ORLACCHIO, A. 2016. ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, 139, 73-85.
- MORAIS, S., RAYMOND, L., MAIREY, M., COUTINHO, P., BRANDAO, E., RIBEIRO, P., LOUREIRO, J. L., SEQUEIROS, J., BRICE, A., ALONSO, I. & STEVANIN, G. 2017. Massive sequencing of 70 genes reveals a myriad of missing genes or mechanisms to be uncovered in hereditary spastic paraplegias. *Eur J Hum Genet*, 25, 1217-1228.
- MOSER, M., LI, Y., VAUPEL, K., KRETZSCHMAR, D., KLUGE, R., GLYNN, P. & BUETTNER, R. 2004. Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 24, 1667-79.
- NAMEKAWA, M., RIBAI, P., NELSON, I., FORLANI, S., FELLMANN, F., GOIZET, C., DEPIENNE, C., STEVANIN, G., RUBERG, M., DURR, A. & BRICE, A. 2006. SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years. *Neurology*, 66, 112-4.
- NOVARINO, G., FENSTERMAKER, A. G., ZAKI, M. S., HOFREE, M., SILHAVY, J. L., HEIBERG, A. D., ABDELLATEEF, M., ROSTI, B., SCOTT, E., MANSOUR, L., MASRI, A., KAYSERILI, H., AL-AAMA, J. Y., ABDEL-SALAM, G. M. H., KARMINEJAD, A., KARA, M., KARA, B., BOZORGMEHRI, B., BEN-OMRAN, T., MOJAHEDI, F., EL DIN MAHMOUD, I. G., BOUSLAM, N., BOUHOUCHE, A., BENOMAR, A., HANEIN, S., RAYMOND, L., FORLANI, S., MASCARO, M., SELIM, L., SHEHATA, N., AL-ALLAWI, N., BINDU, P. S., AZAM, M., GUNEL, M., CAGLAYAN, A., BILGUVAR, K., TOLUN, A., ISSA, M. Y., SCHROTH, J., SPENCER, E. G., ROSTI, R. O., AKIZU, N., VAUX, K. K., JOHANSEN, A., KOH, A. A., MEGAHED, H., DURR, A., BRICE, A., STEVANIN, G., GABRIEL, S. B., IDEKER, T. & GLEESON, J. G. 2014. Exome

- sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*, 343, 506-511.
- ORLACCHIO, A., BABALINI, C., BORRECA, A., PATRONO, C., MASSA, R., BASARAN, S., MUNHOZ, R. P., ROGAEVA, E. A., ST GEORGE-HYSLOP, P. H., BERNARDI, G. & KAWARAI, T. 2010. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 133, 591-8.
- ORLACCHIO, A., PATRONO, C., BORRECA, A., BABALINI, C., BERNARDI, G. & KAWARAI, T. 2008a. Spastic paraplegia in Romania: high prevalence of SPG4 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 606-7.
- ORLACCHIO, A., PATRONO, C., GAUDIELLO, F., ROCCHI, C., MOSCHELLA, V., FLORIS, R., BERNARDI, G. & KAWARAI, T. 2008b. Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia: A locus to 4p and allelism with SPG4. *Neurology*, 70, 1959-66.
- ORSO, G., MARTINUZZI, A., ROSSETTO, M. G., SARTORI, E., FEANY, M. & DAGA, A. 2005. Disease-related phenotypes in a Drosophila model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine. *J Clin Invest*, 115, 3026-34.
- ORSUCCI, D., PETRUCCI, L., IENCO, E. C., CHICO, L., SIMI, P., FOGLI, A., BALDINOTTI, F., SIMONCINI, C., LOGERFO, A., CARLESI, C., ARNOLDI, A., BASSI, M. T., SICILIANO, G., BONUCCELLI, U. & MANCUSO, M. 2014. Hereditary spastic paraparesis in adults. A clinical and genetic perspective from Tuscany. *Clin Neurol Neurosurg*, 120, 14-9.
- PAISAN-RUIZ, C., NATH, P., WOOD, N. W., SINGLETON, A. & HOULDEN, H. 2008. Clinical heterogeneity and genotype-phenotype correlations in hereditary spastic paraplegia because of Spatacsin mutations (SPG11). *Eur J Neurol*, 15, 1065-70.
- PARK, H., KANG, S. H., PARK, S., KIM, S. Y., SEO, S. H., LEE, S. J., LEE, J. A., CHO, S. I., SUNG, J. J., LEE, K. W., KIM, J. Y., PARK, S. S. & SEONG, M. W. 2015. Mutational spectrum of the SPAST and ATL1 genes in Korean patients with hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci*, 357, 167-72.
- PARK, S. H., ZHU, P. P., PARKER, R. L. & BLACKSTONE, C. 2010. Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest*, 120, 1097-110.
- PEREZ-BRANGULI, F., MISHRA, H. K., PROTS, I., HAVLICEK, S., KOHL, Z., SAUL, D., RUMMEL, C., DORCA-AREVALO, J., REGENSBURGER, M., GRAEF, D., SOCK, E., BLASI, J., GROEMER, T. W., SCHLOTZER-SCHREHARDT, U., WINKLER, J. & WINNER, B. 2014. Dysfunction of spatacsin leads to axonal pathology in SPG11-linked hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 23, 4859-74.
- PFEFFER, G., PYLE, A., GRIFFIN, H., MILLER, J., WILSON, V., TURNBULL, L., FAWCETT, K., SIMS, D., EGLON, G., HADJIVASSILIOU, M., HORVATH, R., NEMETH, A. & CHINNERY, P. F. 2015. SPG7 mutations are a common cause of undiagnosed ataxia. *Neurology*, 84, 1174-6.
- PIROZZI, M., QUATTRINI, A., ANDOLFI, G., DINA, G., MALAGUTI, M. C., AURICCHIO, A. & RUGARLI, E. I. 2006. Intramuscular viral delivery of paraplegin rescues peripheral axonopathy in a model of hereditary spastic paraplegia. *J Clin Invest*, 116, 202-8.
- PROUKAKIS, C., MOORE, D., LABRUM, R., WOOD, N. W. & HOULDEN, H. 2011. Detection of novel mutations and review of published data suggests that hereditary spastic paraplegia caused by spastin (SPAST) mutations is found more often in males. *J Neurol Sci*, 306, 62-5.
- PUECH, B., LACOUR, A., STEVANIN, G., SAUTIERE, B. G., DEVOS, D., DEPIENNE, C., DENIS, E., MUNDWILLER, E., FERRIBY, D., VERMERSCH, P. & DEFOORT-DHELLEMMES, S. 2011. Kjellin syndrome: long-term neuro-ophthalmologic follow-up and novel mutations in the SPG11 gene. *Ophthalmology*, 118, 564-73.
- RAVIGLIONE, F., CONTE, G., GHEZZI, D., PARAZZINI, C., RIGHINI, A., VERGARO, R., LEGATI, A., SPACCINI, L., GASPERINI, S., GARAVAGLIA, B. & MASTRANGELO, M. 2016. Clinical findings in a patient with FARS2 mutations and early-infantile-encephalopathy with epilepsy. *Am J Med Genet A*, 170, 3004-3007.
- REETZ, K., DOGAN, I., COSTA, A. S., DAFOTAKIS, M., FEDOSOV, K., GIUNTI, P., PARKINSON, M. H., SWEENEY, M. G., MARIOTTI, C., PANZERI, M., NANETTI, L., ARPA, J., SANZ-GALLEGO, I., DURR, A., CHARLES, P., BOESCH, S., NACHBAUER, W., KLOPSTOCK, T., KARIN, I., DEPONDT, C., VOM HAGEN, J. M., SCHOLS, L., GIORDANO, I. A., KLOCKGETHER, T., BURK, K., PANDOLFO, M. & SCHULZ, J. B. 2015. Biological and clinical characteristics of the European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies (EFACTS) cohort: a cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol*, 14, 174-82.
- REID, E., KLOOS, M., ASHLEY-KOCH, A., HUGHES, L., BEVAN, S., SVENSON, I. K., GRAHAM, F. L., GASKELL, P. C., DEARLOVE, A., PERICAK-VANCE, M. A., RUBINSZTEIN, D. C. & MARCHUK, D. A. 2002. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*, 71, 1189-94.

- RHEIN, JHW. 1916. Family spastic paralysis. *J MentNerv Dis*, 44, 115-4, 224-42.
- RIBAI, P., DEPIENNE, C., FEDIRKO, E., JOTHY, A. C., VIVEWEGER, C., HAHN-BARMA, V., BRICE, A. & DURR, A. 2008. Mental deficiency in three families with SPG4 spastic paraplegia. *Eur J Hum Genet*, 16, 97-104.
- RICHARDS, S., AZIZ, N., BALE, S., BICK, D., DAS, S., GASTIER-FOSTER, J., GRODY, W. W., HEGDE, M., LYON, E., SPECTOR, E., VOELKERDING, K. & REHM, H. L. 2015. 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*, 17, 405-24.
- RUANO, L., MELO, C., SILVA, M. C. & COUTINHO, P. 2014. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42, 174-83.
- RYDNING, S. L., WEDDING, I. M., KOHT, J., CHAWLA, M., OYE, A. M., SHENG, Y., VIGELAND, M. D., SELMER, K. K. & TALLAKSEN, C. M. 2016. A founder mutation p.H701P identified as a major cause of SPG7 in Norway. *Eur J Neurol*, 23, 763-71.
- SAFKA BROZKOVA, D., HABERLOVA, J., MAZANEC, R., LASTUVKOVA, J. & SEEMAN, P. 2016. HSMNR belongs to the most frequent types of hereditary neuropathy in the Czech Republic and is twice more frequent than HMSNL. *Clin Genet*, 90, 161-5.
- SALINAS, S., CARAZO-SALAS, R. E., PROUKAKIS, C., SCHIAVO, G. & WARNER, T. T. 2007. Spastin and microtubules: Functions in health and disease. *J Neurosci Res*, 85, 2778-82.
- SAMORODNITSKY, E., DATTA, J., JEWELL, B. M., HAGOPIAN, R., MIYA, J., WING, M. R., DAMODARAN, S., LIPPUS, J. M., REESER, J. W., BHATT, D., TIMMERS, C. D. & ROYCHOWDHURY, S. 2015. Comparison of custom capture for targeted next-generation DNA sequencing. *J Mol Diagn*, 17, 64-75.
- SANCHEZ-FERRERO, E., COTO, E., BEETZ, C., GAMEZ, J., CORAO, A. I., DIAZ, M., ESTEBAN, J., DEL CASTILLO, E., MORIS, G., INFANTE, J., MENENDEZ, M., PASCUAL-PASCUAL, S. I., LOPEZ DE MUNAIN, A., GARCIA-BARCINA, M. J. & ALVAREZ, V. 2013. SPG7 mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V. *Clin Genet*, 83, 257-62.
- SARTUCCI, F., TOVANI, S., MURRI, L. & SAGLIOCCO, L. 2007. Motor and somatosensory evoked potentials in Autosomal Dominant Hereditary Spastic Paraparesis (ADHSP) linked to chromosome 2p, SPG4. *Brain Res Bull*, 74, 243-9.
- SAUTER, S., MITERSKI, B., KLIMPE, S., BONDSCH, D., SCHOLS, L., VISBECK, A., PAPKE, T., HOPF, H. C., ENGEL, W., DEUFEL, T., EPPLER, J. T. & NEESEN, J. 2002. Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat*, 20, 127-32.
- SILVER, JR. 1966. Familial spastic paraplegia with amyotrophy of the hands. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*, 29, 135-44.
- SCHADY, W., DICK, J. P., SHEARD, A. & CRAMPTON, S. 1991. Central motor conduction studies in hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54, 775-9.
- SCHOLS, L., RATTAY, T. W., MARTUS, P., MEISNER, C., BAETS, J., FISCHER, I., JAGLE, C., FRAIDAKIS, M. J., MARTINUZZI, A., SAUTE, J. A., SCARLATO, M., ANTENORA, A., STENDEL, C., HOFLINGER, P., LOURENCO, C. M., ABREU, L., SMETS, K., PAUCAR, M., DECONINCK, T., BIS, D. M., WIETHOFF, S., BAUER, P., ARNOLDI, A., MARQUES, W., JARDIM, L. B., HAUSER, S., CRISCUOLO, C., FILLA, A., ZUCHNER, S., BASSI, M. T., KLOPSTOCK, T., DE JONGHE, P., BJORKHEM, I. & SCHULE, R. 2017. Hereditary spastic paraplegia type 5: natural history, biomarkers and a randomized controlled trial. *Brain*, 140, 3112-3127.
- SCHULE, R., HOLLAND-LETZ, T., KLIMPE, S., KASSUBEK, J., KLOPSTOCK, T., MALL, V., OTTO, S., WINNER, B. & SCHOLS, L. 2006. The Spastic Paraplegia Rating Scale (SPRS): a reliable and valid measure of disease severity. *Neurology*, 67, 430-4.
- SCHULE, R., KREMER, B. P., KASSUBEK, J., AUER-GRUMBACH, M., KOSTIC, V., KLOPSTOCK, T., KLIMPE, S., OTTO, S., BOESCH, S., VAN DE WARRENBURG, B. P. & SCHOLS, L. 2008. SPG10 is a rare cause of spastic paraplegia in European families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 584-7.
- SCHULE, R., WIETHOFF, S., MARTUS, P., KARLE, K. N., OTTO, S., KLEBE, S., KLIMPE, S., GALLENMULLER, C., KURZWELLY, D., HENKEL, D., RIMMELE, F., STOLZE, H., KOHL, Z., KASSUBEK, J., KLOCKGETHER, T., VIELHABER, S., KAMM, C., KLOPSTOCK, T., BAUER, P., ZUCHNER, S., LIEPELT-SCARFONE, I. & SCHOLS, L. 2016. Hereditary spastic paraplegia: Clinicogenetic lessons from 608 patients. *Ann Neurol*, 79, 646-58.
- SHEERIN, U. M., SCHNEIDER, S. A., CARR, L., DEUSCHL, G., HOPFNER, F., STAMELOU, M., WOOD, N. W. & BHATIA, K. P. 2014. ALS2 mutations: juvenile amyotrophic lateral sclerosis and generalized dystonia. *Neurology*, 82, 1065-7.

- SHENDURE, J. & JI, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26, 1135-45.
- SMEDLEY, D., JACOBSEN, J. O., JAGER, M., KOHLER, S., HOLTGREWE, M., SCHUBACH, M., SIRAGUSA, E., ZEMOJTEL, T., BUSKE, O. J., WASHINGTON, N. L., BONE, W. P., HAENDEL, M. A. & ROBINSON, P. N. 2015. Next-generation diagnostics and disease-gene discovery with the Exomiser. *Nat Protoc*, 10, 2004-15.
- STEFFENSEN, A. Y., DANDANELL, M., JONSON, L., EJLERTSEN, B., GERDES, A. M., NIELSEN, F. C. & HANSEN, T. 2014. Functional characterization of BRCA1 gene variants by mini-gene splicing assay. *Eur J Hum Genet*, 22, 1362-8.
- STEVANIN, G., AZZEDINE, H., DENORA, P., BOUKHRIS, A., TAZIR, M., LOSSOS, A., ROSA, A. L., LERER, I., HAMRI, A., ALEGRIA, P., LOUREIRO, J., TADA, M., HANNEQUIN, D., ANHEIM, M., GOIZET, C., GONZALEZ-MARTINEZ, V., LE BER, I., FORLANI, S., IWABUCHI, K., MEINER, V., UYANIK, G., ERICHSEN, A. K., FEKI, I., PASQUIER, F., BELARBI, S., CRUZ, V. T., DEPIENNE, C., TRUCHETTO, J., GARRIGUES, G., TALLAKSEN, C., TRANCHANT, C., NISHIZAWA, M., VALE, J., COUTINHO, P., SANTORELLI, F. M., MHIRI, C., BRICE, A. & DURR, A. 2008. Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain*, 131, 772-84.
- STEVANIN, G., SANTORELLI, F. M., AZZEDINE, H., COUTINHO, P., CHOMILIER, J., DENORA, P. S., MARTIN, E., OUVREARD-HERNANDEZ, A. M., TESSA, A., BOUSLAM, N., LOSSOS, A., CHARLES, P., LOUREIRO, J. L., ELLEUCH, N., CONFAVREUX, C., CRUZ, V. T., RUBERG, M., LEGUERN, E., GRID, D., TAZIR, M., FONTAINE, B., FILLA, A., BERTINI, E., DURR, A. & BRICE, A. 2007. Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet*, 39, 366-72.
- STRUMPELL, A. 1880. Beitrage zur Pathologie des Rückenmarks. *Arch Psychiatr Nervenkr*, 10, 676-717.
- SULEK, A., ELERT, E., RAJKIEWICZ, M., ZDZIENICKA, E., STEPNIAK, I., KRYSA, W. & ZAREMBA, J. 2013. Screening for the hereditary spastic paraplegias SPG4 and SPG3A with the multiplex ligation-dependent probe amplification technique in a large population of affected individuals. *Neurol Sci*, 34, 239-42.
- TABRIZI, S. J., SCAHILL, R. I., OWEN, G., DURR, A., LEAVITT, B. R., ROOS, R. A., BOROWSKY, B., LANDWEHRMEYER, B., FROST, C., JOHNSON, H., CRAUFURD, D., REILMANN, R., STOUT, J. C. & LANGBEHN, D. R. 2013. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol*, 12, 637-49.
- TESSA, A., SILVESTRI, G., DE LEVA, M. F., MODONI, A., DENORA, P. S., MASCIULLO, M., DOTTI, M. T., CASALI, C., MELONE, M. A., FEDERICO, A., FILLA, A. & SANTORELLI, F. M. 2008. A novel KIF5A/SPG10 mutation in spastic paraplegia associated with axonal neuropathy. *J Neurol*, 255, 1090-2.
- TROTTA, N., ORSO, G., ROSSETTO, M. G., DAGA, A. & BROADIE, K. 2004. The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol*, 14, 1135-47.
- TSAOUSIDOU, M. K., OUAHCHI, K., WARNER, T. T., YANG, Y., SIMPSON, M. A., LAING, N. G., WILKINSON, P. A., MADRID, R. E., PATEL, H., HENTATI, F., PATTON, M. A., HENTATI, A., LAMONT, P. J., SIDDIQUE, T. & CROSBY, A. H. 2008. Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration. *Am J Hum Genet*, 82, 510-5.
- VAN GASSEN, K. L., VAN DER HEIJDEN, C. D., DE BOT, S. T., DEN DUNNEN, W. F., VAN DEN BERG, L. H., VERSCHUUREN-BEMELMANS, C. C., KREMER, H. P., VELDINK, J. H., KAMSTEEG, E. J., SCHEFFER, H. & VAN DE WARRENBURG, B. P. 2012. Genotype-phenotype correlations in spastic paraplegia type 7: a study in a large Dutch cohort. *Brain*, 135, 2994-3004.
- VANTROYS, E., LARSON, A., FRIEDERICH, M., KNIGHT, K., SWANSON, M. A., POWELL, C. A., SMET, J., VERGULT, S., DE PAEPE, B., SENECA, S., ROEYERS, H., MENTEN, B., MINCZUK, M., VANLANDER, A., VAN HOVE, J. & VAN COSTER, R. 2017. New insights into the phenotype of FARS2 deficiency. *Mol Genet Metab*, 122, 172-181.
- VARGA, R. E., SCHULE, R., FADEL, H., VALENZUELA, I., SPEZIANI, F., GONZALEZ, M., RUDENSKAIA, G., NURNBERG, G., THIELE, H., ALTMULLER, J., ALVAREZ, V., GAMEZ, J., GARBERN, J. Y., NURNBERG, P., ZUCHNER, S. & BEETZ, C. 2013. Do not trust the pedigree: reduced and sex-dependent penetrance at a novel mutation hotspot in ATLL1 blurs autosomal dominant inheritance of spastic paraplegia. *Hum Mutat*, 34, 860-3.
- VERNY, C., GUEGEN, N., DESQUIRET, V., CHEVROLLIER, A., PRUNDEAN, A., DUBAS, F., CASSEREAU, J., FERRE, M., AMATI-BONNEAU, P., BONNEAU, D., REYNIER, P. & PROCACCIO, V. 2011. Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation. *Mitochondrion*, 11, 70-5.

- WANG, K., LI, M. & HAKONARSON, H. 2010. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 38, e164.
- WARNECKE, T., DUNING, T., SCHIRMACHER, A., MOHAMMADI, S., SCHWINDT, W., LOHMANN, H., DZIEWAS, R., DEPPE, M., RINGELSTEIN, E. B. & YOUNG, P. 2010. A novel splice site mutation in the SPG7 gene causing widespread fiber damage in homozygous and heterozygous subjects. *Mov Disord*, 25, 413-20.
- YANG, H. & WANG, K. 2015. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc*, 10, 1556-66.
- YANG, Y., LIU, W., FANG, Z., SHI, J., CHE, F., HE, C., YAO, L., WANG, E. & WU, Y. 2016. A Newly Identified Missense Mutation in FARS2 Causes Autosomal-Recessive Spastic Paraplegia. *Hum Mutat*, 37, 165-9.
- YOON, G., BASKIN, B., TARNOPOLSKY, M., BOYCOTT, K. M., GERAGHTY, M. T., SELL, E., GOOBIE, S., MESCHINO, W., BANWELL, B. & RAY, P. N. 2013. Autosomal recessive hereditary spastic paraplegia-clinical and genetic characteristics of a well-defined cohort. *Neurogenetics*, 14, 181-8.
- ZHAO, X., ALVARADO, D., RAINIER, S., LEMONS, R., HEDERA, P., WEBER, C. H., TUKEL, T., APAK, M., HEIMAN-PATTERSON, T., MING, L., BUI, M. & FINK, J. K. 2001. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*, 29, 326-31.
- ZOLLER, I., MEIXNER, M., HARTMANN, D., BUSSOW, H., MEYER, R., GIESELMANN, V. & ECKHARDT, M. 2008. Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *J Neurosci*, 28, 9741-54.
- ZUCHNER, S., WANG, G., TRAN-VIET, K. N., NANCE, M. A., GASKELL, P. C., VANCE, J. M., ASHLEY-KOCH, A. E. & PERICAK-VANCE, M. A. 2006. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet*, 79, 365-9.

On-line zdroje:

<http://annovar.openbioinformatics.org/>
<http://exac.broadinstitute.org/>
http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
<http://gnomad.broadinstitute.org/>
<http://human-phenotype-ontology.github.io/>
<http://sift.jcvi.org/>
http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
<http://www.internationalgenome.org/>
<http://www.mutationtaster.org/>
<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>
<http://www.uniprot.org/>
<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>
<https://haplopainter.soft112.com/>
<https://portal.biobase-international.com/hgmd/>
<https://software.broadinstitute.org/gatk/>
<https://support.mlpa.com/>
<https://usegalaxy.org/>
<https://www.genecards.org/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
<https://www.omim.org/>
www.sanger.ac.uk/science/tools/exomiser/

Použité referenční sekvence genů:

<i>ALS2</i>	NM_020919.3
<i>ATL1</i>	NM_015915.4
<i>CYP7B1</i>	NM_004820.3
<i>FA2H</i>	NM_024306.4
<i>FARS2</i>	NM_001318872.1
<i>WASHC5</i>	NM_014846.3
<i>KIF5A</i>	NM_004984.2
<i>KLC3</i>	NM_177417.2
<i>NIPA1</i>	NM_144599.4
<i>REEP1</i>	NM_022912.2
<i>SPAST</i>	NM_014946.3
<i>SPG7</i>	NM_003119.3
<i>SPG11</i>	NM_025137.3