

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija Z. Branković

Utvrđivanje genetičke osnove retkih
neurodegenerativnih bolesti analizom kliničkog
egzoma

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija Z. Branković

Determining the genetic basis of rare
neurodegenerative diseases by clinical exome
analysis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

Prof. dr Ivana Novaković
Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Milica Keckarević Marković
Docent Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Dušanka Savić Pavićević
Redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Marina Svetel
Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr sci. Milena Janković
Viši naučni saradnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških oboljenja, Klinike za neurologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, UKCS, pod neposrednim rukovodstvom prof. dr Ivane Novaković.

Zahvaljujem se prof. dr Ivani Novaković na beskrajnom razumevanju i strpljenju, dragocenim savetima u izradi i pisanju teze koja mi je zajedno sa akademikom prof. dr Vladimirom Kostićem pružila jedinstvenu priliku da budem deo vrhunskog dijagnostičkog i istraživačkog tima.

Docentkinji dr Milici Keckarević se neizmerno zahvaljujem na ukazanom poverenju, podršci, savetima i nesebičnoj pomoći u izradi doktorske teze.

Prof. dr Dušanki Savić-Pavićević se zahvaljujem na ukazanoj prilici, podršci, sugestijama i savetima tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Profesorkama doktorkama Marini Svetel i Elki Stefanovoj dugujem zahvalnost na pomoći u pisanju doktorske teze i prenesenom znanju o kliničkim aspektima poremećaja pokreta i kognitivnih poremećaja.

Zahvaljujem se dr Mileni Janković na svakodnevnom podučavanju, kao i dragocenom laboratorijskom i životnom iskustvu.

Dr Valeriji Dobričić se zahvaljujem na безусловnoj pomoći, prijateljstvu i korisnim savetima koji su značajno doprineli kvalitetu doktorske teze.

Istraživačkom timu Kliničkog instituta za medicinsku genetiku Univerzitetskog kliničkog centra Ljubljana se zahvaljujem na prenetom velikom znanju i iskustvu u oblasti medicinske genetike i na entuzijazmu i podršci tokom boravka u njihovoj laboratoriji. Dr Alešu Maveru se posebno zahvaljujem na inspiraciji, neiscrpoj energiji i nesebičnoj pomoći u analizi i interpretaciji rezultata.

Zahvaljujem se kolegici Ani Marjanović na nesebičnoj pomoći i angažovanju u laboratorijskom radu i što smo zajedno, u toku izrade svojih teza, koračale kroz svet neurogenetike i kliničke dijagnostike.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Klinike za neurologiju UKCS, kolegicama sa Instituta za humanu genetiku, kao i iz drugih saradničkih laboratorija, koji su svojim radom i predanošću doprineli izradi ove disertacije.

Hvala bolesnicima i njihovim porodicama na učešću u istraživanju.

Naposletku, najveće hvala mojoj porodici. Najpre hvala mojim roditeljima na ljubavi i podršci u svim aspektima života, pa tako i školovanja. Hvala mojim sestrama Jeleni i Branki i našim malim ljudima Davidu, Magdaleni i Anđeli na motivaciji, ljubavi i sreći kojom me svakodnevno obasipaju. Hvala svim prijateljima na dragocenoj podršci.

Rezime

Neurodegenerativne bolesti se odlikuju varijabilnom kliničkom slikom, vremenom početka bolesti, prognozom i odgovorom na lečenje. Najveći broj ovih oboljenja uključuje motorne i kognitivne poremećaje poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti koje su široko rasprostranjene, do izuzetno retkih poput Krocjfeld-Jakobove bolesti.

Ovom doktorskom tezom istražena je genetička osnova kognitivnih poremećaja i poremećaja pokreta sekvenciranjem panela klinički egzom kod ukupno 57 nesrodnih bolesnika (15 sa kognitivnim poremećajem i 42 sa poremećajem pokreta). Prednost pri selekciji su imali porodični slučajevi sa ranim početkom bolesti ili složenim fenotipom. Sekvenciranje panela vršeno je na Illumina MiSeq platformi prema uputstvu proizvođača. Rezultati sekvenciranja su analizirani dostupnim softverom za analizu i prethodno razvijenim tokom rada (engl. *pipeline*). Interpretacija varijanti zasnovana je na analizi setova gena odabranih prema fenotipu bolesnika, pretraživanju literature i baza podataka, učestalosti alela, *in silico* analizama. Uzročne varijante su potvrđene sekvenciranjem po Sangeru i segregacionim analizama.

Utvrđen je verovatan genetički uzrok kod devet nesrodnih bolesnika (četiri sa kognitivnim poremećajem i pet sa poremećajem pokreta). Detektovano je ukupno 11 patoloških varijanti u sedam gena (*PSEN1*, *OPTN*, *TUBB4A*, *PANK2*, *SETX*, *MFSD8* i *ARSA*) od kojih su devet varijante sa promenjenim smislom (engl. *missense*), jedna varijanta bez smisla (engl. *nonsense*) i jedna varijanta u mestu splajsovanja (engl. *splice site*). Sve detektovane varijante su u genima koji su u skladu sa kliničkim fenotipom datih bolesnika. Pored toga, detektovane varijante u genima *DCTN1*, *PDGFRB* i *POLG* predstavljaju moguć uzrok bolesti kod tri dodatna slučaja sa poremećajem pokreta. Kod ostalih ispitanika genetička osnova bolesti ostaje nerazjašnjena.

Rezultati ove teze ističu značaj analize panela klinički egzom u dijagnostici kognitivnih poremećaja i poremećaja pokreta i daju nam uvid u složenost genetičke pozadine ovih oboljenja.

Ključne reči: motorni poremećaji, kognitivni poremećaji, molekularno genetička dijagnostika, genske varijante, genski paneli

Naučna oblast: Molekularna biologija

Uža naučna oblast: Medicinska genetika

UDK broj:

Abstract

Neurodegenerative diseases are characterized by a variable clinical picture, disease onset, prognosis and response to treatment. The largest number of them includes motor and cognitive disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, which are widespread, to extremely rare ones such as Creutzfeldt-Jakob disease.

Here we analysed the genetic basis of cognitive and movement disorders by sequencing a clinical exome panel that comprise coding regions of 4813 genes with surrounding intronic sequences in 57 unrelated patients (15 with cognitive and 42 with movement disorders). During selection, preference was given to family cases with an early onset of the disease or a complex phenotype. Panel sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform according to the manufacturer's instructions. Results were analyzed with available software and an internal pipeline. The interpretation of variants is based on the analysis of gene sets selected according to the patient's phenotype, literature and database searches, allele frequencies, *in silico* analyses. Causal variants were confirmed by Sanger sequencing, as well as segregation analysis.

A probable genetic cause was determined in nine unrelated patients (four with cognitive and five with movement disorder). We detected nine missense, one nonsense and one splice site pathological variants in seven genes (*PSEN1*, *OPTN*, *TUBB4A*, *PANK2*, *SETX*, *MFSD8*, and *ARSA*) which are in accordance with the clinical phenotype of the given patients. In addition, the detected variants in the *DCTN1*, *PDGFRB*, and *POLG* genes represent a possible cause of movement disorder in three additional cases. The rest of patients remain negative.

The results of this thesis highlight the importance of clinical exome panel analysis in the diagnosis of cognitive and movement disorders and give us an insight into the genetic complexity of these diseases.

Key words: motor impairments, cognitive impairments, molecular genetic diagnostics, gene variants, gene panels

Scientific field: Molecular biology
Scientific subfield: Medical genetics
UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Kognitivni poremećaji	1
1.1.1. Blagi kognitivni poremećaj	2
1.1.2. Teški kognitivni poremećaj.....	2
1.1.2.1. Alchajmerova bolest.....	4
1.1.2.2. Frontotemporalna demencija	5
1.2. Poremećaji pokreta	7
1.2.1. Hipokinetski poremećaji	7
1.2.1.1. Parkinsonova bolest i parkinsonizam	8
1.2.2. Hiperkinetski poremećaji	10
1.2.2.1. Distonija	10
1.2.2.2. Ataksija.....	12
1.2.2.3. Horeja	13
1.3. Specifičnosti i novine u molekularno genetičkoj dijagnostici kognitivnih poremećaja i poremećaja pokreta	15
1.3.1. Dijagnostički genetički testovi.....	15
1.3.1.1. Metode sekvenciranja DNK molekula	16
1.3.1.1.1. Metoda sekvenciranja po Sangeru	16
1.3.1.1.2. Metode nove generacije sekvenciranja	17
1.3.1.1.2.1. Sekvenciranje celog genoma	18
1.3.1.1.2.2. Sekvenciranje celog egzoma	18
1.3.1.1.2.3. Sekvenciranje odabranog seta/panela gena	18
1.3.1.1.3. Treća i četvrta generacija sekvenciranja	20
2. CILJEVI	22
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1. Materijal	23
3.2. Metode	24
3.2.1. Metoda izoljavanja ("salting out") po Mileru	24
3.2.2. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK.....	25
3.2.3. Metoda nove generacije sekvenciranja.....	25

3.2.3.1. Priprema uzoraka i formiranje biblioteke DNK	26
3.2.3.1.1. Određivanje prosečne dužine fragmenata	28
3.2.3.2. Reakcija sekvenciranja nove generacije.....	28
3.2.3.3. Analiza i interpretacija rezultata dobijenih sekvenciranjem	31
3.2.4. Potvrđivanje varijanti detektovanih analizom panela klinički egzom.....	32
3.2.4.1. Umnožavanje odabranih regiona gena – PCR	33
3.2.4.2. Provera kvaliteta i prečišćavanje produkata PCR-a	36
3.2.4.3. Sekvenciranje metodom po Sangeru	37
3.2.4.3.1. Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja.....	37
3.2.4.3.2. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja	38
3.2.4.3.3. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem	38
4. REZULTATI	39
4.1. Demografska i klinička evaluacija ispitanika	39
4.2. Rezultati analize panela klinički egzom	39
4.2.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima	40
4.2.1.1. Patogene i verovatno patogene varijante kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima	40
4.2.1.1.1. Opisi slučajeva sa patogenim i verovatno patogenim varijantama	42
4.2.1.1.1.1. Prikaz bolesnika sa c.416T>C <i>PSENI</i> varijantom	42
4.2.1.1.1.2. Prikaz bolesnika sa c.799C>A <i>PSENI</i> varijantom.....	43
4.2.1.1.1.3. Prikazi bolesnika sa c.403G>T <i>OPTN</i> varijantom	43
4.2.2. Identifikovane varijante i stopa detekcije kod bolesnika sa poremećajima pokreta.....	44
4.2.2.1. Patogene i verovatno patogene varijante kod bolesnika sa poremećajima pokreta.....	44
4.2.2.1.1. Opisi slučajeva sa patogenim i verovatno patogenim varijantama	47
4.2.2.1.1.1. Prikaz bolesnika sa c.1021T>C <i>TUBB4A</i> varijantom	47
4.2.2.1.1.2. Prikaz bolesnika sa c.923A>G i c.754+2T>A <i>MFSD8</i> varijantama	48
4.2.2.1.1.3. Prikaz bolesnika sa c.1583C>T i c.1213T>G <i>PANK2</i> varijantama	48
4.2.2.1.1.4. Prikaz bolesnika sa c.5825T>C <i>SETX</i> varijantom	49
4.2.2.1.1.5. Prikaz bolesnika sa c.542T>G i c.763G>A <i>ARSA</i> varijantama.....	50
4.2.2.2. Varijante nejasnog značaja kod bolesnika sa poremećajima pokreta	50
4.2.2.2.1. Opisi slučajeva sa varijantama nejasnog značaja	50
4.2.2.2.1.1. Prikaz bolesnika sa c.716T>C <i>PDGFB</i> varijantom	50
4.2.2.2.1.2. Prikaz bolesnika sa c.1732G>A <i>DCTNI</i> varijantom	51

4.2.2.2.1.3. Prikaz bolesnika sa c.3151G>C <i>POLG</i> varijantom.....	52
4.2.2.2.2. Analiza parova srodnika.....	53
4.3. Algoritam za genetičko testiranje bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije	54
4.4. Algoritam za bioinformatičku analizu podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom kod bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije	54
5. DISKUSIJA.....	55
5.1. Kognitivni poremećaji	55
5.1.1. Patogene varijante	56
5.2. Poremećaji pokreta	57
5.2.1. Patogene i verovatno patogene varijante.....	58
5.2.2. Varijante nejasnog značaja.....	61
5.2.3. Analiza parova srodnika.....	62
5.3. Algoritam za genetičko testiranje bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije	62
5.4. Algoritam za bioinformatičku analizu podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom kod bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije.....	64
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. LITERATURA.....	66
8. Prilozi.....	93
8.1 Prilog 1- Dozvola Etičkog komiteta Univerzitetskog Kliničkog centra.....	93
Srbije.....	93
8.2 Prilog 2	94

BIOGRAFIJA AUTORA

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Izjava o korišćenju

1. UVOD

Neurodegenerativne bolesti predstavljaju oboljenja nervnog sistema nastala usled degeneracije i/ili smrti nervnih ćelija u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Često se klasifikacija neurodegenerativnih oboljenja zasniva na dominantnoj kliničkoj karakteristici i/ili topografiji dominantne lezije. Shodno tome, neurodegenerativni poremećaji centralnog nervnog sistema (CNS) se mogu prvo grupisati u oboljenja moždane kore, bazalnih ganglija, moždanog stabla i malog mozga ili kičmene moždine. Zatim, unutar svake grupe, određena bolest može biti dalje klasifikovana na osnovu svojih glavnih kliničkih karakteristika (Kovacs 2015; Kovacs 2017).

Ove bolesti se ispoljavaju vrlo varijabilnom kliničkom slikom, a najveći broj uključuje motorne i kognitivne poremećaje. Karakteristične su i razlike u vremenu početka bolesti, prognozi i odgovoru na lečenje (Lee *et al.*, 2014; Schneider *et al.*, 2011).

Neka oboljenja su široko rasprostranjena, kao na primer Alchajmerova bolest (Mayeux and Stern 2012) i Parkinsonova bolest, dok druga spadaju u retke bolesti (ređe od 1 na 2000 stanovnika za Evropsku Uniju) ili izuzetno retke, kao na primer Krocjfeld Jakobova bolest i neurodegeneracija povezana sa pantotenat kinazom (engl. *Pantothenate Kinase Associated Neurodegeneration*, PKAN), koje su primeri izuzetno retkih oboljenja sa incidencom 1 u milion stanovnika (Uttley *et al.*, 2020; Tomić *et al.*, 2015). Genetička osnova neurodegenerativnih oboljenja je takođe vrlo složena i raznolika.

Kod čestih neurodegenerativnih bolesti prevladavaju multifaktorski oblici, koji su rezultat interakcije između genetičkih i sredinskih faktora. Sa druge strane, monogeniski uslovljene forme, kod kojih postoji direktna uzročna veza između promene na nivou jednog gena i fenotipa, pripadaju retkim bolestima. Genetičko testiranje ima za cilj identifikaciju patološke varijante u odgovornom genu, čime se potvrđuje dijagnoza bolesti. Ovde se zapaža lokusna i alelska heterogenost, tj. pojava da različiti geni ili različiti tipovi genskih patoloških varijanti mogu biti u osnovi istog poremećaja. Mnoge alelne varijante gena mogu pokazati nekompletnu penetrabilnost, dok u nekim slučajevima ista patološka genska varijanta može da vodi ka čitavom spektru neuroloških poremećaja, ukazujući na moguće zajedničke molekularne mehanizme. Dodatno, klinička klasifikacija neurodegenerativnih bolesti se ne oslanja na genetičku etiologiju bolesti. Tako, među bolestima, kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest, postoje multifaktorijske i monogenske forme. Monogenske, retke forme mogu biti praćene porodičnom istorijom bolesti, što olakšava postavljanje genetičke dijagnoze. Međutim, zbog smanjene penetrabilnosti uzročnih patoloških varijanti neke retke forme bi bez genetičke dijagnoze pre bile svrstane u multifaktorijske forme. Sve ovo predstavlja izazov za molekularno genetičko testiranje i tumačenje rezultata (Schneider *et al.*, 2011, Abramychcheva *et al.*, 2016).

1.1. Kognitivni poremećaji

Kognitivni poremećaji su kategorija poremećaja mentalnog zdravlja koji prvenstveno utiču na kognitivne sposobnosti, uključujući učenje, pamćenje, percepciju i rešavanje problema. Definisani su deficitima kognitivnih sposobnosti koji su stečeni (za razliku od razvojnih deficita). Definisano je šest ključnih domena kognitivne funkcije: izvršna funkcija, učenje i pamćenje, perceptivno-motorička funkcija, jezik, složena pažnja i socijalna kognicija. Kognitivni poremećaji uključuju delirijum, blagi i teški kognitivni poremećaj (poznat kao demencija) (Sachs-Ericsson and Blazer 2015).

Delirijum (bunilo) je poremećaj koji se manifestuje konfuzijom, uzbuđenjem, dezorijentacijom i zamućenjem svesti. Takođe su česte i halucinacije, iluzije, promena pažnje, promena raspoloženja, nasilno i neobično ponašanje, a neki pojedinci mogu doživeti i akutnu promenu svesti. Obično traje od minut do nekoliko sati, a ponekad i dana, najviše do nekoliko nedelja (Guerrero and Piasecki 2008; Torpy 2008).

Blagi i teški kognitivni poremećaji obično se opisuju kod starijih osoba, ali nisu ograničeni na njih. Za razliku od delirijuma, ovi poremećaji se razvijaju sporo i karakteriše ih gubitak pamćenja. Pored gubitka pamćenja i kognitivnog oštećenja, drugi simptomi uključuju afaziju, apraksiju, agnoziju, gubitak apstraktne misli, promene u ponašanju/ličnosti i poremećaj u rasuđivanju. Takođe mogu biti poremećaji u ponašanju koji uključuju psihozu, promene raspoloženja i uznemirenost. Blagi i teški kognitivni poremećaji razlikuju se na osnovu težine njihovih simptoma. Blagi kognitivni poremećaj karakteriše umereni kognitivni pad, dok je teški okarakterisan značajnim kognitivnim padom.

1.1.1. Blagi kognitivni poremećaj

Blagi kognitivni poremećaj (BKP) se smatra prelaznim periodom između normalnog starosnog kognitivnog pada i demencije (Anderson 2019). BKP koji primarno utiče na kratkoročno pamćenje je označen kao amnestički BKP, dok su posledice neamnestičkog BKP-a za sada nedovoljno poznate (Nicolini *et al.*, 2020). Prema nedavnim istraživanjima, prevalencija BKP-a među starijim ljudima u Kini je 15,5% (Jia *et al.*, 2020), 13,11% u Grčkoj (Vlachos *et al.*, 2020) i 26,06% u Južnoj Indiji (Mohan *et al.*, 2019). Pored toga, prijavljeno je da 6-15% bolesnika sa BKP-om godišnje razvije Alchajmerovu bolest (Petersen *et al.*, 2001).

BKP se najčešće karakteriše problemima sa pamćenjem, govorom, razmišljanjem i prosuđivanjem. Nije poznat uzrok nastanka BKP-a, mada se smatra da su najveći faktori rizika starost (Plassman *et al.*, 2008), kao i dijabetes, hipertenzija, nedostatak vitamina D. Od genetičkih faktora, najznačajnijim faktorom predispozicije BKP-a se smatra prisustvo apolipoprotein E4 alela (*APOE4*) (Elias-Sonnenschein *et al.*, 2011). S obzirom na visoku stopu konverzije BKP-a u Alchajmerovu bolest, veoma je značajno posvetiti pažnju njegovoj dijagnozi i lečenju.

1.1.2. Teški kognitivni poremećaj

Teški kognitivni poremećaj ili demencija se definiše kao sindrom stečenog i progresivnog poremećaja kognitivnih i/ili bihevioralnih funkcija sa deficitom u najmanje dva od sledećih domena: 1) pamćenje, 2) jezik, 3) vidnoprstorne sposobnosti, 4) ličnost i ponašanje i 5) druge kognitivne sposobnosti (apstraktno mišljenje, računanje, prosuđivanje, planiranje). Ključno je da kognitivne promene moraju biti dovoljno izražene da remete socijalni i profesionalni život bolesnika (American Psychiatric Association, 2013).

Iako anksiozni poremećaji, poremećaji raspoloženja i psihotični poremećaji takođe mogu imati efekta na kognitivne i memorijske funkcije, oni se ne ubrajaju u kognitivne poremećaje, jer gubitak kognitivne funkcije nije primarni (uzročni) simptom (Guerrero and Piasecki 2008).

Najčešći podtipovi demencije su Alchajmerova bolest (AB), vaskularna demencija (VaD), demencija sa Levijevim telima (DLT), frontotemporalna demencija (FTD) i demencija u Parkinsonovoj bolesti. Ovi podtipovi demencije čine skoro 99% svih sindroma demencije sa neurološkom etiologijom.

Procene zastupljenosti navedenih podtipova demencije znatno variraju u studijama. Kao najčešći uzrok demencije navodi se AB (oko 55% slučajeva), sledi je VaD (~15% slučajeva) (Lobo *et al.*, 2000), zatim DLT u 3-10% slučajeva (Sonnen *et al.*, 2007; Matthews *et al.*, 2009).

Ispitivanja u okviru demencije obuhvataju detaljnu analizu istorije bolesti sa uzimanjem podataka o porodičnoj anamnezi, potom fizikalni i neurološki pregled, neuropsihološko testiranje određenim baterijama testova, procenu psihijatrijskih i bihevioralnih simptoma, procenu funkcionalnosti, magnetnu rezonancu mozga, pozitronsku emisiju tomografiju (engl. *Positron Emission Tomography*, PET skener), analizu cerebrospinalne tečnosti na prisustvo određenih biomarkera demencije, biohemijske analize krvi. Značajan udeo u dijagnostici demencija ima i genetičko testiranje (McKhann *et al.*, 2011).

Zajednička patološka karakteristika demencija jeste prisustvo nakupina pogrešno savijenih proteina u vanćelijskom matriksu mozga ili unutar nervnih ćelija, što demencije svrstava u proteinopatije. Dakle, neuropatološki, demencije karakteriše gubitak neurona u određenim regijama mozga, nakupine hiperfosforilisanog tau proteina, tzv. neurofibrilarna klubad i naslage beta amiloida, odnosno senilnih plaka (Khachaturian 1985; Savva *et al.*, 2009, Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

Demencija može biti ranog i kasnog početka. Demencija ranog početka se karakteriše pojavom simptoma pre 65 godine života (Rossor *et al.*, 2010), dok demencija kasnog početka nastaje posle 65 godine života. Navedena granica je arbitrarna, zasnovana na sociološkom aspektu i nema biološki značaj (Sá *et al.*, 2012). Uprkos zajedničkim neuropatološkim oznakama, opisane su brojne razlike između demencije ranog i kasnog početka koje obuhvataju osim razlike u godinama početka bolesti, različit stepen progresije bolesti (Rogaeva 2002), stepen atrofije sive mase (Ishii *et al.*, 2005), a od genetičkih faktora učestalost alela *APOE4* (van der Flier *et al.*, 2011). Demencija ranog početka se u odnosu na demenciju kasnog početka češće prezentuje atipičnim simptomima poput depresije, promena u ponašanju, psihotičnim simptomima, dok se poremećaj pamćenja može javiti tek u odmaklom stadijumu bolesti (Mendez 2006).

Iako je poznat veliki broj genetičkih faktora koji dovode do nastanka demencije, najčvršći genetički uzroci demencije su identifikovani kod onih slučajeva koji imaju mendelovski obrazac nasleđivanja, kao i kod slučajeva sa ranim početkom bolesti, te pozitivnom porodičnom istorijom bolesti (Bonvicini *et al.*, 2019; Cochran *et al.*, 2019). Nedavne studije su, takođe, pokazale da raniji početak bolesti (ispod 65 godina) kao i porodična istorija povećavaju značajno šansu za detektovanjem genske patološke promene. Pokazano je da kod bolesnika sa početkom demencije između 20 i 64 godine života postoji 15-20% verovatnoće da se detektuje genska patološka promena (Koriath *et al.*, 2020). Ova stopa opada kada bolest počne posle 65. godine života (Koriath *et al.*, 2020). Pozitivna porodična anamneza (sa 3 i više aficiranih članova porodice u dve generacije povezane preko srodnika iz prvog kolena) povezana je sa 45% šanse nalaženja patološke varijante (Goldman *et al.*, 2005; Rohrer *et al.*, 2009). Nalaženje genetičkog uzroka kod takvih slučajeva omogućava uspešno postavljanje dijagnoze, informisanje o riziku za druge članove porodice kao i otvaranje mogućnosti za određena terapijska ispitivanja kod selektovanih slučajeva.

Trenutno ne postoji lek za kognitivne poremećaje i bolesti koje ih uzrokuju. Dostupni su antidepresivi, antipsihotici i drugi lekovi koji mogu pomoći u ublažavanju simptoma bolesti. Stalna psihoterapija i psihosocijalna pomoć i podrška bolesnicima i porodicama obično su neophodni za jasno razumevanje i pravilno upravljanje poremećajima i za održavanje boljeg kvaliteta života svih uključenih (Ullrich *et al.*, 2014).

1.1.2.1. Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest predstavlja glavni uzrok demencije (Prince *et al.*, 2013, Lobo *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2013). Karakteriše se progresivnim padom kognicije i obično počinje poremećajem kratkoročnog pamćenja (amnestička forma AB), ali neizbežno utiče na sve intelektualne funkcije, što dovodi do nesposobnosti samostalnog obavljanja svakodnevnih funkcija i na kraju preveremene smrti (Apostolova 2016). Poremećaj pamćenja je dugo smatran preduslovom za postavljanje dijagnoze AB, međutim sve je više studija koje opisuju atipične i neamnestičke prezentacije na početku ove bolesti. Prema kriterijumima Nacionalnog instituta za starenje i Asocijacije za Alchajmerovu bolest (engl. *National Institute on Aging – Alzheimer's Association*, NIA-AA) Sjedinjenih Američkih Država (McKhann *et al.*, 2011), definisani su neamnestički sindromi AB prema kognitivnom poremećaju koji dominira na početku bolesti: 1) vizuoprostorni (posteriorna kortikalna atrofiya), 2) jezički (logopenička afazija) i 3) egzekutivni/bihejvioralni (frontalna varijanta AB). Neamnestički sindromi se češće sreću kod AB ranog početka (u 22-64% slučajeva) u odnosu na AB kasnog početka (6-12% slučajeva) sa posteriornom kortikalnom atrofijom i logopeničkom afazijom kao najčešćim neamnestičkim sindromima rane AB (Stopford *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2011).

U nedavno objavljenoj metaanalizi globalne učestalosti rane demencije (Hendriks *et al.*, 2021) procenjeno je da u svetu 119 od 100000 osoba u starosnoj dobi od 30 do 64 godine života boluje od neke forme rane demencije. Dakle, trenutno u svetu od demencije ranog početka boluje 3,9 miliona ljudi (Hendriks *et al.*, 2021). S druge strane, oko 45 miliona ljudi širom sveta boluje od demencije kasnog početka (GBD 2016 Dementia Collaborators, 2019).

Što se tiče AB, kao najčešće forme rane demencije, rezultati brojnih studija pokazuju da je učestalost procenjena na 41,1 na 100000 osoba u svetu (Kvello-Alme *et al.*, 2019).

U osnovi nastanka AB postoji čitav spektar faktora koji obuhvata godine života, genetičke faktore, faktore spoljašnje sredine, a koji se smatraju glavnim faktorima za razvoj AB. Brojni faktori su povezani sa povećanim rizikom od nastanka AB, među kojima kardiovaskularne bolesti čine većinu. U faktore rizika se ubrajaju i dijabetes, hipertenzija, gojaznost, dislipidemija (Barba *et al.* 2000; Razay and Vreugdenhil 2005).

Kod kasne forme AB (tzv. sporadične forme sa početkom bolesti posle 65 godine života), koja je zastupljena kod 95% slučajeva, pretpostavlja se da su za nastanak bolesti odgovorni genetičke komponente i faktori spoljašnje sredine i to u odnosu 70:30 (Dorszewska *et al.*, 2016). Najpoznatiji genetički faktor rizika za nastanak sporadične forme AB je polimorfizam u genu *APOE*. Postoje tri alela gena *APOE*: *APOE2*, *APOE3* i *APOE4*, pri čemu prisustvo jednog *E4* alela povećava rizik za razvoj AB tri puta, a prisustvo dva alela *E4* čak 12 puta. Protein *APOE* oslobođen iz glijalnih ćelija stimuliše proizvodnju β -amiloida, gde *APOE4*, u odnosu na druge dve forme proteina *APOE*, jače stimuliše njegovu proizvodnju (Huang *et al.*, 2017). Studije asocijacije na čitavom genomu (engl. *Genome Wide Association Studies*, GWAS) su identifikovale dodatne gene povezane sa rizikom za nastanak AB (*ABCA7*, *BINI*, *CD2AP*, *CD33*, *CLU*, *CRI*, *EPHA1*, *MS4A6A*, *MS4A6E* i *PICALM*) (Jun *et al.*, 2010; Hollingworth *et al.*, 2011).

Kod slučajeva sa ranim početkom AB, smatra se da je uzrok bolesti uglavnom genetičke prirode, iako nemaju svi bolesnici pozitivnu porodičnu istoriju bolesti. Danas je poznato više od 450 uzročnih varijanti u tri gena koji su u osnovi familijarne AB i koje pokazuju autozomno dominantan način nasleđivanja sa skoro 100% penetrabilnošću, koja pozitivno koreliše sa povećanjem godina života (<https://www.alzforum.org/mutations>; Xiao *et al.*, 2021).

Prve uzročne varijante otkrivene su u genu *APP* (amiloidni prekursorski protein), potom u genima *PSEN1* (presenilin 1) i *PSEN2* (presenilin 2). Patološke varijante u genu *PSEN1* čine oko 80% autozomno dominantnih slučajeva. Oko 15% autozomno dominantnih slučajeva su uzrokovane

patološkim varijantama u genu *APP* (Hinz and Geschwind 2017), dok su u genu *PSEN2* poprilično retke i odgovorne za oko 5% slučajeva.

Sva tri gena kodiraju istoimene proteine. APP je transmembranski protein kojeg iseca α -sekretaza pri čemu nastaju nepatološki solubilni fragmenti (Sisodia 1992). Dodatno, vanćelijski deo APP proteina može biti isečen β -sekretazom (Vassar *et al.*, 1999), a preostali, transmembranski/unutarćelijski deo APP proteina biva isečen γ -sekretazom. Presenilin 1 i presenilin 2 proteini su u sastavu katalitičke komponente γ -sekretaze (De Strooper *et al.*, 2012). Smatra se da su patološke varijante gena *APP*, *PSEN1* i *PSEN2* odgovorne za povećano stvaranje β -amiloida i to patološke forme A β 42, pri čemu dolazi do taloženja senilnih plaka. Ipak, patološke varijante u ova tri gena mogu objasniti tek 1-5% svih slučajeva AB ranog početka. Naime, 25-40% bolesnika sa AB ranog početka ima familijarnu formu bolesti (bar jednog obolelog srodnika), pri čemu od toga 5-15% pripada porodicama sa autozomno dominantnim načinom nasleđivanja od kojih samo jedan deo (11%) u osnovi ima patološke varijante u navedenim genima (Karch and Goate 2015).

Kod autozomno dominantne AB sa ranim početkom i porodičnom istorijom najčešće se prvo bolesnici ciljano testiraju na prisustvo patoloških varijanti u genu *PSEN1*, onda se testira gen *APP* i potom *PSEN2*, prema zastupljenosti patoloških varijanti, odnosno verovatnoći detektovanja genetičkog uzroka. Takođe se sprovodi i testiranje polimorfizma gena *APOE*. Ukoliko se u ovim genima ne detektuju varijante od značaja za bolest datog ispitanika, testiraju se geni koji su u osnovi FTD-a (Goldman and van Deerlen 2018). Ukoliko je i taj test negativan, pristupa se analizi proširenog panela gena. U nekim laboratorijama praksa je da se u prvom koraku uradi proširena analiza većeg broja gena (Zalar *et al.*, 2018).

1.1.2.2. Frontotemporalna demencija

Posle Alchajmerove bolesti FTD je drugi najčešći uzrok demencije sa ranim početkom (Ratnavalli *et al.*, 2002; Rosso *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2003, Arvanitakis 2010). Opisana su tri klinička sindroma FTD-a: 1) bihevioralna varijanta FTD-a (bvFTD) koja je najčešća i karakteriše se prominentnim poremećajem ponašanja, apatijom, gubitkom empatije, stereotipnim ili kompulzivnim ponašanjem, promenama u ishrani. Na radiološkim snimcima mozga uočava se frontalna i/ili anteriorna temporalna atrofija (Pick 1892; Rascovsky *et al.*, 2011); 2) nefluentna-agramatička varijanta primarne progresivne afazije (nfvPPA) koja se karakteriše agramatizacijom i deficitom motornog govora sa levom unutrašnjom frontalnom i insularnom atrofijom (Josephs *et al.*, 2006; Ogar *et al.*, 2007; Grossman 2012) i 3) semantička varijanta primarne progresivne afazije (svPPA) koja se karakteriše gubitkom poznavanja objekata i reči sa obostranom anteriornom temporalnom atrofijom (Hodges *et al.*, 1992).

Učestalost FTD u svetskoj populaciji procenjena je na 2,3 na 100000 osoba starosti od 30 do 64 godine (Kvella Alme *et al.*, 2019).

Većina slučajeva sa FTD je sporadično, dok je oko 30% bolesnika sa porodičnom istorijom neuroloških simptoma poput demencije, psihijatrijskih ili motornih simptoma. Kod 13,4% slučajeva sa FTD prisutno je autozomno dominantno nasleđivanje, pri čemu je kod polovine ovih slučajeva dokazana patološka genetička varijanta. Većina genetički dokazanih slučajeva FTD uzrokovana je patološkim varijantama u tri gena: *C9ORF72*, *MAPT* ili *GRN* (Greaves and Rohrer 2019; Mahoney *et al.*, 2012; Snowden *et al.*, 2012). Smatra se da su patološke varijante u genu *C9ORF72* najčešći genetički uzrok FTD-a u svetu, sledi za njim gen *GRN* i *MAPT* naposljetku (Borroni *et al.*, 2011; Barandiaran *et al.*, 2012). Patološke varijante su ekspanzije heksanukleotidnih (GGGGCC, tj. G₄C₂) ponovaka u intronu gena *C9ORF72* koji kodira istoimeni protein sa ulogom sintezi RNK, proteina i transportu RNK unutar ćelije. Poznato je da haploinsuficijencija *C9ORF72* ima ulogu u

neurodegeneraciji (Shi *et al.*, 2018), a sve je više dokaza i o sticanju nove uloge mutiranog alela, putem toksičnosti RNK molekula prepisanih sa gena *C9ORF72* koji sadrže ekspanzovane sekvence. Ekspanzije gena *C9ORF72* kodiraju pet različitih dipeptidnih proteinskih ponovaka (engl. *Dipeptide Repeat Proteins*, DPRs) koji nastaju nekanonskom sintezom proteina (engl. *Repeat-associated non-AUG translation*) i za koje je takođe pokazano da imaju ulogu u neurodegeneraciji (Freibaum and Taylor 2017). Ne samo da su ekspanzije u genu *C9ORF72* odgovorne za oko 30% familijarnih FTD, nego i za do 50% familijarnih slučajeva amiotrofične lateralne skleroze (ALS) i za oko 88% slučajeva sa simptomima i FTD-a i ALS-a (Cruts *et al.*, 2013). *C9ORF72* ekspanzije čine osnovu i kod oko 6% sporadičnih FTD (Cooper-Knock *et al.*, 2014). Patološke varijante u genu *GRN* čine oko četvrtinu autozomno dominantnih FTD i do 5% očiglednih sporadičnih slučajeva (Hinz and Geschwind 2017). Protein progranulin je kodiran genom *GRN* i učestvuje u regulaciji rasta, deobe i preživljavanja ćelija kože, imunog sistema i određenih ćelija mozga. Takođe ima ulogu u ranom embrionskom razvoju, zarastanju rana i inflamaciji. Što se tiče njegove aktivnosti u ćelijama mozga, smatra se da ima ulogu u preživljavanju neurona. *MAPT* čini osnovu 10–20% autozomno dominantnih slučajeva, zavisno od populacije, sa preko 40 različitih poznatih patogenih varijanti, najvećim delom detektovanih u egzonomima 1 i 9–13. Gen *MAPT* sadrži informacije za sintezu proteina tau. Uloga tau proteina ogleda se u formiranju i stabilizaciji mikrotubula, vlakana koje održavaju oblik ćelije, učestvuju u ćelijskoj deobi i ćelijskom transportu.

Bihevioralna forma FTD-a je najčešće uzokovana patološkim varijantama u genu *MAPT*. Za ovaj gen su karakteristični i početak bolesti između 45 i 65 godine života (Olszewska *et al.*, 2016), kao i parkinsonizam, okulomotorna disfunkcija, progresivna supranuklearna pareza (Benussi *et al.*, 2015). Kod bolesnika sa patološkim varijantama u genu *GRN* prisutni su jezički poremećaj i psihijatrijske manifestacije. Kada su u pitanju nosioci varijanti u genu *C9ORF72* njihova klinička prezentacija se karakteriše uglavnom FTDbv, kao i bolesti motornog neurona (BMN).

Uzročne varijante u brojnim drugim genima su asocirane sa FTD, mada u retkim slučajevima (Sieben *et al.*, 2012). Sveukupno, približno 5% patoloških varijanti se detektuju i u genima kao što su *VCP* (Watts *et al.*, 2004), *CHMP2B* (Skibinski *et al.*, 2005), *TARDP*, *FUS* (Yan *et al.*, 2010), *ITM2B* (Vidal *et al.*, 1999), *TBKI* (Pottier *et al.*, 2015), *TBP* (Stevanin and Brice 2008), *SQSTM1* (Le Ber *et al.*, 2013), *OPTN* (Maruyama *et al.*, 2010), *UBQLN* (Deng *et al.*, 2011).

Poslednjih godina, kliničke, patološke i genetičke studije su podupirale činjenicu da su FTD i ALS deo spektra bolesti sa zajedničkom patogeneozom (Bennion-Callister and Pickering-Brown 2014; Hardy and Rogaeva 2014). Patološke varijante u genima povezanim sa nastankom ALS-a mogu se kod bolesnika manifestovati kao FTD, ponekad i u istoj porodici ili čak kod istog bolesnika (ALS/FTD komorbidnost) (Freischmidt *et al.*, 2015; Dols-Icardo *et al.*, 2018; Pottier *et al.*, 2018). Približno 15% FTD bolesnika razvije BMN, i obrnuto, do 50% BMN bolesnika pokazuje ili direktne znake kognitivnog poremećaja (Cruts *et al.*, 2013) ili blage poremećaje u izvršnoj funkciji (Lomen-Hoerth *et al.*, 2003; Ringholz *et al.*, 2005).

Kada se pristupa genetičkom testiranju kod bolesnika sa FTD-om, najčešće se prvo uradi testiranje gena *C9ORF72* na prisustvo G₄C₂ ekspanzija, posebno kod ispitanika sa bvFTD-a. Kada se kod bolesnika uoče simetrične promene na frontalnim i temporalnim režnjevima, oni se takođe testiraju prvo na prisustvo patoloških varijanti u genu *C9ORF72*. Kada postoji porodična istorija atipičnog parkinsonizma koji koegzistira sa bihevioralnom varijantom u ranom početku bolesti, treba uraditi sekvenciranje gena *MAPT*. U slučajevima kada postoji porodična istorija kod srodnika iz prvog kolena asocirana sa nefluentnom varijantom ili primarnom progresivnom afazijom i asimetričnom atrofijom mozga preporučuje se skrining na *GRN* patološke varijante. Bilo koji mišićno skeletni simptom asociran sa kasnim razvojem bihevioralnog poremećaja ukazuje na varijante u genu *VCP*. Kod bolesnika sa FTD-om, ataksijom i cerebelarnom atrofijom treba da se testira *SCA17* (Olszewska *et al.*, 2016). Kao i kod AB-a i u ovom primeru sprovodi se genetičko testiranje najpre gena u kojima se

najčešće detektuju patološke varijante. U zavisnosti od vrste patološke varijante metoda izbora je različita. Nakon negativnog testa na *C9ORF72* ekspanzije, može se uraditi prošireniji genski panel u cilju otkrivanja genetičkog uzroka kod ovih bolesnika.

1.2. Poremećaji pokreta

Poremećaji pokreta su neurološka stanja koja utiču na brzinu, fluentnost, kvalitet i lakoću pokreta. Može postojati ili višak pokreta ili nedostatak voljnih i automatskih pokreta, nevezano za slabost ili spastičnost (Fahn 2011). Poremećaji pokreta obuhvataju širok raspon stanja koja se karakterišu: 1) poremećajima voljnih pokreta sa smanjenom amplitudom pokreta (ili hipokinezije), mada su termini bradikinezija (usporenost pokreta) i akinezija (odsustvo pokreta) takođe u upotrebi ili 2) postojanjem neodgovarajućih, nevoljnih pokreta (diskinezija) (Fahn 2011; Fahn *et al.*, 2011). Hipokinetski sindrom podrazumeva siromaštvo spontane motorike i primer je Parkinsonova bolest i parkinsonizam (Fahn 2011; Fahn *et al.*, 2011). Hiperkinetski sindrom u kliničkom smislu se izjednačava sa nevoljnim pokretima (diskinezijama). U hiperkinetske sindrome spadaju: horeja, balizam, atetoza, distonija, ataksija, tremor, tikovi, stereotipije (Fahn 2011; Fahn *et al.*, 2011). Poremećaji pokreta mogu biti primarni i sekundarni. Kod primarnih poremećaja pokreta, abnormalno kretanje je primarna manifestacija poremećaja. U sekundarnim poremećajima pokreta, abnormalno kretanje je manifestacija drugog sistemskog ili neurološkog poremećaja.

Učestalost poremećaja pokreta procenjena je na 28% kada su rađena istraživanja u grupi osoba od 50-89 godina starosti. Učestalost tremora je bila 14,5%, zatim sindroma nemirnih nogu 10,8%, parkinsonizma 7%, primarne i sekundarne distonije 1,8% i horeje i tika <1% svaki (Wenning *et al.*, 2005). U nedavno objavljenoj metaanalizi koja je obuhvatila oko 5000 osoba sa kliničkom prezentacijom poremećaja pokreta, tremora i slabosti, prosečne godine početka simptoma su bile 39,6 godina, poremećaj pokreta sa tremorom i slabosti je imalo 23,1% ispitanika, samo tremor 21,6%, a slabost 18,1% ispitanika (Lidstone *et al.*, 2022).

Prilikom postavljanja dijagnoze poremećaja pokreta najpre se obavi kompletan neurološki pregled od strane lekara specijaliste neurologije. Tom prilikom, uzima se i porodična anamneza, takođe se opserviraju i neneurološki znakovi bolesti koji se mogu manifestovati na koži ili u očima bolesnika, što doprinosi preciznosti u postavljanju dijagnoze (Abdo *et al.*, 2010). U daljem ispitivanju uključuju se biohemijske analize krvi, radiološke analize, analize krvne slike i genetički testovi.

Poremećaji pokreta imaju veoma kompleksnu etiopatogenezu sa bitnom ulogom genetičkih faktora. Tako je poznato oko 15 glavnih gena uzročnika monogenske forme Parkinsonove bolesti i parkinsonizma (Puschmann 2017), dok je ukupno 111 gena koji se povezuju sa ovim bolestima (Köhler *et al.*, 2021). S druge strane, poremećaji pokreta kao što su distonija, horeja i ataksija u svojoj osnovi imaju retke jasne monogenske faktore (Balint *et al.*, 2018; Termsarasab 2019; Mundwiler and Shakkottai 2018; Beaudin *et al.*, 2019). Do sada je prema podacima iz HPO baze podataka (engl. *Human Phenotype Ontology*, HPO) (<https://hpo.jax.org/app/>) sa distonijom povezano 490 gena, sa horejom 256, dok je sa ataksijom povezano čak 886 gena (Köhler *et al.*, 2021).

1.2.1. Hipokinetski poremećaji

Hipokinetski poremećaji pokreta se karakterišu delimičnim ili potpunim gubitkom mišićnog pokreta. Najčešći uzrok hipokinezije je Parkinsonova bolest (PB) i stanja povezana sa PB. Pored toga,

u hipokinetske poremećaje spadaju i apraksija, katatonija, katapleksija, fenomen zamrzavanja i drugi (Fahn 2011).

1.2.1.1. Parkinsonova bolest i parkinsonizam

Parkinsonova bolest je drugo najučestalije neurodegenerativno oboljenje odmah posle AB (de Lau and Breteler 2006). Klinički se manifestuje sindromom parkinsonizma i nemotornim simptomima. Parkinsonizam se karakteriše bradikinezijom, ukočenošću, tremorom u stanju mirovanja i posturalnom nestabilnošću. Dodatno, opisani su i atipični parkinsonizmi koji se još nazivaju i Parkinson plus sindromi i uključuju multiplu sistemsku atrofiju (MSA) (Quinn 1989), demenciju sa Levijevim telima (DLT) (McKeith *et al.*, 2005), progresivnu supranuklearnu paralizu (PSP) (Litvan *et al.*, 1996) i kortikobazalni sindrom (KBS) (Armstrong *et al.*, 2013). Što se tiče nemotornih simptoma karakterističnih za PB, to su najčešće kognitivni pad (Lees and Smith 1983), depresija (Cummings 1992), anksioznost, poremećaj spavanja (Tandberg *et al.*, 1998).

Sa patohistološke strane, PB se karakteriše gubitkom dopamnergičkih neurona kompaktnog dela crne supstance (*substantia nigra pars compacta*) i prisustvom citoplazmičnih i aksonalnih nakupina proteina α -sinukleina (kodiranog genom *SNCA*) koja su globularna i nazivaju se Levijevim telima (Spillantini *et al.*, 1997).

Godišnje od PB oboli između 5 i 35 osoba na 100000 širom sveta, a incidenca raste 5 do 10 puta između šeste i devete decenije života. Retko je da se simptomi jave pre 50 godine života. Muškarci obolevaju dva puta češće u odnosu na žene, a u faktore rizika za nastanak PB spadaju genetičke varijante, stil života, određeni faktori sredine, kao što su konzumiranje cigareta ili nekonzumiranje kafe (Shahi and Moochhala 1991; Ross and Petrovitch 2001).

Kao što je već rečeno, većina PB slučajeva su sporadične forme bez porodične istorije bolesti. Međutim, opisani su i genetički uzroci ove bolesti. Poznato je da su patološke varijante u sedam gena asocirane sa autozomno dominantnom (*SNCA*, *LRRK2*, *EIF4G1*, *VPS35*) i autozomno recesivnom (*PARK2*, *PINK1*, *DJI*) Parkinsonovom bolesti ili parkinsonizmom. Promene u drugim genima su takođe asocirane sa ovom bolesti, kao što su geni u osnovi hereditarnih ataksija (*ATXN2*, *ATXN3*, *FMRI*), frontotemporalne demencije (*C9orf72*, *GRN*, *MAPT*, *TARDBP*), distonije tipa 5 (*GCH1*, *TH*, *SPR*) i drugi (*ATP13A2*, *CSF1R*, *DNAJC6*, *FBXO*, *GIGYF2*, *HTRA2*, *PLA2G6*, *SPG11*, *UCHL1*). Detaljnije o genima uzročnicima PB dato je u tabeli 1.1.

Heterozigotne mutacije u genu *GBA* su važan faktor rizika za nastanak PB-a i DLT (Neudorfer *et al.*, 1996).

Tabela 1.1: Lista gena povezanih sa naslednim parkinsonizmom. Modifikovano prema Cherian and Divya 2020.

Gen	Forma bolesti	Fenotip	Nasledivanje	Reference
<i>SNCA</i>	PARK1	Parkinsonizam	AD	Golbe <i>et al.</i> , 1990
<i>LRRK2</i>	PARK8	Parkinsonizam	AD	Paisán-Ruiz <i>et al.</i> , 2004
<i>VPS35</i>	PARK17	Parkinsonizam	AD	Vilariño-Güell <i>et al.</i> , 2011
<i>PARKIN</i>	PARK2	Parkinsonizam ranog početka, distonija	AR	Kitada <i>et al.</i> , 1998
<i>PINK1</i>	PARK6	Parkinsonizam ranog početka, distonija	AR	Valente <i>et al.</i> , 2004
<i>DJ1</i>	PARK7	Parkinsonizam ranog početka, distonija	AR	van Duijn <i>et al.</i> , 2001
<i>ATP13A2</i>	PARK9/Kufor Rakeb syndrome	Parkinsonizam, distonija, demencija	AR	Ramirez <i>et al.</i> , 2006
<i>PLA2G6</i>	PLAN	Distonija, parkinsonizam, kognitivni pad	AR	Paisan-Ruiz <i>et al.</i> , 2009
<i>FBX07</i>	PARK15	Rani početak parkinsonizma sa piramidalnim znacima	AR	Shojaee <i>et al.</i> , 2008
<i>DNAJC6</i>	PARK19	Parkinsonizam, mentalna retardacija	AR	Edvardson <i>et al.</i> , 2012
<i>SYNJ12</i>	PARK20	Parkinsonizam, napadi	AR	Krebs <i>et al.</i> , 2013; Quadri <i>et al.</i> , 2013
<i>ATP1A3</i>	DYT12	Distonija parkinsonizam	AD	de Carvalho Aguiar <i>et al.</i> , 2004
<i>TAF1</i>	DYT3	Distonija parkinsonizam	X vezano	Makino <i>et al.</i> , 2007
<i>GCH1</i>	DYT5a	Distonija parkinsonizam	AD, AR	Ichinose <i>et al.</i> , 1994
<i>TH</i>	DYT5b	Distonija parkinsonizam	AR	Lüdecke <i>et al.</i> , 1995
<i>WDR45</i>	BPAN	Zaostanak u razvoju, parkinsonizam	X vezano	Haack <i>et al.</i> , 2012
<i>CP</i>	Aceruloplazminemija	Horeja, parkinsonizam	AR	Harris <i>et al.</i> , 1995
<i>GBA</i>	Gošeova bolest	Parkinsonizam ranog početka	AR	Tsuji <i>et al.</i> , 1987
<i>ATXN2</i>	SCA2	Ataksija, parkinsonizam	AD	Pulst <i>et al.</i> , 1996
<i>KIAA1840</i>	SPG11	HSP, parkinsonizam	AR	Stevanin <i>et al.</i> , 2007
<i>ZFYVE26</i>	SPG15	HSP, parkinsonizam	AR	Hanein <i>et al.</i> , 2008
<i>FTL</i>	Neuroferitinopatija	Horeja, parkinsonizam	AD	Curtis <i>et al.</i> , 2001
<i>FA2H</i>	FAHN	HSP, parkinsonizam, ataksija	AR	Edvardson <i>et al.</i> , 2008
<i>PANK2</i>	PKAN	Horeja, parkinsonizam, psihijatrijski poremećaji	AR	Zhou <i>et al.</i> , 2001
<i>C19ORF12</i>	MPAN	Distonija, parkinsonizam	AR	Hogarth <i>et al.</i> , 2013

AD-autozomno dominantno; AR-autozomno recesivno; PLAN-*PLA2G6* asocirana neurodegeneracija; BPAN-beta *propeller* protein asocirana neurodegeneracija; SCA2-spinocerebelarna ataksija tip2; SPG-spastična paraplegija; HSP-hereditarna spastična parapareza; FAHN-neurodegeneracija asocirana sa hidroksilazom masnih kiselina; PKAN-neurodegeneracija povezana sa pantothenat kinazom; MPAN-neurodegeneracija asocirana sa proteinom mitohondrijske membrane.

1.2.2. Hiperkinetski poremećaji

Hiperkinetski poremećaji pokreta ili diskinezije, predstavljaju heterogenu grupu nevoljnih pokreta od kojih su najznačajniji tremor, distonije, ataksije, horeja, mioklonus i tikovi, a karakterišu ih hiperaktivni, nevoljni i nekontrolisani pokreti. Osim njih u ovu grupu se ubrajaju i balizam, atetoze i stereotipije (Fahn 2011). Mogu se manifestovati kao pojedinačni klinički entiteti ili kao znaci drugih neuroloških poremećaja. Takođe, mnoge od bolesti iz ove grupe još nemaju definisane uslovljavajuće etilološke faktore i identifikuju se kao idiopatske. Etiološke studije pokazale su da njihovom nastanku doprinose genetičke abnormalnosti, neurodegenerativne bolesti, autoimuni i metabolički poremećaji, strukturne lezije centralnog nervnog sistema, infekcije, upotreba pojedinih lekova (npr. neuroleptici), izloženost različitim toksinima, a za neke su od značaja i psihogeni uzroci (Méneret *et al.*, 2021).

1.2.2.1. Distonija

Distonija se karakteriše produženom nevoljnom kontrakcijom mišića koja dovodi do uvrtanja, ponavljajućih pokreta i abnormalnih položaja tela (Albanese *et al.*, 2013). Distonija može biti fokalna kada zahvata samo jedan deo tela ili multifokalna (u upotrebi su i nazivi segmentna i generalizovana) kada zahvata više regiona. Regije tela koje su obično pogođene distonijom su glava, vrat, ekstremiteti ili trup. Na osnovu kliničkih karakteristika distonija može biti klasifikovana na izolovanu, kada je distonija jedini klinički znak bez drugih neuroloških ili sistemskih znakova, kombinovanu, kada uz distoniju postoji još neki nevoljni pokret ili poremećaj ekstrapirimidnog sistema i kompleksnu, kada uz distonički nevoljni pokret ili druge manifestacije poremećaja ekstrapirimidnog sistema postoje i druge neurološke i sistemske manifestacije (Albanese *et al.*, 2013). Najznačajniji genetički tipovi distonija dati su u tabeli 1.2.

Nije identifikovan zajednički mehanizam u osnovi nastanka različitih tipova distonije. Međutim, najčešće se navodi poremećaj u transmisiji dopamina i holina (Sciamanna *et al.*, 2011), kao i hiperaktivnost Purkinjeovih ćelija malog mozga (Fan *et al.*, 2012).

Metaanaliza 16 epidemioloških studija primarnih distonija pokazala je ukupnu prevalenciju od 16,4 na 100000 osoba širom sveta (Steeves *et al.*, 2012).

Bolesnici sa distonijom predstavljaju približno 20% bolesnika sa poremećajima pokreta (Jankovic 2009).

U genetičkoj osnovi distonije nalaze se retki poznati monogeniski oblici bolesti, zatim sporadične multifaktorske forme sa nasleđenom predispozicijom i sekundarni oblici koji uključuju kompleksne sindrome ne sasvim poznate etiologije (Fahn *et al.*, 1998).

Zahvaljujući napretku metoda u molekularno genetičkoj dijagnostici, otkriveni su brojni novi geni i patološke varijante odgovorne za nastanak retkih naslednih distonija. Trenutno je najmanje 20 različitih monogeniskih primarnih distonija povezano sa odgovarajućim DYT lokusima. Kada se uzmu u obzir i kombinovane i kompleksne forme, taj broj se značajno povećava (Marras *et al.*, 2016).

Tabela 1.2: Fenotipovi i geni povezani sa naslednim formama izolovanih i kombinovanih distonija. Modifikovano prema Klein 2014.

Oznaka	Genski lokus	Gen	Poremećaj	Forma/podgrupa distonije	Reference
DYT1	9q32-q34	<i>TOR1A</i>	Generalizovana distonija ranog početka	Izolovana	Ozelius <i>et al.</i> , 1997
DYT3	Xq13.1	<i>TAF1</i>	X vezana distonija parkinsonizam	Kombinovana (distonija sa parkinsonizmom)	Makino <i>et al.</i> , 2007
DYT4	19p	<i>TUBB4A</i>	Spazmodična disfonija	Izolovana	Hersheson <i>et al.</i> , 2013
DYT5a	14q22.1–22.2	<i>GCHI</i>	Dopa responsivna distonija, Segava sindrom	Kombinovana (distonija sa parkinsonizmom)	Ichinose <i>et al.</i> , 1994
DYT5b	11p15.5 2p14-p12	<i>TH</i> <i>SPR</i>	Dopa responsivna distonija, Segava sindrom	Kombinovana (distonija sa parkinsonizmom)	Lüdecke <i>et al.</i> , 1995; Bonafé <i>et al.</i> , 2001
DYT6	8p11.1	<i>THAP1</i>	Distonija sa početkom u adolescentnom dobu	Izolovana	Fuchs <i>et al.</i> , 2009
DYT8	2q35	<i>PNKD1/MRI</i>	Paroksizmalna nekineziogena diskinezija 1	Kombinovana (distonija sa drugim diskinezijama)	Rainier <i>et al.</i> , 2004
DYT10	16p11.2-q12.1	<i>PRRT2</i>	Paroksizmalna kineziogena diskinezija	Kombinovana (distonija sa drugim diskinezijama)	Chen <i>et al.</i> , 2011
DYT11	7q21.3	<i>SGCE</i>	Mioklonička distonija	Kombinovana (distonija sa mioklonusom)	Zimprich <i>et al.</i> , 2001
DYT12	19q13.2	<i>ATPIA3</i>	Distonija sa parkinsonizmom rapidnog početka	Kombinovana (distonija sa parkinsonizmom)	de Carvalho Aguiar <i>et al.</i> , 2004
DYT18	1p34.2	<i>SLC2A1</i>	Paroksizmalna diskinezija uzrokovana naporom	Kombinovana (distonija sa drugim diskinezijama)	Seidner <i>et al.</i> , 1998
DYT24	11p	<i>ANO3</i>	Kranio cervikalna distonija adultnog početka	Izolovana	Münchau <i>et al.</i> , 2000; Charlesworth <i>et al.</i> , 2012
DYT25	18p	<i>GNAL</i>	Kranio cervikalna distonija adultnog početka	Izolovana	Fuchs <i>et al.</i> , 2013

Neki od značajnijih primera kompleksnih distonija su Vilsonova bolest (VB) koja predstavlja autozomno recesivno oboljenje nastalo usled deponovanja bakra u različitim organima, pre svega u jetri i u mozgu, pa se izdvajaju hepatska i neurološka forma. Patološke varijante u genu *ATP7B* menjaju biosintetičku i transportnu ulogu proteina ATPaze u ćeliji, što dovodi do poremećaja izlučivanja bakra u žuči i njegovog nagomilavanja u jetri, mozgu, rožnjači i drugim tkivima. Do sada je opisano više

stotina patoloških varijanti u genu *ATP7B* pri čemu je varijanta p.H1069Q najzastupljenija i u našoj i Evropskoj populaciji (Tomić *et al.*, 2013). Drugi primer bi bila Niman Pikova bolest tip C koja predstavlja redak progresivni autozomno recesivni poremećaj lizozomskog deponovanja uzrokovan patološkim varijantama u genima *NPC1* (u 95% slučajeva) i *NPC2* (u 5% slučajeva). Poznato je više od 260 različitih patoloških varijanti u genu *NPC1*, koje su uglavnom nukleotidne izmene promenjenog smisla (engl. *missense*) (Vanier and Millat 2003). Još jedan značajan primer kompleksne distonije jeste PKAN, vrlo retka genetički uslovljena bolest. Patološke varijante u genu *PANK2*, koji kodira enzim panotenat kinazu 2, dovode do nakupljanja gvožđa u mozgu što daje karakterističan prikaz na magnetnoj rezonanci poznat kao tigrovo oko (engl. *eye-of-the-tiger*) (Hartig *et al.*, 2006).

1.2.2.2. Ataksija

Spinocerebelarna ataksija je sporo progresivno, degenerativno, genetičko oboljenje koje se karakteriše gubitkom koordinacije pokreta, usporenim, nejasnim govorom (dizartrija), problemima sa gutanjem (disfagija), sporim pokretima očiju (Refsum and Skre 1978).

Procenjeno je da je učestalost SCA 2.7 na 100000 osoba širom sveta (Ruano *et al.*, 2014).

Iako postoji značajna fenotipska varijabilnost u okviru spinocerebelarnih ataksija (SCA), određeni klinički znaci su često od pomoći prilikom genetičkog testiranja.

Postoje tri glavne genetičke kategorije SCA: 1) ataksije koje u osnovi imaju ekspanzije CAG ponovaka/poliQ ataksije; 2) ataksije u čijoj su osnovi ekspanzije ponovaka u nekodirajućem delu gena; 3) ataksije uzrokovane patološkim varijantama koje nisu ekspanzije ponovaka (*missense*, delecije, insercije, duplikacije) (Dueñas *et al.*, 2006). Glavni tipovi ataksija uzrokovani genetičkim varijantama prikazani su u tabeli 1.3.

SCA nastaju usled atrofije malog mozga, a to uključuje sve njegove delove kao što su Purkinjeve ćelije, granularni ćelijski sloj, kao i duboka jedra malog mozga.

CAG tripleti daju informaciju za sintezu aminokiseline glutamin (Q), tako da usled ekspanzije na proteinskom nivou nastaje niz od glutamina za kojeg je pokazano da ima toksični efekat (Dueñas *et al.*, 2006; Orr and Zoghbi 2007; Williams and Paulson 2008). Na ovaj način CAG ekspanzije dovode do pogrešnog savijanja proteina i posledično njegove agregacije. Pored toga, pokazano je da se toksičnost ne odvija na nivou iRNK već samo na nivou proteina.

Table 1.3: Spinocerebelarne ataksije sa povezanim uzročnim varijantama u poznatim genima. Modifikovano prema Paulson 2009.

Bolest	Genski lokus	Gena/protein	Uzročna varijanta (opseg veličine ponovka)	Reference
SCA1	6p	<i>ATXN1</i> /Ataksin 1	CAG/polyQ ekspanzija (39-82)	Banfi <i>et al.</i> , 1994
SCA2	12q	<i>ATXN2</i> /Ataksin 2	CAG/polyQ ekspanzija (33-64)	Pulst <i>et al.</i> , 1996
SCA3	14q	<i>ATXN3</i> /Ataksin 3	CAG/polyQ ekspanzija (52-86)	Kawaguchi <i>et al.</i> , 1994
SCA5	11p	<i>SPTBN2</i> /Beta 3 spektrin	Varijante koje nisu ponovci	Ikeda <i>et al.</i> , 2006
SCA6	19p	<i>CACNA1A</i> /Kalcijumov kanal	CAG/polyQ ekspanzija (19-30)	Zhuchenko <i>et al.</i> , 1997
SCA7	3p	<i>ATXN7</i> /Ataksin 7	CAG/polyQ ekspanzija (37-200)	Trottier <i>et al.</i> , 1995
SCA8	13q	<i>ATXN80S</i>	CAG/CTG ekspanzija (107-128)	Koob <i>et al.</i> , 1999
SCA10	22q	<i>ATXN10</i>	ATTCT ekspanzija (1000-4000)	Matsuura <i>et al.</i> , 2000
SCA11	15q	<i>TTBK2</i> /tau kinaza	Varijante koje nisu ponovci	Worth <i>et al.</i> , 1999
SCA12	5q	<i>PPP2R2B</i> /fosfataza	CAG ekspanzija (66-78)	Holmes <i>et al.</i> , 1999
SCA14	19q	<i>PRKCG</i> / protein kinaza C	Varijante koje nisu ponovci	Chen <i>et al.</i> , 2003
SCA15/16	3p	<i>ITPR1</i> / IP3 receptor	Varijante koje nisu ponovci	Iwaki <i>et al.</i> , 2008; van de Leemput <i>et al.</i> , 2007
SCA17	6q	<i>TBP</i> / TATA vezujući protein	CAG/polyQ ekspanzija (50-63)	Koide <i>et al.</i> , 1999
SCA27	13q	<i>FGF14</i> /faktor rasta fibroblasta	Varijante koje nisu ponovci	van Swieten <i>et al.</i> , 2003

polyQ: poliglutamin-niz sastavljen od aminokiseline glutamin (Q); IP3: Inozitol-1, 4, 5-trifosfat.

1.2.2.3. Horeja

Horeja je abnormalni poremećaj pokreta gde brzi pokreti nogu i ruku podsećaju na plesanje. Horeju karakterišu kratki, poluusmereni, nepravilni pokreti koji nisu ponavljajući ili ritmički već se stiče utisak da teku iz jednog mišića u drugi. Najznačajniji klinički entitet kojeg karakteriše horeja je Hantingtonova bolest (HB). Pored horeje, klinička slika HB obuhvata kognitivna oštećenja i psihijatrijske poremećaje (Huntington 1872). HB je autozomno dominantno oboljenje uzrokovano ekspanzijom CAG ponovaka u genu *HTT* koja kodira abnormalno dug niz poliglutamina u proteinu hantingtin (MacDonald 1993). Osobe sa 40 i više CAG ponovaka imaju punu penetrantnost, sa obrnutom korelacijom između broja ponovaka i godina početka bolesti. Osobe sa brojem ponovaka između 36 i 39 imaju nekompletnu penetrantnost, što znači da neće sve individue sa ovim brojem ponovaka razviti HB u toku svog života. Genetički modifikatori i faktori okruženja, a ne samo broj CAG ponovaka, doprinose tome kada će se razviti oboljenje (Gusella *et al.*, 2014), tako da početak bolesti kod osobe ne može da se predvidi samo na osnovu broja ponovaka. Kod adulta sa horejom, posle HB, drugi najčešći uzrok horeje su ekspanzije u genu *C9ORF72* (Hensman *et al.*, 2014). Na trećem mestu je spinocerebelarna ataksija tip 17 (Stevanin *et al.*, 2003).

Među drugim genetičkim kliničkim entitetima koji se karakterišu prisustvom horeje kod adulta su: HB slična bolest tip 2 (engl. *HD Like*, HDL2), neuroakantocitotični sindromi, neurodegeneracija povezana sa akumulacijom gvožđa u mozgu (engl. *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation 1*, NBIA) i druge. Kada je horeja prisutna kod dece, uzroci su najčešće: horeatetoična cerebralna paraliza, benigna hereditarna horea, Vilsonova bolest, metabolički poremećaji i drugi, sa odgovarajućom genetičkom etiologijom.

Detaljan prikaz gena asociраних са наследном хорејом дат је у табели 1.4.

Бројне студије су се bavile преваленијом HB у свету и проценјена је глобална преваленија од 5,5 на 100000, уз велики степен хетерогености међу студијама (Baig *et al.*, 2016).

Осим генетиčkih, постоје и други (стечени) узроци хореје који обухватају структурне лезије мозга, метаболічке и ендокрине факторе, инфекције, аутоимуна и паранеопластична обољења итд.

Табела 1.4: Гени повезани са наследним хорејама. Модификовано према Marras *et al.*, 2016

Gen	Обољење	Фенотип	Наслеђивање	Reference
<i>HTT</i>	HB	Хореја, деменија, психијатријска обољења	AD	The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993
<i>PRNP</i>	HDL1	Хореја, деменија, напади	AD	Laplanche <i>et al.</i> , 1999
<i>JPH3</i>	HDL2	Хореја, когнитивни поремећај	AD	Margolis <i>et al.</i> , 2001
<i>NKX2-1</i>	Наследна бенигна хореја	Хореја атозоа, глобални заостанак у развоју	AD	Breedveld <i>et al.</i> , 2002
<i>VPS13A</i>	Неуроакантоцитоза	хореја, дистонија, паркинсонизам	AR	Rampoldi <i>et al.</i> , 2001; Ueno <i>et al.</i> , 2001
<i>XK</i>	МекLeod синдром	Хореја, психијатријски поремећаји	X vezano	Ho <i>et al.</i> , 1994
<i>FTL</i>	неуроферитинопатија	Хореја, дистонија, паркинсонизам	AD	Curtis <i>et al.</i> , 2001
<i>ADCY5</i>	ADCY5 дискнезија	Дискнезија лица, миоклонус, хореја	AD	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>HPRT</i>	Lesch-Nyhan синдром	Дистонија, хореја, бализам	X vezano	Gibbs and Caskey 1987
<i>ACAT1</i>	Дефицијенција Митохондријалне ацетоацетил-CoA тиолазе	Дистонија, хореја	AR	Fukao <i>et al.</i> , 2001
<i>GCDH</i>	Глутарићна ацидурција тип 1	Дистонија, хореја, паркинсонизам	AR	Biery <i>et al.</i> , 1996
<i>MUT</i>	Метилмалонићна ацидурција	Дистонија, хореја, атаксија	AR	Jansen and Ledley 1990
<i>PCCA/PCCB</i>	Пропионићна ацидурција	Дистонија, хореја	AR	Richard <i>et al.</i> , 1997
<i>C9ORF72</i>	ALS	Хореја, дистонија миоклонус, паркинсонизам	AD	Renton <i>et al.</i> , 2011
<i>TBP</i>	SCA17, HDL4	Хореја	AD	Koide <i>et al.</i> , 1999
<i>ATN1</i>	DRPLA	Хореја, миоклонус, паркинсонизам, деменија	AD	Koide <i>et al.</i> , 1994
<i>CP</i>	Ацерулоплазминемија	Дистонија, атаксија, хореја	AR	Harris <i>et al.</i> , 1995
<i>DCAF17</i>	Woodhouse-Sakati синдром	Хореја, глувоћа, напади	AR	Alazami <i>et al.</i> , 2008
<i>PANK2</i>	PKAN	Хореја, паркинсонизам, психијатријски поремећаји	AR	Hartig <i>et al.</i> , 2011

ALS-Amiotrofićna lateralna skleroza; HDL-Hantingtonovoj bolesti slično обољење (engl. *HD-like*); SCA17-Spinocerebellarna атаксија тип 17; DRPLA-dentatorubropalidoluzijska атрофија; PKAN-neurodegeneracija povezana са pantotenat kinazom; CoA-koenzim A; HB-Hantingtonova bolest; AD-аутозомно доминантно; AR-аутозомно рецесивно

Kada je u pitanju pristup genetičkom testiranju kod bolesnika obolelih od različitih vrsta poremećaja pokreta, uglavnom se genetički uzrok potraži u najčešćim genima uzročnicima pre nego se pristupi analizi šireg panela gena. Tako npr. kod bolesnika sa atakasijom i horejom koristi se kvantitativni PCR (engl. *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*, QF-PCR) i fragment analiza da se ispita prisustvo mikrosatelitskih ekspanzija, odnosno najčešćih patoloških varijanti kod ovih grupa oboljenja, u sledećim genima: *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *CACNL1A4*, *ATXN7*, *FXN*, *HTT*, *DRPLA*, *JPH3* i *TBP* (Illarioshkin *et al.*, 1995; Platonov *et al.*, 2004). Dalje, kod bolesnika sa PB ispituje se prisustvo najčešćih patoloških varijanti u genu *GBA* (p.N370S i p.L444P) i varijante p.G2019S u genu *LRRK2* (Illarioshkin *et al.*, 2007) metodom sekvenciranja po Sangeru ili upotrebom druge metode kao što je PCR u realnom vremenu (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Skrining patoloških varijanti u genima *PINK1*, *SNCA*, *ATP13A2*, *LRRK2*, *PARK2* i *PARK7* dopunjuje se primenom MLPA metode (engl. *Multiplex Ligation Probe Analysis*, MLPA) zbog detekcije velikih duplikacija i delecija u navedenim genima.

Sve je više zastupljena analiza većeg broja gena kao prvog koraka u genetičkoj dijagnostici oboljenja, čime se zaobilaze ciljane metode analize određenog ili nekoliko gena. Ovoj mogućnosti doprinosi ubrzan razvoj metodologije koji je praćen i bioinformatičkim razvojem u analizi podataka (Clark *et al.*, 2018).

1.3. Specifičnosti i novine u molekularno genetičkoj dijagnostici kognitivnih poremećaja i poremećaja pokreta

Postavljanje genetičke dijagnoze za nedijagnostikovane retke neurodegenerativne bolesti kroz otkrivanje novih varijanti i gena vezanih za oboljenje ima veliki klinički značaj. Dok porodična istorija može biti od pomoći za uspostavljanje dijagnoze, negativna porodična istorija ne mora da isključi mogućnost postojanja genetičkog oboljenja, što ukazuje na važnost genetičkog testiranja svih bolesnika, čak i u sporadičnim slučajevima.

Pozitivna genetička osnova u bolesnika bez obolelih srodnika može se objasniti smrću srodnika pre početka simptoma, nepotpunom penetrantnošću genskih patoloških varijanti ili ukoliko je varijanta nastala *de novo*. Dakle, u nekim slučajevima neurodegenerativne bolesti imaju jasnu pozitivnu porodičnu anamnezu što ukazuje na genetičku osnovu date bolesti. Posledično nasleđivanje bolesti može biti autozomno dominantno, autozomno recesivno, X vezano i mitohondrijalno.

Rana i precizna klinička dijagnoza kognitivnih poremećaja i poremećaja pokreta je važna za sagledavanje prognoze i toka bolesti, usmeravanje genetičkih testiranja a posebno je važna u svetlu mogućnosti etiopatogenetskog lečenja.

U procesu genetičkog testiranja neophodno je izabrati metodu testiranja po meri bolesnika, odnosno onu kojom će se dobiti najbrži i najpouzdaniji rezultati.

1.3.1. Dijagnostički genetički testovi

Dijagnostički genetički testovi predstavljaju važan segment postavljanja dijagnoze za datog bolesnika.

Testovi za analizu hromozoma detektuju promene koje uključuju prisustvo viška ili manjka čitave kopije hromozoma (trizomije ili monozomije), potom duplikacije i delecije većih delova hromozoma, hromozomske rearanžmane (translokacije). Određena genetička stanja su povezana sa

promenama na hromozomima i ovakvi testovi se izvode kod ispitanika kod kojih postoji sumnja na ova oboljenja.

Genetički testovi analiziraju sekvencu molekula DNK u cilju detekcije varijante koja uzrokuje oboljenje ili povećava rizik za bolest. Ovi testovi su relativno finansijski zahtevni i zahtevaju dosta vremena da se urade. Stoga se izvode kasnije u dijagnostičkom procesu, kada klinički pregledi i drugi testovi ukažu da se najverovatnije radi o patološkoj varijanti u genu koja je uzrok date bolesti. Mnogi neurološki fenotipovi su genetički heterogeni; formirani su brojni dijagnostički algoritmi jer je testiranje svih gena povezanih sa datom bolesti zahtevno (Li 2012). Imajući u vidu složenost navedenih analiza, brojni bolesnici sa genetičkim neurološkim oboljenjima ostaju bez svoje dijagnoze, čak i kada je bolest uzrokovana patološkim varijantama u poznatim genima.

U zavisnosti od vrste genetičke promene primenjuju se odgovarajuće metode analize. Tako, za ispitivanje ekspanzija mikrosatelitskih ponovaka koji su uzročnici brojnih oboljenja najčešće se koristi fragment analiza, *repeat-primed* PCR (RP-PCR) i Southern blot koji omogućava detekciju širokog opsega veličina ekspanzija (Petronis *et al.*, 1996). Dalje, kvantitativne metode poput *Real Time* PCR-a našle su primenu u detekciju genskih duplikacija i delecija (npr. kod polineuropatija) (Bjelica *et al.*, 2021). Pored toga, MLPA metodom je omogućena detekcija duplikacija i delecija čitavih egzona gena karakterističnih za npr. PB (Janković *et al.*, 2018). Kao metoda za ispitivanje prisustva promena u sekvenci gena danas se široko primenjuje sekvenciranje DNK.

1.3.1.1. Metode sekvenciranja DNK molekula

Određivanje redosleda nukleotida u DNK molekulu je proces koji se naziva DNK sekvenciranje. S obzirom na raznovrsnu genetičku osnovu neurodegenerativnih poremećaja, molekularno genetička analiza ima za cilj da identifikuje odgovorni gen i detektuje patološku varijantu. To čini neurodegenerativne bolesti dobrim kandidatima za analizu metodom sekvenciranja DNK. Genetički testovi za detekciju uzročnih varijanti i postavljanje genetičke dijagnoze su neophodni kod aficiranih individua ili kod onih sa rizikom za oboljevanje.

1.3.1.1.1. Metoda sekvenciranja po Sangeru

Više od četiri decenije koristi se metoda sekvenciranja DNK po Sangeru, koja predstavlja prvu generaciju automatizovanog sekvenciranja. Odlikuje se izvanrednom preciznošću, ali se može primeniti na segmente relativno male dužine (ispod 1000 baznih parova). To je čini pogodnom za analizu samo pojedinačnih gena ili delova gena (Sanger *et al.*, 1977). S obzirom da je ova metoda finansijski i vremenski zahtevna (Neveling *et al.*, 2013), postepeno je zamenjuju savremenije, brže i efikasnije metode za sekvenciranje više lokusa istovremeno, metode nove generacije sekvenciranja (engl. *Next Generation of Sequencing*, NGS). Međutim, sekvenciranje po Sangeru smatra se i dalje neophodnim u molekularno dijagnostičkim laboratorijama i mnogi genetički testovi se izvode upravo ovom metodom. Npr. potvrda nalaza dobijenog NGS-om, ciljana analiza gena u porodicama kada je poznat genetički uzrok bolesti, odnosno utvrđivanja statusa nosioca i porekla varijante (nasleđena ili *de novo*), kada se radi o određenoj, specifičnoj uzročnoj varijanti ili samo jednom genu itd.

1.3.1.1.2. Metode nove generacije sekvenciranja

Za razliku od sekvenciranja po Sangeru, NGS tehnologija, koja predstavlja drugu generaciju sekvenciranja, omogućava istovremenu analizu većih celina nasledne osnove. NGS se zasniva na paralelnoj analizi velikog broja segmenata DNK (masovno paralelno sekvenciranje) i potom bioinformatičkom povezivanju dobijenih podataka (Xue *et al.*, 2015). Osnovne karakteristike druge generacije sekvenciranja su: (1) paralelno generisanje miliona kratkih sekvenci, (2) ubrzanje procesa sekvenciranja u poređenju sa prvom generacijom, (3) redukovani troškovi sekvenciranja i (4) podaci koji se dobijaju ovakvim vidom sekvenciranja su direktno detektovani bez potrebe za elektroforezom (Ansorge 2009; Diamandis 2009; Zhang *et al.*, 2011).

S druge strane, njegove mane su da tačnost rezultata varira između 93% i 99%, pa je takve nalaze neophodno potvrditi metodom sekvenciranja po Sangeru. Pored toga, NGS-om se dobijaju i dvosmisleni rezultati koji su teški za interpretaciju u poređenju sa testiranjem jednog gena. Za interpretaciju dobijenih podataka koriste se vodiči odnosno preporuke za interpretaciju i klasifikaciju varijanti kako bi se utvrdio patološki značaj detektovane genske varijante. Najčešće se koriste preporuke publikovane u saradnji između Američkog koledža za medicinsku genetiku i asocijacije za molekularnu patologiju (ACMG/AMP). Na osnovu dostupnih podataka o detektovanoj varijanti i prema preporukama ACMG/AMP varijante u sekvenci se klasifikuju u pet kategorija: 1) patogene, 2) verovatno patogene, 3) varijante nejasnog značaja (engl. *Variants of Uncertain Significance*, VUS), 4) verovatno benigne i 5) benigne (Richards *et al.*, 2015).

Težini interpretacije i klasifikacije varijanti doprinose upravo VUS varijante za koje ne postoji dovoljno dokaza kako bi se svrstale u patološke ili u benigne. S obzirom da se NGS-om analizira veći broj gena istovremeno, povećan je rizik za otkrivanjem jedne ili više VUS varijanti. U slučaju kada su dostupni članovi porodice obolelog za analizu ili čak ako postoje uslovi za funkcionalne studije, značaj VUS varijanti se može razjasniti. U suprotnom, detektovanje VUS varijanti ili bilo koji drugi nejasan genetički nalaz mogu rezultovati u povećanju dileme za genetički savet. Detektovanje druge definitivno patogene varijante u genu asociiranom sa bolešću smanjuje, ali ne isključuje šansu da je ta VUS asociirana sa datom bolesti. Ova komplikacija potiče od retkog otkrića da patološke varijante u dva različita gena mogu koegzistirati kod iste osobe. Primeri ovoga su *C9ORF72/GRN*, *C9ORF72/MAPT*, *C9ORF72/SQST1*, *C9ORF72/TARDP* (van Blitterswijk *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2016; Origone *et al.*, 2015).

Trenutno postoje različiti pristupi sekvenciranju nove generacije. Jedan od njih se bazira na detekciji pirofosfata koji se otpuštaju pri svakoj ugradnji nukleotida u novi sintetički lanac DNK (tzv. pirosekvenciranje). Za razliku od toga, razvijena je i tehnologija sekvenciranja koja se bazira na sekvenciranju ligacijom (Shendure *et al.*, 2005), a nešto kasnije uspostavljena je metoda sekvenciranja koja se bazira na detekciji jona vodonika koji se otpušta u toku procesa sekvenciranja (Rothberg *et al.*, 2011). Naposletku, jedna od korišćenijih metoda jeste metoda sekvenciranja sintezom (Shendure and Ji 2008; Balasubramanian 2015).

Postoje tri glavne strategije primene NGS-a za analizu DNK u humanoj i medicinskoj genetici: 1) sekvenciranje celog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS), 2) sekvenciranje celog egzoma (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES) i 3) sekvenciranje odabranog seta/panela gena (Foo *et al.*, 2012). Brza otkrića gena uključenih u Mendelovske tj. monogenske bolesti korišćenjem, pre svega, WES-a, pružila su nove mogućnosti za dijagnostičko genetičko testiranje (Bamshad *et al.*, 2011).

1.3.1.1.2.1. Sekvenciranje celog genoma

Sekvenciranje celog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS) podrazumeva sekvenciranje svih delova genoma (~90%) (Clark *et al.*, 2018). Prednost ovog pristupa je svakako to da se ovom metodom dobija ogromna količina podataka skladištena ne samo u protein - kodirajućim regionima gena i njihovim okolnim sekvencama, već i u drugim regionima. Tako dobijamo podatke i o intronskim varijantama i o varijantama u nekodirajućim RNK. Nedostaci ovog pristupa bi pre svega bili zahtevna bioinformatička obrada dobijenih podataka i njihovo skladištenje, kao i veći utrošak finansijskih resursa. Veza između protein - nekodirajućih delova genoma i bolesti nije uvek poznata. Stoga je i interpretacija dobijenih podataka veliki izazov. Međutim, vremenom, sposobnost interpretacije dubokih intronskih varijanti i drugih nekodirajućih varijanti će rasti, povećavajući stopu korišćenja sekvenciranja celog genoma u odnosu na druge strategije sekvenciranja.

WGS postaje sve zastupljenija metoda u genomskoj medicini, odnosno koristi se kao dodatni korak u rutinskoj dijagnostici nakon dobijanja negativnih rezultata sekvenciranja čitavog egzoma. Tako je jedna nedavno sprovedena studija pokazala korisnost ove metode kod bolesnika sa nedijagnostikovanom genetičkom osnovom bolesti gde je postignut prinos od 20% (Bergant *et al.*, 2021). Čak je nedavnim istraživanjem sugerisano da se kod bolesnika kod kojih postoji visoka sumnja na genetički uzrokovano oboljenje u prvom koraku izvrši sveobuhvatna WGS analiza (Clark *et al.*, 2018).

1.3.1.1.2.2. Sekvenciranje celog egzoma

Sekvenciranje celog egzoma (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES) podrazumeva sekvenciranje skoro svih kodirajućih delova genoma sa graničnim intronskim sekvencama (približno 20000 gena) (Clark *et al.*, 2018). Sekvenciranjem celog egzoma kod bolesnika sa različitim monogenским bolestima u nekoliko studija od 25-45% bolesnika je dobilo genetičku dijagnozu (Lee *et al.* 2014; Soden *et al.* 2014; Farwell *et al.* 2015).

WES se najčešće primenjuje kada se sumnja na genetički heterogena oboljenja (tj. kada postoji više odgovornih gena za jedan fenotip) kao što su mentalni i neurorazvojni poremećaji, epilepsija, mišićna distrofija, ataksija, neuropatija, gluvoća. Do 85% uzročnih varijanti kod monogenških bolesti detektuje se u okviru kodirajućih sekvenci genoma (Gilissen *et al.*, 2012). Glavna mana WES-a je nedovoljna pokrivenost određenih regiona usled prisustva ponovljenih sekvenci, bogatog GC sadržaja gde se, kao posledica tehničkih ograničenja ove metode, mogu propustiti brojne uzročne varijante (Zhang *et al.*, 2011; Biesecker *et al.*, 2011). Primena WES-a u dijagnostičke svrhe je u stalnom porastu, uz ograničenje koje se odnosi na troškove analize, vreme koje se utroši na analizu kao i potrebu skladištenja ogromne količine podataka (Reale *et al.*, 2018).

1.3.1.1.2.3. Sekvenciranje odabranog seta/panela gena

Sekvenciranje odabranog seta/panela gena omogućava ciljanu analizu grupe gena, najčešće povezanih sa određenim fenotipovima. Ovakve panele odlikuje lakša bioinformatička obrada podataka, bolja pokrivenost sekvenciranih fragmenata kao i niži troškovi analize u odnosu na sekvenciranje čitavog genoma i egzoma. Moguće je nabaviti komercijalne panele za analizu gena uključenih u patogenezu specifičnih grupa bolesti ili dizajnirati panele koji uključuju samo specifične gene od interesa (engl. *custom panel*). U poslednje vreme u praktičnoj primeni u medicini se afirmisao panel

koji sadrži kodirajuće regione 4813 gena sa graničnim intronskim sekvencama, a to su geni koji su direktno povezani sa određenim kliničkim fenotipovima. Ovaj panel poznat je kao medicinski egzom, Mendelium ili klinički egzom, što jasno govori o njegovom značaju za kliničku praksu (Okazaki *et al.*, 2016; Pajusalu *et al.*, 2018; de Koning *et al.*, 2015). Takođe, danas je poznata i proširena verzija ovog panela koja sadrži 6794 gena. Upotrebom panela klinički egzom detektuju se pojedinačne nukleotidne varijante (engl. *Single Nucleotide Variant*, SNV), kao i male insercije i delecije i varijante u mestu za iskrcavanje introna u ispitivanom genomu (Bamshad *et al.*, 2011; Biesecker and Green 2014). U primerima kada je klinička slika bolesnika kompleksna i odlikuje se atipičnim simptomima i nepotpunom penetrantnošću, sekvenciranje panela klinički egzom bi bio posebno uspešan pristup (Maver *et al.*, 2016). Razlog tome je što se kod takvih slučajeva standardno izvodi veliki broj genetičkih testova pre postavljanja definitivne dijagnoze jer je teško odabrati konkretan manji genski panel.

Pokazano je da se efikasnije i preciznije detektovanje potencijalno uzročnih genskih varijanti postiže primenom virtualnih subpanela (u okviru panela od 4813 gena) koji se konstruišu prema fenotipskim karakteristikama (Okazaki *et al.*, 2016; Pajusalu *et al.*, 2018), pri čemu se koriste HPO termini za fenotipske abnormalnosti povezane sa bolestima kod ljudi (Maver *et al.*, 2016). HPO baza je formirana tako da u sebi ima liste fenotipskih karakteristika i gena uzročnika povezanih sa svakom od njih (<https://hpo.jax.org/app/>) (Robinson and Mundlos 2010). Ovime je omogućena fleksibilnost u uključivanju i onih gena koji imaju minimalno preklapanje sa fenotipskom prezentacijom bolesnika (Maver *et al.*, 2016). U skladu sa navedenim, detaljan i informativan izveštaj kliničkog genetičara predstavlja temelj uspešne analize sekvenciranja panela klinički egzom. Pored toga, važan aspekt čini i bioinformatička obrada podataka pomoću dostupnih platformi i alata za analizu. Završni korak NGS analize čini interpretacija značaja detektovane genske varijante, koja se postiže primenom široko upotrebljivanih preporuka i standarda za interpretaciju varijanti (Richards *et al.*, 2015).

U poređenju sa sekvenciranjem celog genoma i egzoma, sekvenciranje panela klinički egzom ima niz prednosti. Najpre, zbog manjih troškova sekvenciranja čini se prihvatljivim za manje genetičke centre, potom lakša bioinformatička obrada podataka kao i njihova interpretacija, manja verovatnoća detekcije slučajnih nalaza (Okazaki *et al.*, 2016; Pajusalu *et al.*, 2018). Sekvenciranje panela klinički egzom se danas koristi u brojnim genetičkim centrima i brojnim studijama je pokazana upotreba ovog panela u dijagnostici različitih oboljenja. Istraživanjima su dobijene stope detekcije uzročnih varijanti od 36% kod bolesnika sa epilepsijom (Yang *et al.*, 2014) dok je kod bolesnika sa neuromišićnim bolestima postignuta znatno veća stopa od 62,9% (Börklü-Yücel *et al.*, 2020). Ipak, dodatne studije su neophodne kako bi podržale njegovu upotrebu u dijagnostici neurodegenerativnih oboljenja koja se manifestuju kognitivnim poremećajima i poremećajima pokreta.

U tabeli 1.5 dat je prikaz poređenja osnovnih karakteristika navedenih pristupa za sekvenciranje prve i druge generacije koji se koriste u dijagnostičkim i istraživačkim laboratorijama širom sveta.

Tabela 1.5: Poređenje metoda za sekvenciranje DNK u molekularno genetičkoj dijagnostici

Metod/pristup	Region od interesa	Pokrivenost gena od interesa	Tehnička zahtevnost	Detekcija VUS	Indikacije za korišćenje
Sekvenciranje jednog gena	Jedan gen	Odlična	Većinski dostupno, niska cena	Moguće	Potvrda nalaza dobijenog NGS-om, segregacione analize, kada se radi o određenoj, specifičnoj uzročnoj varijanti ili pojedinačnom genu od interesa
Sekvenciranje odabranog seta/panela gena	Nekoliko gena do stotinak gena	Duboka pokrivenost kodirajućih regiona	Uglavnom dostupno većini dijagnostičkih laboratorija	Varijabilno (u zavisnosti od broja gena)	Genetička heterogenost
Sekvenciranje celog egzoma	Približno 20000 gena	Različita pokrivenost protein kodirajućih gena	Neophodna veća ulaganja u opremu	Uglavnom se detektuju, često u kodirajućim regionima	Genetička, klinička heterogenost, atipične prezentacije bolesti
Sekvenciranje celog genoma	Ceo genom	Relativno uniformna pokrivenost celog genoma	Neophodna velika ulaganja u opremu	Detektuju se i u kodirajućim i u nekodirajućim regionima	Genetička, klinička heterogenost, atipične prezentacije bolesti, kada su uzročne varijante u nekodirajućim regionima ili kada su mogući veći strukturni rearanžmani

1.3.1.1.3. Treća i četvrta generacija sekvenciranja

Druga, nova generacija sekvenciranja (NGS) je unela revoluciju u analizu DNK sekvence i za sada je najkorišćenija i najšire zastupljena metoda. Međutim, razvile su se i treća i četvrta generacija sekvenciranja koje karakteriše lakša priprema uzoraka bez potrebe za PCR-om, odnosno znatno je kraće vreme za izvođenje čitavog procesa pripreme biblioteke u poređenju sa NGS-om. Dodatno, treća generacija sekvenciranja proizvodi dugačke sekvence (engl. *reads*), odnosno nizove nukleotida dobijene sekvenciranjem, duge do nekoliko kilobaza što prevazilazi problem poravnavanja sa referentnim genomom i pogrešnog čitanja regiona sa ponovljenim sekvencama, gde greške bivaju uvedene PCR-om.

Treća generacija sekvenciranja podrazumeva dva glavna pristupa: 1) sekvenciranje jednog molekula u realnom vremenu (engl. *Single Molecule Real Time*, SMRT) gde se ugradnja nukleotida detektuje u realnom vremenu (Eid *et al.*, 2009, Korch *et al.*, 2010). Proces se odvija u specifičnim dubljim minijaturnim prostorima za detekciju svetlosti (engl. *Zero Mode Waveguide*, ZMW) i zasniva se na detekciji fluoroboje koja se otpušta prilikom sekvenciranja. U ovom slučaju DNK matrica je kružna što omogućava polimerazi, koja je smeštena na dno, da sekvencira čitav lanac DNK čime se

dobijaju dugačke sekvence, kao i *antisens* lanac; 2) razvijena je i metoda za sekvenciranje jednog molekula koja koristi proteinske nanopore kroz koje prolazi jednolančana DNK. Prilikom prolaska DNK molekula kroz poru detektuju se razlike u varijacijama jonske struje koje se beleže u realnom vremenu i interpretiraju u cilju očitavanja sekvence (Mikheyev and Tin 2014). Uz svu naprednost oba pristupa, za sada ipak nije postignuta preciznost čitanja sekvenci kao kod druge generacije sekvenciranja. Ovim metodama dobija se nivo grešaka od oko 6-9% (Dealahaye and Nicolas 2021). Takođe, finansijska ulaganja u formiranje biblioteke i celokupan proces izvođenja su zahtevna, posebno za manje genetičke centre.

Širenje znanja u oblasti molekularne biologije i dijagnostike praćeno je ubrzanim razvojem metodologije u ovim oblastima. Tako se razvila i četvrta generacija sekvenciranja koja se bazira na principima druge generacije i podrazumeva sekvenciranje jednog molekula *in situ* (engl. *In Situ Sequencing*, ISS), odnosno direktno u uzorku tkiva (Ke *et al.*, 2013). Bazira se na korišćenju specifičnih proba (engl. *padlock probing*) (Banér *et al.*, 1998), formiranju kružnih produkata (Nilsson *et al.*, 1994) i sekvenciranju ligacijom (Shendure *et al.*, 2005) iRNK u uzorcima tkiva. Ovim se dobijaju podaci o genskoj ekspresiji koji se koriste za profilisanje različitih ćelijskih tipova. Stoga, ovaj pristup može u budućnosti biti značajan za sekvenciranje uzoraka tkiva i biti korišćen u dijagnostičke svrhe (Ke *et al.*, 2016).

U Srbiji do sada nije analiziran genetički profil bolesnika sa poremećajima pokreta i kognitivnim poremećajima analizom panela klinički egzom i stoga bi definisanje genomskeg profila ovih bolesnika doprinelo uspostavljanju novih genetičkih dijagnostičkih testova u Srbiji. Ovakvi testovi bi posledično doprineli i boljem razumevanju kompleksnih fenotipova bolesnika sa ovim oboljenjima.

2. CILJEVI

Definisani su sledeći ciljevi ovog istraživanja:

1. Utvrđivanje distribucije i spektra patoloških varijanti u genima asociranim sa neurodegenerativnim bolestima koje se manifestuju motornim i kognitivnim poremećajima;
2. Korelisanje genotipa bolesnika sa njihovim fenotipom;
3. Unapređenje postojećih i uspostavljanje novih algoritama za genetičko testiranje bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije;
4. Povezivanje niza programa, tj. uspostavljanje sopstvenog toka rada za bioinformatičku obradu podataka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Eksperimentalni deo ove doktorske teze urađen je u laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja Klinike za neurologiju, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu. U istoj laboratoriji urađen je jedan deo analize dobijenih podataka, a drugi deo je izveden u saradnji sa Centrom za mendelovsku genomiku, Kliničkog instituta za medicinsku genetiku iz Ljubljane.

Za potrebe analiza u okviru ove doktorske disertacije korišćen je hospitalni registar Klinike za neurologiju, UKCS, Beograd, sa kliničkim podacima o bolesnicima i dijagnozom postavljenom od strane lekara specijaliste neurologije. Klinička dijagnoza je postavljena nakon detaljnih neuroloških i biohemijskih ispitivanja kao i radioloških snimaka mozga, prema odobrenim nacionalnim i međunarodnim smernicama.

U studiju je uključeno ukupno 57 bolesnika sa retkim neurodegenerativnim bolestima. Od tog broja, 15 bolesnika su sa kognitivnim poremećajima i 42 bolesnika (36 nesrodnih i 3 para srodnih bolesnika) su sa dijagnozom različitih neurodegenerativnih bolesti koje se manifestuju poremećajima pokreta. Za procenu mentalnog statusa kod bolesnika sa poremećajima pokreta i kognitivnim poremećajima korišćena je mala skala za procenu mentalnog statusa (engl. *Mini mental state examination*, MMSE). Detaljan pregled broja bolesnika prema kliničkim dijagnozama je dat u tabeli 3.1.

Tabela 3.1: Pregled broja bolesnika prema kliničkoj dijagnozi

Poremećaji pokreta (broj bolesnika)	Kognitivni poremećaji (broj bolesnika)
Distonija (ukupno 18) -izolovana (6) -kombinovana (10) -kompleksna (2) Ataksija (16) PB/parkinsonizam (4) HSP (2) Horea (2)	AB ranog početka (8) FTD (ukupno 6) -bvFTD (2) -FTD sa parkinsonizmom (2) -agPPA (1) BKP (1)

HSP-hereditarna spastična paraplegija, PB-Parkinsonova bolest, AB-Alchajmerova bolest, FTD-frontotemporalna demencija, bvFTD-biheviorna varijanta FTD-a, agPPA-agramatička primarna progresivna afazija, BKP-blagi kognitivni poremećaj

Bolesnici su izabrani ukoliko su ispunjavali jedan ili nekoliko sledećih kriterijuma:

1. Da prethodno primenjeni standardni genetički testovi dostupni na Neurološkoj klinici, UKCS, Beograd, Srbija, nisu identifikovali uzročnu gensku varijantu (Prilog 8.2);
2. Da su sa pozitivnom porodičnom istorijom bolesti;
3. Da su sa ranom prezentacijom simptoma;

4. Sa fenotipom koji sugeriše genetičku heterogenost i/ili ne odgovara bilo kojem tipičnom kliničkom obliku neurodegenerativne patologije (složeni fenotipovi, kombinacija više sindroma);
5. I/ili da genetička osnova može da uključuje specifične gene koji su nepogodni za rutinsku dijagnostiku (npr. veliki broj egzona, vrlo retke uzročne varijante).

Najveći broj bolesnika (52) je upućeno sa Klinike za Neurologiju, UKCS, Beograd, tri bolesnika su upućena sa Klinike za neurologiju i psihijatriju za decu i omladinu, Beograd, a dva bolesnika su upućena sa Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", Beograd. Po potrebi, u ispitivanje su bili uključeni i članovi porodice obolelog, čiji uzorci DNK su se koristili za segregacione analize. Ukupno je testiran 21 srodnik. Kontrolnu grupu je činilo 200 uzoraka zdravih ispitanika.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, Beograd, Srbija (odluka br. 402/6 od 30.1.2020.) (Prilog 8.1). Svaki bolesnik ili imenovani staratelj dali su pismeni pristanak za učešće u istraživanju i objavljivanju rezultata.

3.2. Metode

Svim bolesnicima, nakon potpisanog informisanog pristanka, uzorkovano je 5 ml periferne krvi. Kao antikoagulans korišćeni su Na-citrat ili EDTA, a uzorci krvi su skladišteni na -20 °C.

Za potrebe genetičkih analiza iz uzoraka periferne krvi izolovana je DNK. Izolacija DNK vršena je primenom modifikovane metode izolovanja ("salting out") po Mileru (Miller *et al.*, 1988).

3.2.1. Metoda izolovanja ("salting out") po Mileru

Metodom izolovanja po Mileru dobija se izolovana DNK visokog kvaliteta. Sastav pufera koji se koriste za izolovanje po Milerovoj metodi je dat u tabeli 3.2, a sama procedura se sastojala od nekoliko koraka:

1. Uzorak od 5-10 ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat, EDTA) se pomeša sa istom količinom pufera za lizu i 15 do 20 minuta inkubira na 4 °C.
2. Potom se centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, supernatant se odbaci, a talog se resuspenduje u 5-10 ml fiziološkog pufera.
3. Uzorak se potom centrifugira 15 min na 2000 obrtaja. Ispiranje u fiziološkom puferu i centrifugiranje se ponavlja 2-3 puta dok talog ne pobeli.
4. Nakon poslednjeg "ispiranja" supernatant se odbaci, a talogu doda 3 ml pufera A, 50 µl 10% proteinaze K i 200 µl 10% SDS (Na- dodecilsulfat).
5. Uzorak se zatim resuspenduje i inkubira preko noći na 37 °C.
6. Sledećeg dana se doda 1ml 6 M NaCl, dobro promućka i centrifugira 15 minuta na 3000 obrtaja.
7. Supernatant se prenosi u čistu epruvetu i centrifugira 15 minuta na 4000 obrtaja.
8. Supernatant se pažljivo preliva u čistu graduisanu epruvetu, a zatim se doda isti volumen izopropanola.
9. Pažljivim izvrtanjem epruvete izdvaja se beličasti končić DNK.
10. DNK se pažljivo pokupi staklenim štapićem i potopi 30 sekundi u 70 % etanolu.

11. Nakon toga, DNK se osuši na vazduhu i zatim rastvori u 300 µl redestilovane vode.

Tabela 3.2: Sastav pufera korišćenih za izolovanje DNK iz periferne krvi metodom po Milleru.

Pufer za lizu*	Fiziološki pufer	Pufer A	TE pufer
0.32 M SAHAROZA	0,075 M NaCl	10 mM TRIS HCl [#]	10 mM TRIS HCl [#]
10 mM TRIS HCl [#]	0,025 M EDTA pH 8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl ₂			

*Autoklavirati i čuvati na +4 °C, # pH 7.5

3.2.2. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK

Određivanje koncentracije genomske DNK vršeno je metodom fluorometrije na aparatu Qubit® 3.0 Fluorimeter uz pomoć Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (*ThermoFisher Scientific*, SAD) kita. Metoda fluorometrije se zasniva na detektovanju fluorescentne boje specifične za molekul od interesa (DNK, RNK ili protein). Fluorescentne boje emituju svetlost samo kada su vezane za molekul od interesa. Korišćenjem Qubit™ dsDNA HS Assay Kit kita meri se koncentracija isključivo dvolančane DNK i to u rasponu od 10 pg/µl do 100 ng/µl.

Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK se vršilo u nekoliko koraka:

1. U prvom koraku fluorometrijskog određivanja koncentracije pripremaju se razblaženja za svaki uzorak DNK u redestilovanoj vodi u razmeri 1:10;
2. Zatim se priprema radni rastvor mešanjem 199 µl Qubit™ dsDNA HS pufera i 1 µl fluorescentne boje (Qubit™ dsDNA HS Reagent) za svaki mereni uzorak ili standard;
3. Zatim se u zasebne Qubit Assay tubice sipa po 1 µl DNK razblaženja čiju koncentraciju određujemo, a u dve tubice se sipa po 10 µl Qubit™ dsDNA HS Standarda #1, odnosno Standarda #2;
4. Zatim se u svaku tubicu doda 199 µl, odnosno 190 µl radnog rastvora, da bi ukupna zapremina u svakoj tubici iznosila 200 µl;
5. Ovako pripremljene smeše se kratko vorteksuju i inkubiraju 2 min na sobnoj temperaturi;
6. U poslednjem koraku, Qubit fluorometar se podesi za merenje koncentracije dvolančane DNK korišćenjem dsDNA HS Assay kita i zatim se najpre očitaju koncentracije standarda #1 i #2, a potom i DNK uzoraka.

3.2.3. Metoda nove generacije sekvenciranja

Kod odabranih bolesnika sa retkim neurodegenerativnim oboljenjima uključenih u ovu studiju korišćena je NGS metoda za postavljanje genetičke dijagnoze. Ova metoda omogućava precizno, masivno, paralelno sekvenciranje velikog broja DNK fragmenata u kratkom vremenskom periodu. Za izvođenje NGS metode korišćen je TruSight One Sequencing Panel (*Illumina*, SAD) koji obuhvata kodirajuće regione sa graničnim intronskim sekvencama 4813 klinički relevantnih gena (~ 62.000 egzona). Ovi geni su povezani sa različitim bolestima koje su opisane u *online* dostupnim bazama podataka: DECIPHER (Firth *et al.*, 2009) (<https://decipher.sanger.ac.uk>), ClinVar (Landrum *et al.*,

2020) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), OMIM (Hamosh *et al.*, 2005) (www.omim.org) i HGMD (Stenson *et al.*, 2003) (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php). Upotrebom ovog panela detektuju se pojedinačne nukleotidne varijante, kao i male insercije i delecije u ispitivanoj DNK.

Metoda NGS-a obuhvata tri glavna koraka:

- 1) Priprema uzoraka i formiranje biblioteke DNK
- 2) Reakcija sekvenciranja na aparatu MiSeq
- 3) Analiza i interpretacija dobijenih rezultata sekvenciranjem

3.2.3.1. Priprema uzoraka i formiranje biblioteke DNK

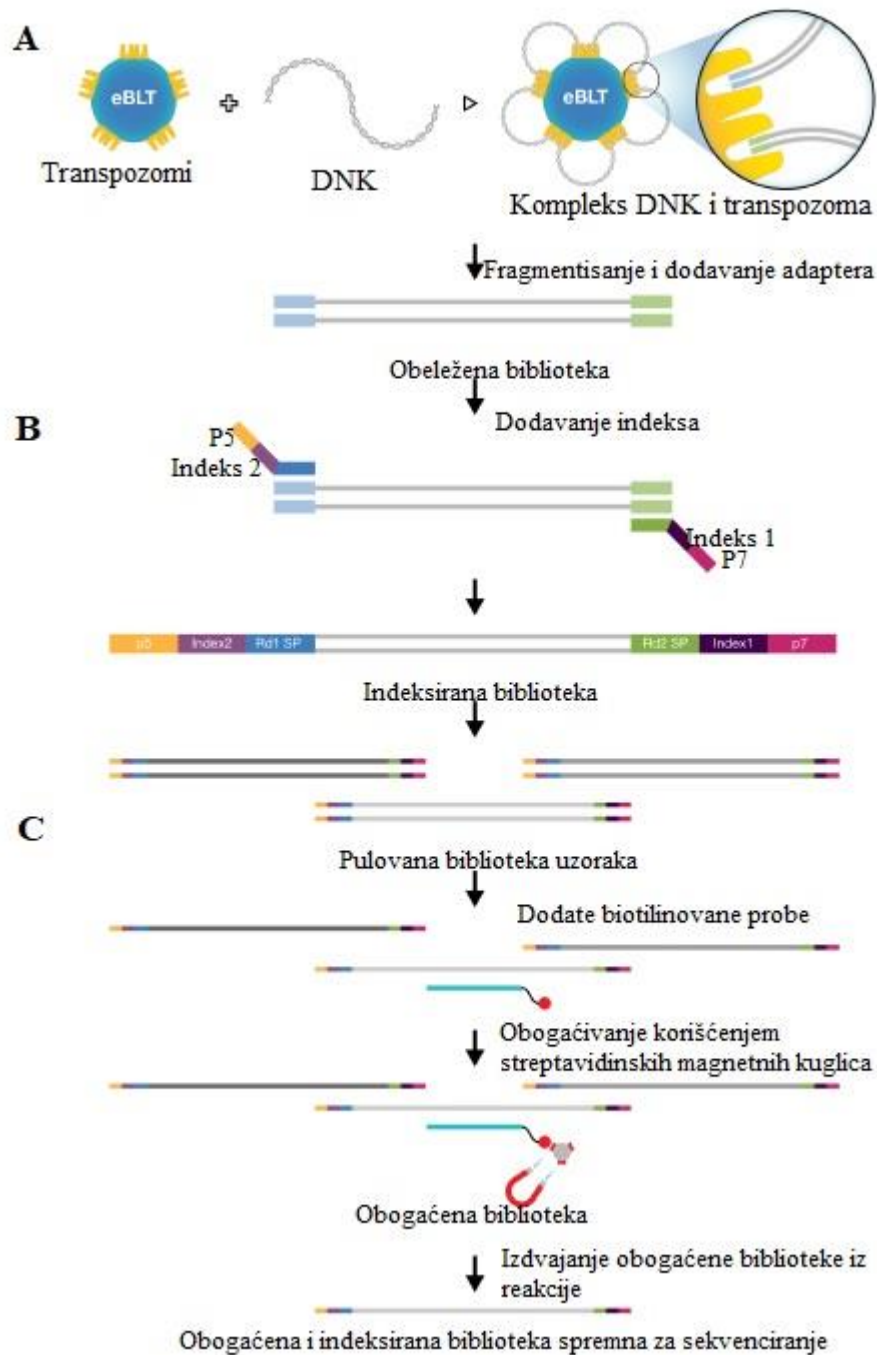
Priprema DNK uzoraka bolesnika pre formiranja biblioteke DNK podrazumeva normalizaciju izolovanih uzoraka DNK na koncentraciju od 10 ng/μl, a zatim razblaživanje na 5 ng/μl u finalnoj zapremini od 10 μl Tris-HCl (10 mM, pH 8,5). Formiranje biblioteke DNK podrazumeva pravljenje biblioteke fragmenata DNK za grupe od po tri uzorka što je vršeno prema protokolu proizvođača (<https://support.illumina.com/>) upotrebom Reagent Kit V3 (*Illumina*, SAD).

Priprema biblioteke se sastoji od nekoliko faza. Prva faza podrazumeva fragmentisanje genomske DNK uz pomoć transpozoma gde se istovremeno na dobijene DNK fragmente dodaju adapteri (Nextera tehnologija) (slika 3.1, A). U sledećim koracima se vrši precipitacija, pa zatim PCR amplifikacija ovako dobijenih fragmenata. U toku PCR amplifikacije se na sekvence adaptera dodaju sekvence indeksa na oba kraja fragmenata (slika 3.1, B). Prilikom formiranja biblioteke indeksi 1 (i7) i 2 (i5) se kombinuju tako da sva tri uzorka u jednoj biblioteci sadrže isti indeks 2 a različite indekse 1.

Po završetku PCR amplifikacije koncentracija svakog uzorka se meri metodom fluorometrije na Qubit® 3.0 fluorimetru, primenom Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (*ThermoFisher Scientific*, SAD) kako je prethodno opisano, pa se zatim uzorci spajaju u jedinstvenu biblioteku.

U sledećem koraku vrši se obogaćivanje biblioteke koje podrazumeva da se uz pomoć streptavidinskih kuglica i biotilovanih proba specifičnih za željene fragmente genomske DNK, ovi fragmenti izdvajaju iz reakcije. Poslednji korak podrazumeva umnožavanje ovako obogaćene biblioteke (slika 3.1, C).

Za validaciju, odnosno merenje koncentracije dobijene finalne biblioteke korišćen je Qubit® 3.0 Fluorimeter i Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (*ThermoFisher Scientific*, SAD) kako je napred opisano. Prosečna dužina fragmenata biblioteke određena je pomoću instrumenta Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies*, SAD).



Slika 3.1: Shematski prikaz procedure formiranja biblioteke DNK za metodu nove generacije sekvenciranja. Slika adaptirana prema URL: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina/fgs/asssembled-assets/marketing-literature/illumina-dna-prep-for-enrichment-770-2020-010/illumina-dna-prep-enrichment-data-sheet-770-2020-010.pdf&clen=405835&chunk=true>

3.2.3.1.1. Određivanje prosečne dužine fragmenata

Da bi se što preciznije odredila koncentracija finalne biblioteke u nanomolima (nM) pored merenja koncentracije fluorometrijskom metodom, neophodno je odrediti i prosečnu dužinu fragmenata biblioteke.

Određivanje prosečne dužine fragmenata biblioteke vršeno je uz pomoć Agilent DNA High Sensitivity Assay kita na aparatu Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies*, SAD). Pri radu se koristi High Sensitivity DNA čip (*Agilent Technologies*, SAD) koji se sastoji od 16 bunarića ukupno (11 na koje se nanose uzorci, jedan na koji se nanosi marker za dužinu fragmenata i četiri na koje se nanosi samo smeša gela i boje), a rezultati se obrađuju u softveru 2100 Expert v2.8 (*Agilent Technologies*, SAD). Očekivana distribucija fragmenata DNK je u opsegu veličine od ~300 bp do ~1000 bp.

Procedura se sastoji od nekoliko koraka:

1. Najpre se na čip model nanese 350 μ l redestilovane vode za ispiranje kapilara na apartu;
2. Potom se napravi smeša od 15 μ l boje i 300 μ l gela koja se vorteksuje 10 minuta na 6000 rpm;
3. Potom se čip postavi u svoj nosač za koji je zakačen špric;
4. Potom se nanese 9 μ l smeše boje i gela u bunarić označen simbolom G, nosač čipa se zaklopi i špric spusti do sive zakočice na nosaču. To će poslužiti kao potisak da se smeša ravnomerno rasporedi u čipu;
5. Nakon toga, otvori se nosač čipa i naliva se 9 μ l smeše boje i gela u ostala tri bunarića poslednjeg reda čipa obeleženih sa G;
6. Potom se nanosi 5 μ l High Sensitivity DNA markera u preostalih 12 bunarića, a onda i 1 μ l High Sensitivity DNA ledera u bunarić obeležen simbolom ledera;
7. Najzad, nanose se uzorci u zapremini od 1 μ l u bunariće za uzorke i tako pripremljeni čip se vorteksuje 1 minut na 2000 rpm;
8. Za to vreme izvadimo čip model iz aparata da se kapilare suše na vazduhu;
9. Na kompjuteru pokrenemo softver 2100 Expert, izaberemo esej HS DNA assay i upisujemo redom uzorke kako smo ih nanosili na čip;
10. Postavimo čip sa uzorcima u aparat i pokrenemo esej.

Kada se dobiju podaci o koncentraciji biblioteke u ng/ μ l i prosečnoj dužini fragmenata u baznim parovima pristupa se računanju finalne koncentracije biblioteke u nanomolima, pri čemu se koristi sledeća formula:

$$\frac{(\text{koncentracija biblioteke u ng}/\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{prosečna dužina biblioteke})} \times 10^6 = \text{koncentracija biblioteke u nM}$$

Dalje, biblioteka se razblažuje u Resuspension puferu (Resuspension Buffer, Reagent Kit V3, *Illumina*, SAD) do finalne koncentracije od 12 pM u volumenu od 600 μ l. U postupku razblaživanja DNK fragmenti se denaturišu u HiDiTM formamidu. Ovako pripremljena biblioteka se zatim nanosi na kartridž za sekvenciranje (*Illumina*, SAD).

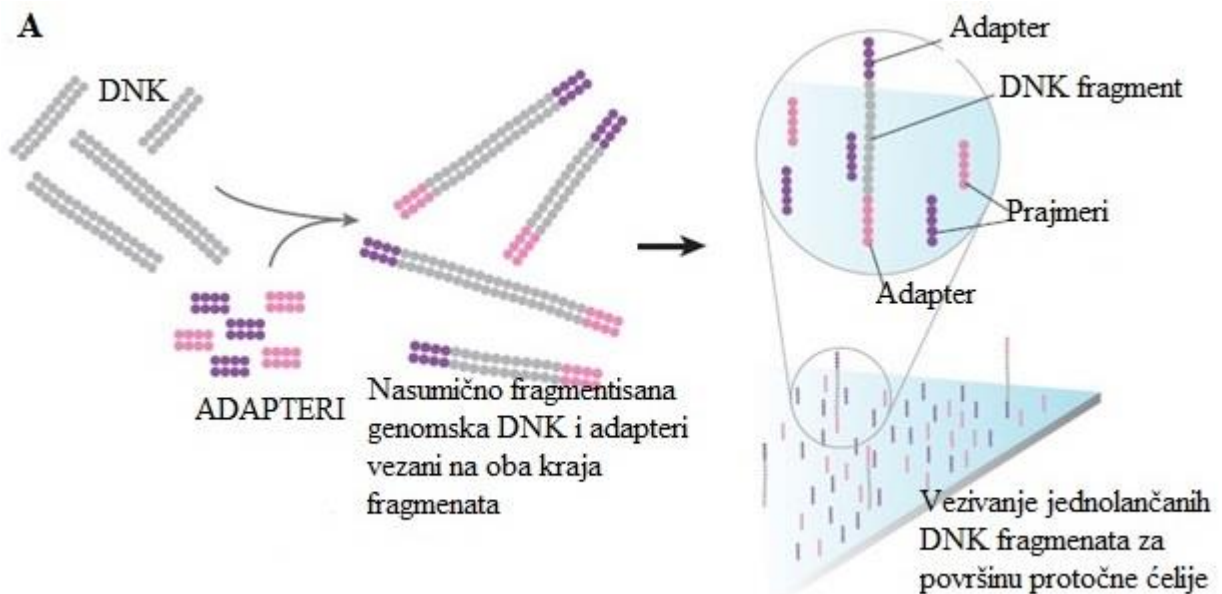
3.2.3.2. Reakcija sekvenciranja nove generacije

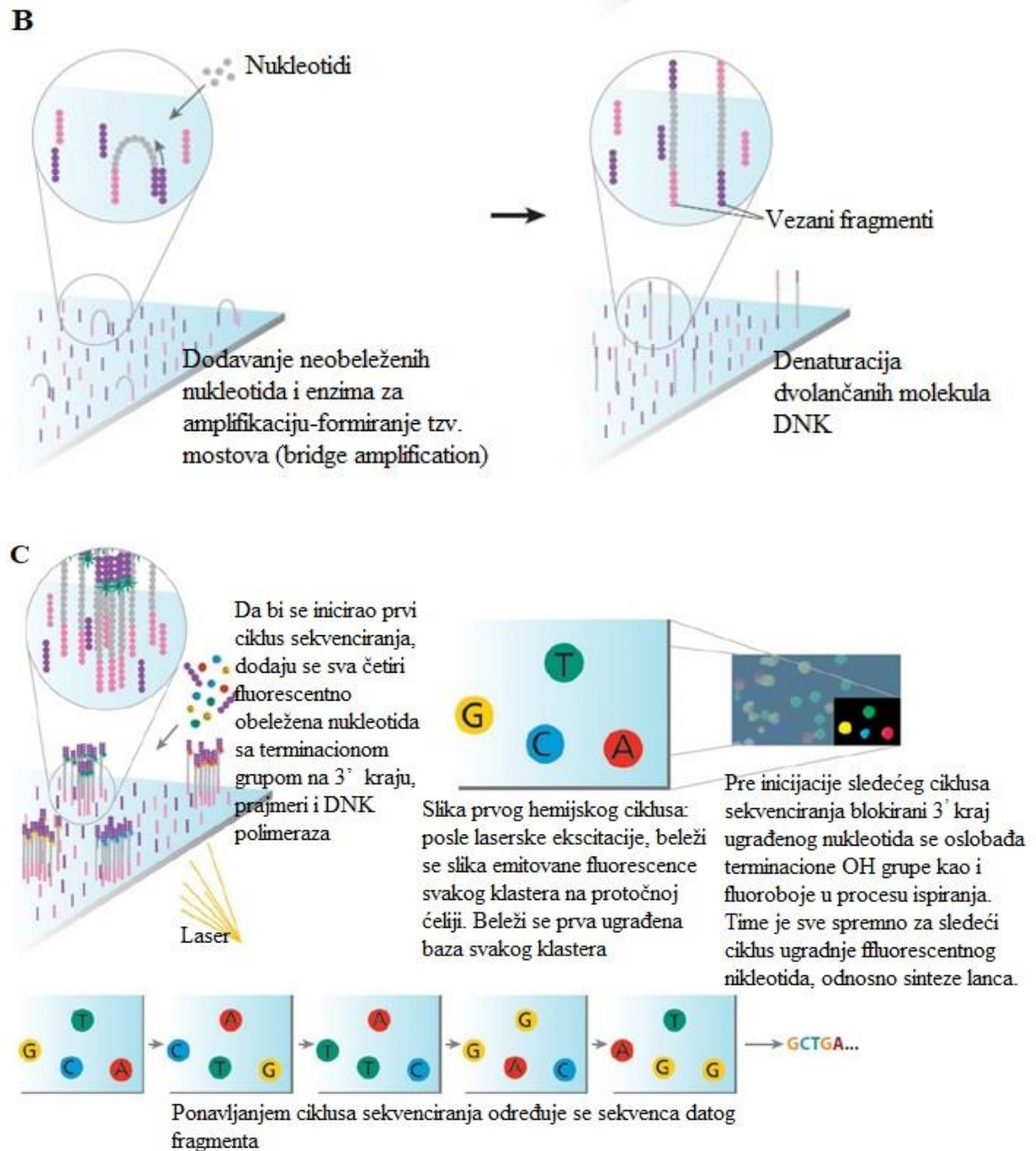
Reakcija sekvenciranja u okviru NGS metode je sekvenciranje sintezom (engl. *Sequencing By Synthesis*, SBS) i zasniva se na upotrebi fluorescentno obeleženih nukleotida. Vršena je u aparatu

Illumina MiSeq (*Illumina*, SAD) a fragmenti su sekvencirani u 151 ciklusu sa oba kraja (engl. *paired-end sequencing*).

Reakcija sekvenciranja odvija se na površini protočne ćelije (engl. *flow cell*) na kojoj se nalaze kovalentno vezani oligonukleotidi. Oligonukleotidi su komplementarni sekvencama adaptera koji su tokom formiranja DNK biblioteke dodati na krajeve svih DNK fragmenata. Kada se DNK biblioteka nanese na protočnu ćeliju, dolazi do komplementarnog sparivanja oligonukleotida, i samim tim vezivanja DNK fragmenata za površinu protočne ćelije (slika 3.2, A). U sledećem koraku fragmenti molekula DNK klonalno se amplifikuju u modifikovanom izotermalnom PCR-u koji se naziva *bridge-PCR* (Adessi *et al.*, 2000; Fedurco *et al.*, 2006) tokom koje se molekuli DNK savijaju i formiraju most sa susednim oligonukleotidom na površini protočne ćelije (slika 3.2, B). Ovaj proces omogućava formiranje više od 50 miliona pojedinačnih klastera koji sadrže više od hiljadu kopija klonalno amplifikovanih molekula DNK na površini protočne ćelije. Nakon toga dolazi do denaturacije klastera kako bi se obezbedila jednolančana DNK matrica za koju će se vezati prajmer za sekvenciranje.

Tokom svakog ciklusa sekvenciranja, klonalno amplifikovani klasteri izlažu se DNK polimerazi i mešavini od četiri nukleotida od kojih je svaki obeležen jedinstvenom fluorescentnom bojom. Nukleotidi su modifikovani na 3'-kraju grupom koja onemogućava nastavak procesa sinteze, tkz. reverzibilni terminatori. Time se obezbeđuje ugradnja samo jednog nukleotida u svakom ciklusu sekvenciranja. Na kraju svakog ciklusa očitava se fluorescentni signal za svaki klaster, a zatim se uklanja fluorescentni marker i grupa za terminaciju na ugrađenom nukleotidu. Na taj način rastući lanac se regeneriše za naredni ciklus dodavanja nukleotida (slika 3.2, C).





Slika 3.2: Reakcija sekvenciranja sintezom na protočnoj ćeliji. Modifikovano prema Mardis *et al.*, 2008.

Nakon završetka reakcije sekvenciranja vrši se provera kvaliteta reakcije na samom aparatu. Kvalitet sekvenciranja prikazan je kao Q vrednost koja predstavlja procenat ugradnje ispravnog nukleotida. Optimalna vrednost kvaliteta sekvenciranja iznosi više od 99,9% (Q30), što znači da je 1 nt od 1000 nt pogrešno ugrađen u rastući lanac.

3.2.3.3. Analiza i interpretacija rezultata dobijenih sekvenciranjem

Analiza i interpretacija podataka dobijenih NGS-om sastojale su se od primarne, sekundarne i tercijarne analize (Shema 3.1).

Primarna analiza podrazumeva pretvaranje sirovih podataka u obliku signala dobijenih posle sekvenciranja na MiSeq aparatu u nukleotidne sekvence fragmenata, formirajući tako FASTQ fajlove.

Sekundarna analiza podrazumeva poravnanje dobijenih kratkih sekvenci sa referentnim genomom (hg19) pri čemu se formiraju BAM (engl. *Binary Alignment Map*, BAM) fajlovi, a zatim i pozivanje detektovanih varijanti, pri čemu se formiraju VCF (engl. *Variant Call Format*, VCF) fajlovi. Ovaj nivo analize se vršio na dva načina. U prvom načinu sekundarna analiza je vršena direktno na apartu Illumina Miseq gde su FASTQ fajlovi prevedeni u BAM i VCF fajlove. Potom su VCF fajlovi preuzimani sa aparata i analizirani pomoću softvera Variant Studio v3 (Illumina, SAD) (Shema 3.1, A).

U drugom načinu, FASTQ fajlovi su preuzimani direktno sa aparata MiSeq i njihova dalja obrada je vršena uz pomoć niza algoritama za obradu podataka koji su serijski povezani (tok rada) razvijenog na Institutu za medicinsku genomiku, UKCLJ, Ljubljana (Maver *et al.*, 2016 i Bergant *et al.*, 2018) (Shema 3.1, B). Osnovni koraci ovakve analize podrazumevali su poravnavanje sekvenci prema humanom referentnom genomu hg19, koristeći Burrows-Wheeler Aligner, potom uklanjanje duplikata sekvenci koristeći Picard MarkDuplicates, a zatim rekalkulaciju osnovnog skora kvaliteta, pozivanje varijanti (engl. *variant calling*), rekalkulaciju skora kvaliteta varijanti i filtriranje varijanti koristeći elemente GATK (engl. *Genome Analysis ToolKit*, GATK) platforme koja se sastoji od kompleta bioinformatičkih alata za obradu podataka (DePristo *et al.*, 2011).

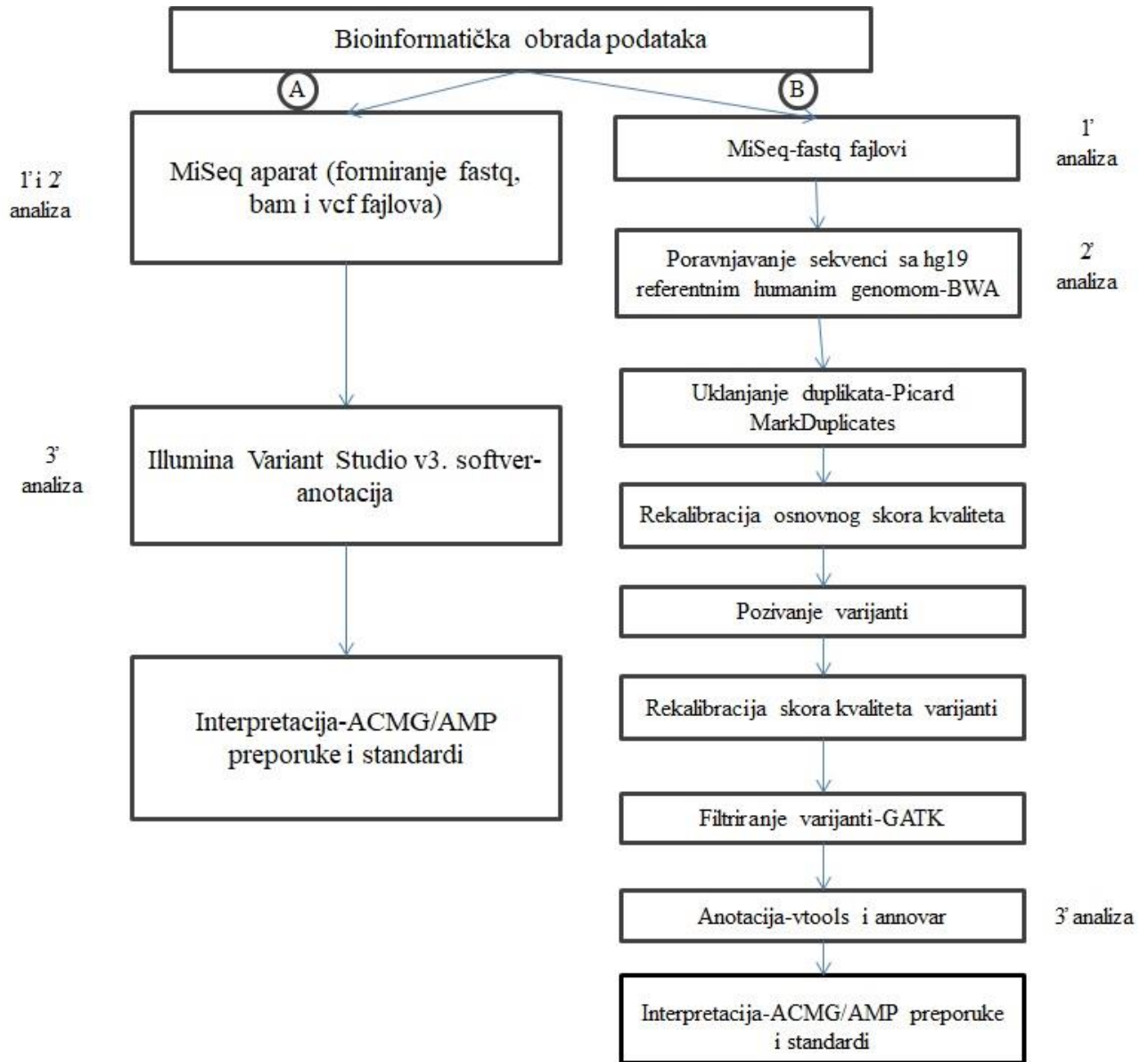
Tercijarna analiza podrazumeva anotaciju i interpretaciju dobijenih varijanti. Ovaj nivo analize je takođe vršen na dva načina. U prvom načinu, VCF fajlovi su anotirani i interpretirani u softveru Variant Studio v3 (Shema 3.1, A). U drugom načinu, varijante su anotirane koristeći vTools i ANNOVAR softvere (Wang and Hakonarson 2010; San Lucas *et al.*, 2012) (Shema 3.1, B). Strategija za tumačenje podataka prvenstveno se zasnivala na formiranju subsetova gena na osnovu termina humane fenotipske ontologije (engl. *Human Phenotype Ontology*, HPO) (Maver *et al.*, 2016). Za svakog bolesnika je prema njegovim fenotipskim karakteristikama pravljena podgrupa gena, odnosno za analizu su odabirani oni geni koji su u literaturi povezani sa datim fenotipskim karakteristikama. U tu svrhu korišćeni su HPO termini za fenotipske abnormalnosti povezane sa bolestima ljudi (<https://hpo.jax.org/app/>). Za procenu učestalosti detektovanih genskih varijanti u našoj populaciji korišćena je baza podataka dostupna u našoj laboratoriji. Informacije o učestalosti varijanti u drugim populacijama i na globalnom nivou je zasnovano na podacima prikupljenim u gnomAD projektu (Karczewski *et al.*, 2020). Za procenu značaja detektovanih genskih varijanti korišćena je dostupna literatura, *in silico* predikcioni softveri i baze podataka genomskih varijanti.

Genske varijante od značaja su one sa učestalošću manjom od 1% u našoj i globalnoj populaciji, varijante opisane kao patogene i/ili verovatno patogene u ClinVar (Landrum *et al.*, 2020), LOVD (Fokkema *et al.*, 2011), HGMD (Stenson *et al.*, 2003) bazama podataka ili su objavljene u literaturi, varijante sa sprovedenim funkcionalnim studijama, varijante sa ubedljivim kvalitetom sekvenciranja (≥ 10 očitavanja za homozigote i ≥ 20 očitavanja za heterozigote) koje su detektovane u genima koji odgovaraju datom fenotipu. Uklapanje u poznati model nasleđivanja je takođe bilo važno za potvrdu patogenosti date varijante.

Za varijante koje ranije nisu bile prijavljene u bazama podataka ili literaturi, izvršili smo prediktivnu *in silico* analizu novootkrivenih varijanti koristeći CADD (Rentzsch *et al.*, 2021), MutationTaster (Schwarz *et al.*, 2010), MetaLR i REVEL softvere. Za analizu efekta genskih varijanti na strukturu proteina korišćen je program Polyphen (Adzhubei *et al.*, 2010) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Za proveru evolutivne konzerviranosti regiona gena u kome je došlo do promene korišćen je GERP++ RS (engl. *rejected substitution*) skor (Davydov *et al.*, 2010).

Sve potencijalno uzročne varijante smo klasifikovali prema standardima i smernicama Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku i Udruženja za molekularnu patologiju (ACMG/AMP) (Richards *et al.*, 2015). Konkretno, varijante su klasifikovane kao (i) patogene, (ii) verovatno patogene, (iii) varijante nejasnog značaja (VUS), (iv) verovatno benigne i (v) benigne.

Sve značajne varijante identifikovane u ovoj studiji dostavljene su u ClinVar bazu podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) (Landrum *et al.*, 2020) (brojevi podnesaka dati su u tabelama 4.2 i 4.4).



Shema 3.1: Shematski prikaz bioinformatičke analize podataka.

3.2.4. Potvrđivanje varijanti detektovanih analizom panela klinički egzom

Sve potencijalno uzročne varijante identifikovane u ovoj studiji smo potvrđivali najpre u uzorcima probanda, a potom su rađene i segregacione analize na uzorcima roditelja i srodnika kada je

to bilo moguće, kako bi se utvrdilo poreklo detektovane varijante (nasleđena ili *de novo*), kao i faza nasleđivanja (*in trans*), odnosno utvrđivanje da li su varijante u složenom heterozigotnom stanju. U tu svrhu, prvo su umnožavani ciljani regioni gena lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Mullis and Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988), a potom je rađeno i sekvenciranje tih regiona metodom direktnog sekvenciranja po Sangeru. Takođe, ovom metodom smo sekvencirali i 200 zdravih kontrola u cilju procene učestalosti detektovanih varijanti u ovoj populaciji.

3.2.4.1. Umnožavanje odabranih regiona gena – PCR

In vitro umnožavanje egzona gena u kojima su detektovane potencijalno uzročne varijante vršena je PCR-om. Za sintezu DNK koristi se termostabilna DNK polimeraza (*Taq* polimeraza). Specifičnost PCR-a obezbeđuju prajmeri, odnosno oligonukleotidi dužine 14-40 nukleotida, koji hibridizuju sa komplementarnim sekvencama na DNK molekulu i na taj način ograničavaju segment DNK koji se amplifikuje. Svaki ciklus PCR-a se sastoji iz tri koraka: termalna denaturacija, hibridizacija prajmera i ekstenzija-sinteza DNK. Nakon poslednjeg ciklusa sledi finalna elongacija da bi se kompletirala sinteza parcijalno sintetisanih produkata.

Prajmeri za umnožavanje ciljanih egzona PCR metodom kreirani su pomoću Primer3 softvera (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Njihove sekvence date su u tabeli 3.3.

Tabela 3.3: Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju određenih segmenata gena

Egzon	Oznaka prajmera ^a	Sekvenca prajmera	Gene	Dužina produkta
9	F	5' attgctaaaaggcatgcaca 3'	<i>MFSD8</i>	229
	R	5' GAAAATAACAACGGCTTCAACC 3'		
intron 7	F	5' TCGTGTGGATGACTCAGGAA 3'	<i>MFSD8</i>	159
	R	5' cccactgtgttgcctcaga 3'		
6	F	5' CCAAACCTCGGGTGACCATT 3'	<i>PDGFB</i>	231
	R	5' ggaaaaatccttcccctga 3'		
3	F	5' tggggatgccttattgaatgg 3'	<i>PANK2</i>	428
	R	5' cctaacaggttcttgaaggtg 3'		
6	F	5'GCACATGGTGCTGTATTTGG 3'	<i>PANK2</i>	233
	R	5'CCACAACGAACAAGTCAGCTT 3'		
4	F	5'ATGTCCATGAAGGAGGTGGA 3'	<i>TUBB4A</i>	237
	R	5'CGTGTACCAGTGCAAGAAGG 3'		
14	F	5' ccaaagctttgtctcatgc 3'	<i>SETX</i>	242
	R	5' TTTTCCTGTTCCAGGTGGTC 3'		
16	F	5'gccctagaagcaagggatct 3'	<i>DCTNI</i>	242
	R	5' AAATGAGACGAGGCATGAGC 3'		
8	F	5' caccagttcacctgccattt 3'	<i>PSENI</i>	384
	R	5' ccaggaatgctgtgcattta 3'		
5	F	5' ggtgagttggggaaaagtga 3'	<i>PSENI</i>	466
	R	5' ttacacatgcacctggettc 3'		
5	F	5' tcactttactccttgcattcca 3'	<i>OPTN</i>	154
	R	5' GAGCTGCAGTTCAGACACGA 3'		
3	F	5' AGAACCTGACCTGCTTCCC 3'	<i>ARSA</i>	196
	R	5' TACAGGAAGAAGGGGCGATC 3'		
4	F	5' CACACCCACTACCCTCAGTT 3'	<i>ARSA</i>	163
	R	5' CTGCAGTGAAGATGACCAGC 3'		

^a Sa F je označen uzvodni (engl. *forward*), a sa R nizvodni (engl. *reverse*) prajmer.

Svaki deo gena u kojem je prethodno detektovana potencijalno uzročna varijanta NGS metodom, zasebno je amplifikovan. Sastav reakcionih smeša i finalne koncentracije pojedinih komponenti dati su u tabeli 3.4.

Tabela 3.4: Komponente PCR-a i njihova finalna koncentracija u reakcionoj smeši.

Komponente reakcione smeše	Finalna koncentracija Protokol A	Finalna koncentracija Protokol A1	Finalna koncentracija Protokol B
PCR buffer*	1x Pufer A	1x Pufer A	1x Pufer B
10 mM dezoksiribonukleotida (dNTPs, <i>Thermo Scientific</i> , SAD)	0,2 mM svakog nukleotida	0,2 mM svakog nukleotida	-
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/μl	0,4 pmol/μl	0,4 pmol/μl
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/μl	0,4 pmol/μl	0,4 pmol/μl
Dimetil sulfoksid (DMSO, <i>Thermo Scientific</i> , SAD)	-	0,5 μl 5% (v/v)	-
Taq polimeraza**	0,4 U	0,4 U	0,5 U
DNK	20 ng	20 ng	20 ng
Dejonizovana voda	po potrebi	po potrebi	po potrebi
Ukupna zapremina	10 μl	10 μl	10 μl

*Pufer A=10x Dream Taq pufer (tačan sastav pufera nije dostupan, KCl, (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂; *Thermo Scientific*, SAD);

Pufer B=5x MyTaq pufer (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂, stabilizeri i pojačivači; *Meridian Bioscience*, SAD)

**DreamTaq polimeraza (20 mM Tris-HCL (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 0.5% (v/v) Tween 20 i 50% (v/v) glycerol; *Thermo Scientific*, SAD)

MyTaq polimeraza (sastav polimeraze nije dostupan; *Meridian Bioscience*, SAD)

Po protokolu A pripremana je smeša za egzon 10 gena *MFSD8*, egzon 6 gena *PDGFB* i egzon 16 gena *DCTN1*, dok je po protokolu A1 pripremana smeša za egzon 4 gena *TUBB4A*. Po protokolu B je pripremana smeša za egzon 3 i 6 gena *PANK2*, egzon 14 gena *SETX*, egzon 5 gena *OPTN*, egzone 3 i 4 gena *ARSA*, egzone 5 i 8 gena *PSENI*, egzon 20 gena *POLG* i egzon 8 sa uzvodnom intronskom sekvencom gena *MFSD8*.

PCR-ovi su izvođeni u mašini Verity® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) u tubicama od 0,2 ml prema odgovarajućem programu (tabela 3.5). Nakon završetka PCR-a uzorci su čuvani na 4 °C do analize.

Tabela 3.5: *Touchdown* PCR program za amplifikaciju kodirajućih regiona ciljanih gena.

Inicijalna denaturacija	94 °C 5 min	1 ciklus
Denaturacija	94 °C 30 s	10 ciklusa
Hibridizacija	65 °C 30 s	
Elongacija	72 °C 45 s	
Denaturacija	94 °C 30 s	20 ciklusa
Hibridizacija	65 °C [#] 30 s [*]	
Elongacija	72 °C 60 s	
Denaturacija	94 °C 30 s	10 ciklusa
Hibridizacija	55 °C [#] 30 s	
Elongacija	72 °C 45 s	
Finalna elongacija	72 °C 10 min	1 ciklus

touch down program za intron 8 gena *MFS D8* je bio 60 °C -50 °C, a za sve ostale fragmente od interesa je bio 65 °C -55 °C

* temperatura hibridizacije se snižava za 0,5 °C u svakom narednom ciklusu – *touchdown* PCR

3.2.4.2. Provera kvaliteta i prečišćavanje produkata PCR-a

Provera specifičnosti i kvaliteta amplifikovanog produkta PCR-a izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu bojenom Midori Green bojom (*Nippon Genetics*, Nemačka). Provera specifičnosti i kvaliteta amplifikovanog produkta PCR-a se sastojala od nekoliko koraka:

1. Najpre se napravi 2% agarozni gel tako što se napravi smeša 2 g agaroze (*Serva*, Nemačka) i 100 ml 1x TBE pufera (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.0) i zagreje se do ključanja;
2. U to se doda Midori green boja u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml i ohladi se gel do 40 °C;
3. Ohlađeni gel se nalije u kadicu za elektroforezu i ostavi da polimeriše;
4. Kada je gel polimerizovan, na njega se nalivaju PCR produkti kao i marker (*GeneRuler™* 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp, *Fermentas*, Nemačka) koji se pomešaju sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenolplavo (w/v), 30% glicerol (v/v)) u odnosu 5:1;
5. Elektroforeza se vrši u 0.5x TBE puferu u trajanju od 15 minuta, pod voltažom od 90 V i na 90 mA u sistemu za elektroforezu HE 99X MAX Horizontal Submarine (*GE Healthcare Bio-Sciences Corp.*, SAD);
6. PCR produkti su vizuelizovani izlaganjem gela UV svetlu na transiluminatoru E-BOX VX5 (*Vilber Lourmat*, Francuska). Procena veličine dobijenih fragmenata vršena je poređenjem sa DNK standardom za dužinu (*GeneRuler™* 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp, *Fermentas*, Nemačka). Kvalitet PCR-a ocenjen je kao dobar kada se na gelu uočavao očekivani broj traka koje su jasno vidljive i očekivane dužine.

Nakon provere na agaroznom gelu, pristupilo se prečišćavanju produkata PCR-a. Uzorci su prečišćavani upotrebom 10 U enzima egzonukleaze (engl. *Exonuclease I*, *ExoI*) (*Thermo Scientific*, SAD) koja uklanja višak prajmera i 2 U termosenzitivne alkalne fosfataze (engl. *Thermosensitive alkaline phosphatase*, *FastAP*) (*Thermo Scientific*, SAD) koja uklanja fosfatne grupe sa nukleotida ostavljajući ih u obliku nukleozida. Reakcija je pripremana sa 5 µl PCR produkta u koji se dodaje 1,5 µl smeše *ExoI* i *FastAP* u razmeri 1:2. Enzimska reakcija prečišćavanja se izvodi 15 minuta na 37 °C, a zatim su enzimi inaktivirani 15 minuta na 80 °C.

3.2.4.3. Sekvenciranje metodom po Sangeru

Reakcija sekvenciranja po Sangeru je metod za određivanje nukleotidne sekvence DNK molekula. U reakciji sekvenciranja koristi se DNK polimeraza koja vrši sintezu lanaca na osnovu komplementarnosti sa DNK matricom tako što ugrađuje nasumično deoksiribonukleotid trifosfate (dNTP) i dideoksiribonukleotid trifosfate (ddNTP). ddNTP su fluorescentno obeleženi i na svom 3' kraju umesto OH grupe imaju vodonik i njihovom ugradnjom onemogućena je dalja reakcija polimerizacije. Nakon reakcije sekvenciranja dobija se smeša fragmenata DNK različitih dužina, koji na svojim 3' krajevima sadrže bojama obeležene ddNTP. Ovi fragmenti se zatim razdvajaju kapilarnom elektroforezom, gde instrument očitava redosled pojavljivanja fluorescentnih boja i nakon obrade podataka dobija se elektroferogram.

Reakcija sekvenciranja pripremana je upotrebom *BigDye™ Terminator Ready Reaction* kita (*Applied Biosystems*, SAD). Smeša za reakciju sekvenciranja pripremana je u zapremini od 10 µl i njen sastav je dat u tabeli 3.6.

Tabela 3.6: Sastav smeše za pripremu reakcije sekvenciranja upotrebom *BigDye Terminator Ready Reaction* kita.

Komponente	Količina
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100	0.5 µl
BigDye™ Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	1.5 µl
Prajmer (10 pmola/µl)	0.4 µl
PCR produkt	*
Dejonizovana voda	do 10 µl

* Količina PCR produkta koja se dodaje je 3-10 ng za PCR produkte od 200-500 bp i 10-40 ng za PCR produkte od 500-1000 bp.

Reakcija je izvođena u mašini Verity® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) po programu koji se sastojao od inicijalne denaturacije 1 minut na 96 °C i 25 ciklusa amplifikacije. Svaki ciklus amplifikacije se sastojao od denaturacije 10 s na 96 °C, hibridizacije 5 s na 50 °C i elongacije 4 min na 60 °C. Nakon završetka amplifikacije uzorci su čuvani na 4 °C.

Nakon reakcije sekvenciranja, a pre kapilarne elektroforeze, izvršeno je prečišćavanje produkata sekvenciranja precipitacijom u etanolu u prisustvu Na-acetata.

3.2.4.3.1. Prečišćavanja produkata reakcije sekvenciranja

Produkti reakcije sekvenciranja su prečišćavani etanol/Na-acetat precipitacijom. U prisustvu soli i etanola DNK fragmenti precipitiraju iz vodenog rastvora dok u supernatantu ostaju neugrađeni ddNTP-ovi, koji se uklanjaju. Preostali talog prečišćenih obeleženih DNK fragmenata rastvara se u dejonizovanom formamidu, i denuriše na visokoj temperaturi. Time se omogućava da DNK fragmenti ostanu u jednonlačanoj linearnoj formi, što je neophodno da bi se tokom kapilarne elektroforeze fragmenti razdvajali prema dužini. Procedura precipitacije sastojala se od nekoliko koraka:

1. U 10 µl produkta reakcije sekvenciranja dodato je 10 µl dejonizovane vode, 2 µl 3M Na-acetata i 50 µl 99% etanola. Sve je promešano izvrtnjem tubice i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi;

2. Uzorak je centrifugiran 15 minuta na 13000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor FA-45-30-11, *Eppendorf*, Nemačka) i nakon toga supernatant je odvađen;
3. Dodato je 70 μ l 70% etanola, uzorak je centrifugiran 10 minuta na 13000 rpm i nakon toga supernatant je odvađen;
4. Precipitat je osušen 2 minuta na 90 °C;
5. Dodato je 15 μ l dejonizovanog HiDi™ Formamide (*AppliedBiosystems*, SAD), kratko vorteksovano i zatim denaturisano 2 minuta na 95 °C;
6. Uzorci su čuvani na ledu do analize na automatskom sekvenatoru.

3.2.4.3.2. Kapilarna elektroforeza produkata reakcije sekvenciranja

Kapilarna elektroforeza je proces u kome se razdvajaju fragmenti koji se razlikuju u dužini za samo jedan nukleotid. Vršiti se kroz vrlo tanke kapilare ispunjene polimerom. Prilikom elektroforeze kraći fragmenti putuju brže i prvi stižu do kraja kapilare. S obzirom da su fragmenti prethodno obeleženi određenim fluorescentnim bojama, prilikom nailaska na laserski zrak, boja emituje svetlost talasne dužine karakteristične baš za tu boju koju detektuje CCD kamera (engl. *charge-coupled device* - CCD). Redosled javljanja signala, boja od koje signal potiče i intenzitet signala se pamte u softveru za prikupljanje signala.

Elektroforeza prečišćenih produkata reakcije sekvenciranja vršena je na aparatu ABI3500 Genetic Analyzer (*AppliedBiosystems*, SAD). Elektroforeza je vršena na 19,5 kV i 60 °C, injekciono vreme je bilo 2 s, a injekciona voltaža 1 kV. Za elektroforezu je korišćen polimer POP7 (*AppliedBiosystems*, SAD) i kapilara od 50 cm. Prikupljanje „sirovih“ podataka (engl. *Raw data*) sekvenci kao i kontrola celog procesa automatskog sekvenciranja vršena je uz pomoć Data Collection softvera (*AppliedBiosystems*, SAD).

3.2.4.3.3. Analiza sekvenci dobijenih automatskim sekvenciranjem

Sirovi podaci prikupljeni programom za prikupljanje podataka tokom kapilarne elektroforeze obrađeni su u Sequencing Analysis v.4.10.1 softveru (*AppliedBiosystems*, SAD). Ovako dobijene sekvence poređene su sa *wt* sekvencama koje su preuzete iz Ensembl baze podataka (<http://www.ensembl.org/index.html>) (Howe *et al.*, 2021). Poređenje je vršeno pomoću Sequencher 4.10.1 Demo softvera (*Gene Codes Corporation*, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Demografska i klinička evaluacija ispitanika

U ovo istraživanje je bilo uključeno ukupno 57 bolesnika od kojih su 42 bolesnika sa poremećajima pokreta (tri para srodnih bolesnika i 36 nesrodnih bolesnika) a 15 bolesnika sa kognitivnim poremećajima.

Bolesnici ženskog pola (36/57, 63,2%) su bili zastupljeniji u odnosu na muški pol (21/57, 36,8%). Starost bolesnika je bila od 4 do 70 godina, sa prosečnom starošću od 42 godine. Dominantna klinička slika kod bolesnika sa poremećajima pokreta:

- Distonija 42,9% (18/42)
- Ataksija 38,1% (16/42)
- PB/parkinsonizam 9,5% (4/42)
- Hereditarna spastična paraplegija 4,8% (2/42)
- Horeja 4,8% (2/42).

Dominantna klinička slika kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima:

- Alchajmerova bolest ranog početka 53,3% (8/15)
- Frontotemporalna demencija 40% (6/15)
- Blagi kognitivni poremećaj 6,7% (1/15).

Positivnu porodičnu anamnezu je imalo 35,1% (20/57) bolesnika. U okviru porodičnih slučajeva analizirana su tri para srodnika od kojih su dva para sestra/sestra i jedan par brat/sestra. Za ostale familijarne slučajeve, dostupni srodnici su naknadno ciljano analizirani metodom sekvenciranja po Sangeru (ukupno 21 srodnik). Demografski i klinički podaci o bolesnicima uključenim u ovu studiju dati su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1: Demografski i klinički podaci o bolesnicima uključenim u ovu studiju

Demografski i klinički podaci	Poremećaji pokreta	Kognitivni poremećaji
Broj bolesnika	42 (36 nesrodnih i tri para srodnika)	15
Odnos polova; M:Ž	17:25	4:11
Prosečna starost, godine	37,1	55,4
Prosečne godine početka bolesti	26,8	51,5

M-muško, Ž-žensko

4.2. Rezultati analize panela klinički egzom

U ovoj studiji, upotrebom panela klinički egzom za detekciju genskih varijanti u kodirajućim regionima 4813 gena, analizirano je ukupno 57 bolesnika sa retkim neurodegenerativnim oboljenjima. Odnosno, analizirano je 42 (36 nesrodnih i tri para srodnika) bolesnika sa poremećajima pokreta i 15 bolesnika sa kognitivnim poremećajima. Detektovani smo 11 jednonukleotidnih patoloških varijanti kod devet bolesnika, čime je postignut ukupan dijagnostički prinos od 16,7%.

4.2.1. Identifikovane varijante i stopa detekcije kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima

Analizom panela klinički egzom detektovane su 3 uzročne varijante kod 4 bolesnika sa kognitivnim poremećajem. Kod preostalih slučajeva sa kognitivnim poremećajima, uključenih u ovu studiju, nisu nađene varijante koje bi opravdale njihovu kliničku sliku i stoga njihova genetička dijagnoza za sada ostaje nerazjašnjena.

4.2.1.1. Patogene i verovatno patogene varijante kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima

Uzročna varijanta je detektovana kod četiri od 15 nesrodnih bolesnika sa kognitivnim poremećajima, što predstavlja dijagnostički prinos od 26,7%. Detektovane su ukupno tri jednonukleotidne varijante od čega su dve varijante promenjenog smisla i jedna varijanta bez smisla (engl. *nonsense*) u dva gena povezana sa retkim neurodegenerativnim oboljenjima.

Dve varijante su identifikovane u heterozigotnom obliku u genu povezanom sa autozomno dominantnim oboljenjem (*PSENI* c.416T>C i *PSENI*c.799C>A) dok je jedna varijanta identifikovana u homozigotnom stanju u genu povezanom sa autozomno recesivnim oboljenjima (*OPTN* c.403G>T). Dalje, jedna varijanta je nova (*PSENI* c.799C>A), dok su preostale dve varijante prethodno opisane u literaturi i/ili su prijavljene u dostupnim bazama podataka. Detaljan prikaz detektovanih uzročnih varijanti kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima dat je u tabeli 4.2.

Kod slučajeva sa *OPTN* homozigotnom varijantom asimptomatski i simptomatski srodnici su bili testirani i potvrđena je prisutnost varijante u njihovim uzorcima (ukupno šest srodnika). Kod asimptomatskih srodnika potvrđena je prisutnost varijante u heterozigotnom stanju, a kod jednog simptomatskog srodnika potvrđena je prisutnost varijante u homozigotnom stanju.

Svi bolesnici koji su nosioci navedenih uzročnih varijanti su imali kliničku prezentaciju bolesti u skladu sa fenotipom opisanim za dati gen. Glavne kliničke karakteristike ovih bolesnika su prikazane u tabeli 4.3 zajedno sa OMIM brojevima (Hamosh *et al.*, 2005) datim za njihovu finalnu genetičku dijagnozu postavljenu u ovoj studiji.

Prema preporukama i standardima Američkog koledža za medicinsku genomiku i Asocijacije za molekularnu patologiju sve tri varijante su okarakterisane kao patogene.

Tabela 4.2: Detektovane varijante koje predstavljaju verovatni genetički uzrok bolesti kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima

Naziv gena	HGVS	Tip varijante, molekularna posledica i mesto varijante	Klinička značajnost/ Klasifikacija varijante*	Učestalost varijanti kod 200 zdravih kontrola iz Srbije	GnomAD v2.1 i 3.1 baze MAF	ClinVar pristupni broj #	Teoretske predikcije za date varijante	Tip nasleđivanja/zigotnost	Reference	Nova varijanta
<i>PSEN1</i>	<i>NM_000021.4, c.416T>C, p.M139T</i>	<i>SNV, missense, egzon</i>	<i>Patogena-5</i>	<i>0</i>	<i>Nije prijavljena</i>	<i>SCV001478336.1</i>	<i>MutationTaster: disease causing, CADD: 25.7, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging</i>	<i>AD/het</i>	<i>ClinVar98023; HGMD:CM951067; LOVD:PSEN1_000247; Champion et al., 1995; Queralt et al., 2001; Lleó et al., 2002; Jin et al., 2012; Xiao et al., 2021</i>	<i>Ne</i>
<i>PSEN1</i>	<i>NM_000021.4, c.799C>A, p.P267T</i>	<i>SNV, missense, egzon</i>	<i>Patogena-5</i>	<i>0</i>	<i>Nije prijavljena</i>	<i>SCV001450773.1</i>	<i>MutationTaster: disease causing, CADD: 25.7, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging</i>	<i>AD/het</i>	<i>/</i>	<i>Da</i>
<i>OPTN</i>	<i>NM_021980.4, c.403G>T, p.E135X</i>	<i>SNV, nonsense, egzon</i>	<i>Patogena-5</i>	<i>0</i>	<i>0.0000398</i>	<i>SCV001805843.1</i>	<i>MutationTaster: disease causing automatic, CADD: 35</i>	<i>AR/hom</i>	<i>ClinVar631627; Müller et al., 2018</i>	<i>Ne</i>

SNV-jednonukleotidna varijanta (engl. *single nucleotide variant*), AD: autozomno dominantno, AR: autozomno recesivno; het-heterozigot, hom-homozigot; g-godine; M-muško, Ž-žensko; *klasifikacija prema smernicama i preporukama ACMG/AMP asocijacije (Richards *et al.*, 2015); #brojevi podnesaka za date varijante deponovane u ClinVar bazu podataka; CADD v1.6-predložen cutoff za patogenost je između 10 i 20; MAF- učestalost ređeg alela (engl. *minor allele frequency*)

Tabela 4.3: Kliničke karakteristike bolesnika sa kognitivnim poremećajima i pozitivnim genetičkim nalazom

Br. bolesnika	HGVS	Starost, g; Pol	Klinička slika bolesnika sa patološkom varijantom u datom genu	Završna dijagnoza	Porodična istorija bolesti
1	<i>PSEN1</i> :NM_000021.4, c.416T>C, p.M139T	49; Ž	Demencija	Alchajmerova bolest ranog početka (OMIM:607822)	Pozitivna
2	<i>PSEN1</i> :NM_000021.4, c.799C>A, p.P267T	66;M	Demencija, anksioznost, vrtoglavica, promene u ponašanju	Alchajmerova bolest ranog početka (OMIM:607822)	Pozitivna
3	<i>OPTN</i> :NM_021980.4, c.403G>T, p.E135X	56; Ž	Demencija, kvadriplegija, afazija,	Frontotemporalna demencija (OMIM:613435)	Pozitivna
4	<i>OPTN</i> :NM_021980.4, c.403G>T, p.E135X	54; Ž	Demencija, afazija, disfagija, depresija	Frontotemporalna demencija (OMIM:613435)	Pozitivna

g-godine; M-muško, Ž-žensko

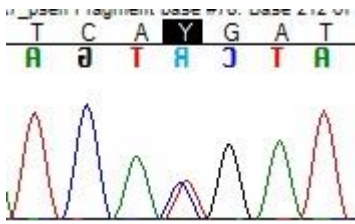
4.2.1.1.1. Opisi slučajeva sa patogenim i verovatno patogenim varijantama

4.2.1.1.1.1. Prikaz bolesnika sa c.416T>C *PSEN1* varijantom

Bolesnik br. 1 je ženskog pola, starosti 49 godina. Postavljena joj je dijagnoza Alchajmerove bolesti ranog početka, međutim njena detaljna klinička slika nam nije bila dostupna. U porodičnoj anamnezi ima dosta obolelih srodnika u tri generacije (dva ujaka, dve tetke, majka i baka po majci) sa dijagnozom Alchajmerove bolesti ranog početka. Svi navedeni članovi porodice su preminuli i njihova klinička slika nam nije dostupna, kao ni uzorci za molekularno-genetičku analizu.

Analizom panela klinički egzom detektovana je poznata patogena jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta p.Met139Thr (c.416T>C, NM_000021.4) u egzonu 5 gena *PSEN1*.

Varijanta je potvrđena u uzorku probanda metodom sekvenciranja po Sangeru (slika 4.1).

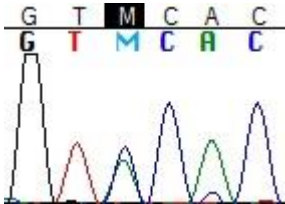


Slika 4.1: Elektroferogramski prikaz heterozigotne c.416T>C varijante u genu *PSEN1*.

4.2.1.1.1.2. Prikaz bolesnika sa c.799C>A *PSEN1* varijantom

Bolesnik br. 2 je muškog pola, starosti 66 godina. Prvi znak bolesti je ispoljio kada je imao 52 godine u vidu kognitivnog pogoršanja. Tada mu je postavljena klinička dijagnoza Alchajmerove bolesti ranog početka. U posljednjih nekoliko godina doživio je značajno oštećenje pamćenja, anksioznost, vrtoglavicu, drhtanje ruku i celog tela i promene u ponašanju. Njegov otac i sestra su oboleli od demencije i umrli sa 65, odnosno 62 godine (njihova klinička slika nam nije dostupna, kao ni uzorci za molekularno-genetičku analizu).

Analizom panela klinički egzom detektovana je nova patogena jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta p.Pro267Thr (c.799C>A, NM_000021.4) u egzonu 8 gena *PSEN1*. Varijanta je potvrđena u uzorku probanda metodom sekvenciranja po Sangeru (slika 4.2).



Slika 4.2: Elektroferogramski prikaz heterozigotne c.799C>A varijante u genu *PSEN1*.

4.2.1.1.1.3. Prikazi bolesnika sa c.403G>T *OPTN* varijantom

Bolesnik br. 3 je ženskog pola, starosti 56 godina. Pokazala je prve znake bolesti u svojoj 54 godini kada je primetila česte padove bez gubitaka svesti i slabost nogu, kao da je vukla levu nogu, koja je brzo napredovala, što je rezultiralo kvadriplegijom. Pored toga, pogoršao se njen govor i kognitivne sposobnosti. MMSE 13/30. Postavljena joj je klinička dijagnoza frontotemporalne demencije. Ima pozitivnu porodičnu istoriju bolesti, odnosno imala je dva brata sa simptomima demencije, afazije i kvadriplegijom. Oba brata su preminula u svojim pedesetim godinama. Njihovi uzorci DNK nam nisu bili dostupni za analizu.

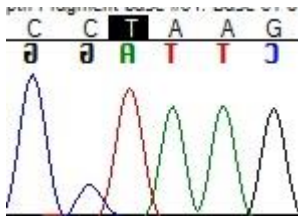
Analizom panela klinički egzom detektovana je poznata patogena jednonukleotidna homozigotna *nonsense* varijanta p.Glu135X (c.403G>T, NM_021980.4) u egzonu 5 gena *OPTN*.

Varijanta je najpre potvrđena u uzorku probanda metodom sekvenciranja po Sangeru (slika 4.3). Potom su analizirani uzorci petoro asimptomatskih članova porodice gde je pokazano da su svi heterozigotni nosioci date varijante u genu *OPTN*.

Bolesnik br. 4 je ženskog pola, starosti 54 godine. Njena klinička slika se karakteriše afazijom, zaboravom, disfagijom, depresijom. Na poslednjem pregledu pre tri godine nije mogla sama da hoda. Postavljena joj je klinička dijagnoza agramatičke forme primarno progresivne afazije.

Analizom panela klinički egzom detektovana je poznata patogena jednonukleotidna homozigotna *nonsense* varijanta p.Glu135X (c.403G>T, NM_021980.4) u egzonu 5 gena *OPTN*.

Varijanta je najpre potvrđena u uzorku probanda metodom sekvenciranja po Sangeru. Potom je testirana njena 50-godišnja sestra kojoj je postavljena klinička dijagnoza amiotrofične lateralne skleroze. Njena klinička slika se odlikuje spastičnim dizartričnim govorom, spastičnom paraparezom hoda. Sekvenciranjem po Sangeru utvrđeno je da je i ona nosilac iste homozigotne *OPTN* varijante.



Slika 4.3: Elektroferogramski prikaz homozigotne c.403G>T varijante u genu *OPTN*.

4.2.2. Identifikovane varijante i stopa detekcije kod bolesnika sa poremećajima pokreta

Analizom panela klinički egzom detektovano je osam uzročnih varijanti kod pet bolesnika sa poremećajem pokreta. Pored toga, detektovane su tri VUS varijante kod tri bolesnika i jedna heterozigotna varijanta u genu koji je povezan sa autozomno recesivnim oboljenjem kod jednog para srodnika. Kod preostalih slučajeva sa poremećajima pokreta, uključenih u ovu studiju, nisu nađene varijante koje bi opravdale njihovu kliničku sliku i stoga njihova genetička dijagnoza za sada ostaje nerazjašnjena.

4.2.2.1. Patogene i verovatno patogene varijante kod bolesnika sa poremećajima pokreta

Detektovan je verovatni genetički uzrok kod pet nesrodnih bolesnika sa poremećajima pokreta, što predstavlja dijagnostički prinos od 12,8%. Otkriveno je osam različitih jednonukleotidnih varijanti u pet različitih gena povezanih sa retkim neurodegenerativnim oboljenjima. Od tih osam, sedam je *missense* varijanti a jedna je u mestu splajsovanja (engl. *splice site*).

Jedna varijanta je nađena u heterozigotnom obliku u genu povezanom sa autozomno dominantnim oboljenjem (*TUBB4A* c.1174T>C). Sedam varijanti je locirano u genima povezanim sa autozomno recesivnim oboljenjima, gde je šest varijanti nađeno u složenom heterozigotnom stanju (*MFSD8* c.923A>G/c.754+2T>A, *PANK2* c.1583C>T/c.1213T>G i *ARSA* c.763G>A/ c.542T>G), a jedna u homozigotnom obliku (*SETX* c.5825T>C). Dalje, tri varijante su nove (*TUBB4A* c.1174T>C, *MFSD8* c.923A>G i *PANK2* c.1213T>G), dok su ostale varijante prethodno opisane u literaturi i/ili su prijavljene u dostupnim bazama podataka. Detaljni podaci o detektovanim patogenim i verovatno patogenim varijantama prikazani su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4: Detektovane varijante koje predstavljaju verovatni genetički uzrok bolesti kod bolesnika sa poremećajima pokreta

Naziv gena	HGVS	Tip varijante, molekularna posledica i mesto varijante	Klinička značajnost/ Klasifikacija varijante*	Učestalost varijanti kod 200 zdravih kontrola iz Srbije	GnomAD v2.1 i 3.1 baze MAF	ClinVar pristupni broj [#]	Teoretske predikcije za date varijante	Tip nasleđivanja /zigotnost	Reference	Nova varijanta
TUBB4A	NM_001289123.1; c.1174T>C, p.F392L	SNV, missense, egzon	Verovatno patogena-4	0	Nije prijavljena	SCV001366277.2	MutationTaster: disease causing, CADD: 26.2, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging	AD/het	/	Da
MFSD8	NM_001371596.2, c.923A>G, p.Y308C / c.754+2T>A	SNV, missense, egzon / SNV, splajs mesto, intron	Verovatno patogena-4 / patogena-5	0	0.000003980 / 0.00001064	SCV001367704.2 / SCV001368442.2	MutationTaster: disease causing, CADD: 23.2, MetaLR: tolerated, REVEL: benign; Polyphen: probably damaging / MutationTaster: disease causing, CADD: 33	AR/složeni het	/ /LOVD:MFSD8_000002; HGMD:CS073501; ClinVar65897; Baralle and Baralle, 2005; Siintola et al., 2007; Kousi et al., 2012; Maggi et al., 2021	Da / Ne
PANK2	NM_153638.3; c.1583C>T, p.T528M / c.1213T>G, p.Y405D	SNV, missense, egzon / SNV, missense, egzon	Patogena-5 / patogena-5	0	0.00001414 / nije prijavljena	SCV001481972.1 / SCV001468673.1	MutationTaster: disease causing automatic, CADD: 26.7, MetaLR: damaging, REVEL: benign; Polyphen: possibly damaging / MutationTaster: disease causing, CADD: 22, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging	AR/složeni het	ClinVar4556; HGMD:CM014249; Zhou et al., 2001; Hayflick et al., 2003; Hartig et al., 2006; Wu et al., 2013; Paraskevas et al., 2017	Ne / Da
SETX	NM_015046.6; c.5825T>C, p.I1942T	SNV, missense, egzon	Verovatno patogena-4	1	0.00001195	SCV001479302.1	MutationTaster: disease causing, CADD: 26.1, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging	AR/hom	LOVD:SETX_000103; ClinVar807687; HGMD:CM169967; Brugger et al., 2014; Lašuthová et al., 2016; Marelli et al., 2016	Ne
ARSA	NM_000487.6; c.763G>A, p.E255K / c.542T>G, p.I181S	SNV, missense, egzon / SNV, missense, egzon	Patogena-5 / patogena-5	0	0.000003983 / 0.0002903	SCV001832551.1 / SCV001837608.1	MutationTaster: disease causing automatic, CADD: 26.9, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging / MutationTaster: disease causing automatic, CADD: 25.8, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic; Polyphen: probably damaging	AR/složeni het	LOVD:ARSA_000021; ClinVar3091; HGMD:CM024340; Regis et al., 2002; Grossi et al., 2008; Biffi et al., 2008 / LOVD:ARSA_000115; ClinVar3057; HGMD:CM910051; Berger et al., 1997; Ługowska et al., 2005; Luzzi et al., 2013; Cesani et al., 2016; Stoeck et al., 2016; Beerepoot et al., 2020	Ne / Ne

SNV-jednonukleotidna varijanta (engl. *single nucleotide variant*), AD: autozomno dominantno, AR: autozomno recesivno; het-heterozigot, hom-homozigot;

*klasifikacija prema smernicama i preporukama ACMG/AMP asocijacije (Richards et al., 2015); [#]brojevi podnesaka za date varijante deponovane u ClinVar bazu podataka; CADDv1.6-predložen cutoff za patogenost je između 10 i 20; MAF- učestalost ređeg alela (engl. *minor allele frequency*)

Kod slučajeva sa *PANK2* i *MFSD8* varijantama, uzorci oba roditelja oba probanda su bili ispitani sekvenciranjem po Sangeru. Utvrđeno je prisustvo varijanti u heterozigotnom obliku kod svakog roditelja. Time je potvrđeno prisustvo varijanti kod oba probanda u složenom heterozigotnom stanju. Za ostale slučajeve, uzorci roditelja nisu bili dostupni za analizu. Međutim, kod dva slučaja (slučajevi sa *SETX* i *TUBB4A* varijantama) srodnici su bili testirani (ukupno sedam srodnika).

Svi bolesnici koji su nosioci navedenih uzročnih varijanti su imali kliničku prezentaciju bolesti u skladu sa fenotipom opisanim za dati gen. Glavne kliničke karakteristike ovih bolesnika su prikazane u tabeli 4.5 zajedno sa OMIM brojevima (Hamosh *et al.*, 2005) za njihovu finalnu genetičku dijagnozu postavljenu u ovoj studiji.

Prema preporukama i standardima Američkog koledža za medicinsku genomiku i Asocijacije za molekularnu patologiju pet varijanti je okarakterisano kao patogeno, dok su preostale varijante okarakterisane kao verovatno patogene.

U kohorti 200 zdravih kontrola iz Srbije, samo je *SETX* varijanta nađena u heterozigotnom stanju kod jedne zdrave kontrole, dok su druge varijante iz ove grupe bile odsutne u kontrolnim uzorcima.

Tabela 4.5: Kliničke karakteristike bolesnika sa poremećajima pokreta i pozitivnim genetičkim nalazom

Br. bolesnika	HGVS	Starost, g; Pol	Klinička slika bolesnika sa patološkom varijantom u datom genu	Završna dijagnoza	Porodična istorija bolesti
1	<i>TUBB4A</i> :NM_001289123.1; c.1174T>C, p.F392L	56; Ž	<i>Distonija, kognitivne i bihevioralne promene</i>	<i>Distonija tip 4 (OMIM:128101)</i>	<i>Pozitivna</i>
2	<i>MFSD8</i> :NM_001371596.2, c.923A>G, p.Y308C / c.754+2T>A	14; Ž	<i>Ataksija, epilepsija, vertigo, proteunurija</i>	<i>Neuronalna, ceroidna lipofuscinoza, tip 7 (OMIM:610951)</i>	<i>Negativna</i>
3	<i>PANK2</i> :NM_153638.3; c.1583C>T, p.T528M / c.1213T>G, p. Y405D	32; Ž	<i>Hipomimija, disfagija, distonija, ("eye-of-the-tiger" MRI nalaz)</i>	<i>Neurodegeneracija povezana sa pantotenat kinazom (OMIM:234200)</i>	<i>Negativna</i>
4	<i>SETX</i> :NM_015046.6; c.5825T>C, p.I1942T	35; M	<i>Ataksija, oculomotorna apraksija</i>	<i>Autozomno recesivna spinocerebelarna ataksija sa aksonalnom neuropatijom, tip 2 (OMIM:606002)</i>	<i>Pozitivna</i>
5	<i>ARSA</i> :NM_000487.6; c.763G>A, p.E255K /c.542T>G, p.I181S	46; Ž	<i>Horea, nevoljni pokreti glave, kognitivni poremećaj, leukodistrofija</i>	<i>Metachromatic leukodystrophy (OMIM:250100)</i>	<i>Negativna</i>

g-godine; M-muško, Ž-žensko

4.2.2.1.1. Opisi slučajeva sa patogenim i verovatno patogenim varijantama

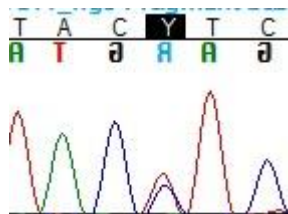
4.2.2.1.1.1. Prikaz bolesnika sa c.1021T>C *TUBB4A* varijantom

Bolesnik br. 1 je ženskog pola, starosti 56 godina. Prve simptome bolesti je primetila u dobi od 51 godine kao nemogućnost glatkog izgovaranja reči, koje se pogoršalo s vremenom. Takođe, primetila je i nestabilnost u hodu, česta padanja bez gubitka svesti, slabost leve polovine lica i tela i teškoće sa gutanjem. Članovi porodice su primetili i značajne kognitivne promene kao i izmene u ponašanju. Na poslednjem kontrolnom nalazu ustanovljeno je da su padovi sve učestaliji, uz izraženiju nestabilnost pri hodu, loše spava, neraspoloženija je, sve nerazumljivije govori i otežano guta. MRI nalaz endokranijuma i kičme pokazao je pojačan intezitet signala duž kortikospinalnog trakta sa obe strane od motornog korteksa do ponsa i u lateralnim kolumnama medule od nivoa C2 do C5 kičmenih pršljenova. MMSE 22/30. Neuropsihološko testiranje je ukazalo na bifrontalno oštećenje.

Analizom panela klinički egzom detektovana je nova, verovatno patogena, jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta p.Phe341Leu (c.1021T>C, NM_006087.4) u egzonu 4 gena *TUBB4A*.

Varijanta je potvrđena najpre u uzorku probanda metodom sekvenciranja po Sangeru (Slika 4.4), a potom su testirani i simptomatski i asimptomatski članovi porodice. Rođena sestra koja ima simptome neurološke bolesti je pozitivna na prisustvo varijante p.Phe341Leu, kao i njena ćerka koja takođe ima simptome. Dalje, testirani su asimptomatski članovi (dve rođene sestre kao i dva sina od sestre koja je pozitivna) i rezultat DNK analize na prisustvo varijante p.Phe341Leu je bio negativan. Od tri asimptomatska brata nijedan nije testiran. Međutim, jedan brat je takođe imao znake distonije. Patio je od generalizovane distonije i preminuo je u kasnim pedesetim. Nažalost, njegov DNK uzorak nije dostupan za potvrdu prisustva varijante. Ostali članovi porodice nisu testirani i nisu prijavili znakove neuroloških poremećaja.

Zanimljivo je da ovaj gen nije uključen u CE panel od 4813 gena. Da bismo bili sigurni da je varijanta prisutna u genu *TUBB4A*, najpre je potvrđeno njeno prisustvo u uzorku probanda sekvenciranjem po Sangeru. Potom smo uradili poređenje sekvence koja je dobijena nakon Sangerovog sekvenciranja sa *online* (<http://www.ensembl.org/index.html>) (Howe *et al.*, 2021) dostupnom sekvencom gena *TUBB4A*, kao i sekvencom gena *TUBB2B* koji je po sekvenci veoma sličan *TUBB4A* genu. U tu svrhu korišćen je BLAST program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) čime je dobijena 100% usklađenost sa *TUBB4A* genom i 97% sa *TUBB2B* kao i sa genom *TUBB2A* koji je iz iste porodice. Takođe smo poredili prajmere sa *TUBB4A* genom, pseudogenom i genima iz *TUBB* porodice i pokazalo se da uzvodni prajmer nije specifičan, ali nizvodni prajmer jeste. Pokazao je identičnost u nukleotidnoj sekvenci sa genom *TUBB4A* i sličnost sa pseudogenom i genima iz *TUBB* porodice.

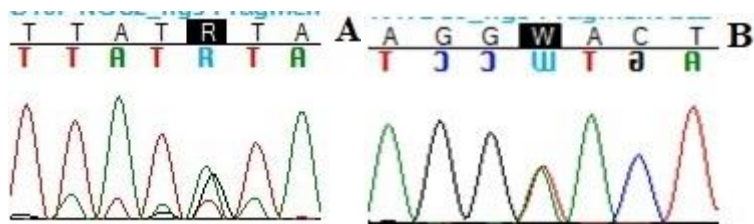


Slika 4.4: Elektroferogramski prikaz heterozigotne promene c.1174T>C u genu *TUBB4A*.

4.2.2.1.1.2. Prikaz bolesnika sa c.923A>G i c.754+2T>A *MFSD8* varijantama

Bolesnik br. 2 je ženskog pola, starosti 14 godina. Razvila je prve znake bolesti pre šest godina kada je doživela gubitak vida praćen devijacijom glave i pogleda u stranu i pulsirajućom levostranom glavoboljom. Takvi događaji su se dešavali samo u budnom stanju i obično su bili izazvani gledanjem u svetlost. EEG je potvrdio epileptične napade koji su lečeni. Poslednji napad je bio pre 3 godine i tada je doživela i napade vrtoglavice. Sa razvojem epilepsije primetila je i nespretnost i nestabilnost hodanja. Takođe je razvila ataksiju i žalila se na napade vrtoglavice. MRI pregled mozga registruje globalne reduktivne promene i atrofiju malog mozga. IQ skor je 89, u kategoriji niske prosečne inteligencije.

Analizom panela klinički egzom detektovane su nova, verovatno patogena jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta p.Tyr308Cys (c.923A>G, NM_152778.2) u egzonu 9 i poznata patogena jednonukleotidna heterozigotna *splice site* varijanta u mestu za iskrajanje introna 7 (c.754+2T>A, NM_001371596.2) gena *MFSD8*. Varijante su potvrđene metodom sekvenciranja po Sangeru najpre u uzorku probanda (Slika 4.5), a potom i u uzorcima roditelja za koje se utvrdilo da su heterozigotni nosioci po jedne varijante. Patogene i verovatno patogene homozigotne i složene heterozigotne varijante su u osnovi teške autozomno recesivne neuronalne ceroidne lipofuscinoze, tip 7 (OMIM: 610951).



Slika 4.5: Elektroferogramski prikazi heterozigotne c.923A>G varijante (A) i heterozigotne c.754+2T>A varijante (B) u genu *MFSD8*.

4.2.2.1.1.3. Prikaz bolesnika sa c.1583C>T i c.1213T>G *PANK2* varijantama

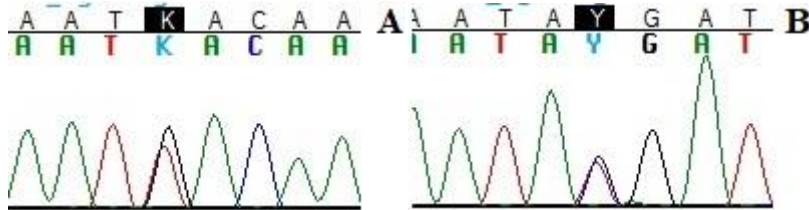
Bolesnik br. 3 je ženskog pola, starosti 32 godine. Od svoje 20 godine je na lečenju kod psihijatra zbog depresije. Tada je primetila probleme sa govorom, žvakanjem i čestim padovima unazad. Tri godine kasnije pojavila se urgentna inkontinencija koja se postepeno pogoršavala. Tokom godina, imala je sporo napredovanje simptoma i postepeno, ali blago pogoršanje hoda, govora i posturalne stabilnosti.

Posle nekoliko godina bolesti, magnetna rezonanca mozga (engl. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) otkrila je akumulaciju gvožđa u bilateralnom globusu pallidusu i putamenu koja daje karakterističan izgled tigrovog oka na MRI-u (*eye-of-the-tiger*). Na osnovu ovakvog nalaza dijagnostikovana joj je PKAN. Pored toga, ispoljavala je znake hipomimije, disfagije, tahilalije, teške distonične dizartrije, umerene distonije ruku i nogu, posturalne nestabilnosti i smanjene vidne oštine. Tetivni refleksi su bili živahni, znak Babinskog negativan. Hod je bio nestabilan. Cerebelarni znaci i Rombergov test su negativni. MMSE 30/30. Dvanaest godina nakon pojave simptoma i dalje je mogla da hoda bez pomoći i da se brine o sebi. Njen psihološki status je u trenutku pregleda bio u granicama normale bez simptoma depresije.

Početno ciljano sekvenciranje odabranih egzona gena *PANK2* otkrilo je poznatu patogenu jednonukleotidnu *missense* varijantu p.Thr528Met (c.1583C>T) u egzonu 6, u heterozigotnom stanju. Pored toga, analizom panela klinički egzom detektovana je nova verovatno patogena jednonukleotidna

missense varijanta p.Tyr405Asp (c.1213T>G) u egzonu 3 gena *PANK2*, takođe kao heterozigotna promena.

Varijante su najpre potvrđene u uzorku probanda (slika 4.6) a potom su analizirani i uzorci roditelja i brata gde je pokazano da su otac i brat heterozigotni nosioci poznate p.Thr528Met (c.1583C>T) patološke varijante, dok je majka heterozigotni nosilac novoopisane p.Tyr405Asp (c.1213T>G) verovatno patogene varijante.



Slika 4.6: Elektroferogramski prikazi heterozigotne c.1213T>G varijante (A) i heterozigotne c.1583C>T varijante (B) u genu *PANK2*.

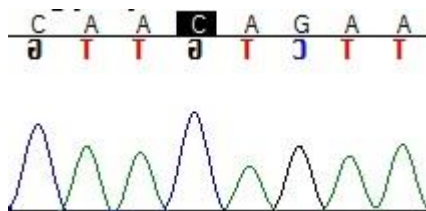
4.2.2.1.1.4. Prikaz bolesnika sa c.5825T>C *SETX* varijantom

Bolesnik br. 4 je muškog pola, star 35 godina. Pošto nam njegova detaljna klinička prezentacija nije dostupna (ne dolazi na redovne doktorske preglede) ovde je predstavljena klinička slika njegove rođake koja kao i naš proband ima postavljenu kliničku dijagnozu ataksije. Stara je 46 godina i prve znake bolesti pokazala je kada je imala 26 godina. Tada je primetila peckanje desne ruke koje se proširilo na celu ruku i desnu nogu. Ubrzo nakon toga počela je nestabilnost u hodu. U poslednjih nekoliko godina nestabilnost hodanja je napredovala sa pojavom čestih padova (2-3 puta dnevno). Uz to, osetila je i jake bolove u rukama i nogama. Elektrofiziološkim ispitivanjem otkrivena je simetrična, umerena, motorna i demijelizaciona polineuropatija. MRI mozga je pokazao atrofiju vermisa, a laboratorijska ispitivanja su pokazala povišene nivoe alfa fetoproteina (AFP) u serumu (46,1 ng/mL; (0-7)).

Analizom panela klinički egzom detektovana je poznata, verovatno patogena jednonukleotidna homozigotna *missense* varijanta p.Ile1942Thr (c.5825T>C, NM_015046.6) u egzonu 14 gena *SETX*.

Patogene homozigotne i složene heterozigotne varijante u genu *SETX* su poznati uzročnici autozomno recesivne spinocerebelarne ataksije sa aksonalnom neuropatijom, tip 2 (OMIM:606002). Potvrda otkrivene *SETX* varijante je urađena metodom sekvenciranja po Sangeru najpre u uzorku probanda (slika 4.7) a potom i u uzorku srodnika (prikazana rođaka).

Genotipizacija roditelja nije izvršena. Stoga nije isključena mogućnost složene heterozigotnosti varijanti (prisustvo delecije egzona ili gena na drugom alelu).



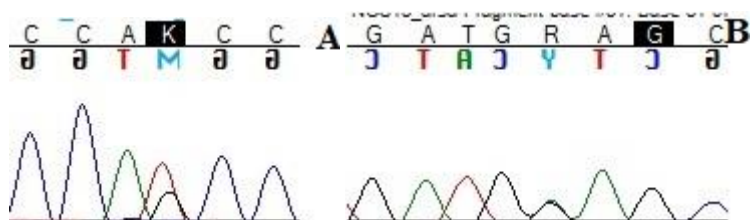
Slika 4.7: Elektroferogramski prikaz homozigotne c.5825T>C varijante u genu *SETX*.

4.2.2.1.1.5. Prikaz bolesnika sa c.542T>G i c.763G>A ARSA varijantama

Bolesnik br. 5 je ženskog pola, starosti 46 godina. Nedavno je razvila nevoljne pokrete glave sa kognitivnim oštećenjem. Neurološkim pregledom primećuju se tremor vokalizacije, vremenska dezorijentacija i poremećaj kratkotrajnog pamćenja, kao i brzi pokreti glave i vrata koji podsećaju na horeične pokrete, uz prisustvo tikova. Smanjena aktivnost enzima arilsulfataze A u serumu (3,2 nmol / h / mL (3,6-9,4)) uz njenu kompletnu kliničku sliku i radiološki nalaz ukazivali su na metahromatsku leukodistrofiju koja je i potvrđena genetičkim nalazom.

Analizom panela klinički egzom detektovane su dve poznate patogene jednonukleotidne heterozigotne *misense* varijante p.Ile181Ser (c.542T>G, NM_001085425.3) u egzonu 3 i p.Glu255Lys (c.763G>A, NM_001085425.3) u egzonu 4 gena ARSA.

Obe varijante su potvrđene u uzorku probanda metodom sekvenciranja po Sangeru (slika 4.8).



Slika 4.8: Elektroferogramski prikazi heterozigotne c.542T>G varijante (A) i heterozigotne c.763G>A varijante (B) u genu ARSA.

4.2.2.2. Varijante nejasnog značaja kod bolesnika sa poremećajima pokreta

Pored patogenih i verovatno patogenih/uzročnih varijanti, u ovoj studiji smo detektovali i tri VUS varijante kod tri nesrodna bolesnika. Sve tri varijante su bile u heterozigotnom obliku, od toga dve u genima povezanim sa autozomno dominantnim oboljenjima (*DCTN1* c.1732G>A i *PDGFB* c.716T>C), a jedna u genu povezanom sa autozomno dominantnim i sa autozomno recesivnim oboljenjima (*POLG* c.3151G>C). Potencijalni značaj ovih varijanti kod bolesnika sa motornim poremećajima ostaje nepoznat i potrebno je više dokaza/informacija kako bi se takve varijante okarakterisale ili kao patogene ili kao benigne. Kod bolesnika sa varijantama nejasnog značaja druga potencijalno uzročna varijanta u dubokim intronskim i promotorskim regionima ili kompleksne strukturne promene se ne mogu isključiti.

4.2.2.2.1. Opisi slučajeva sa varijantama nejasnog značaja

4.2.2.2.1.1. Prikaz bolesnika sa c.716T>C PDGFB varijantom

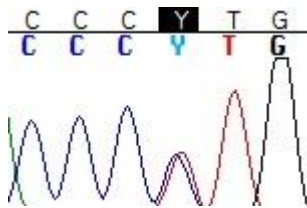
Bolesnik br. 1 je muškog pola, star 65 godina. Ima 20-godišnju istoriju generalizovane distonije. Prvi znaci bolesti u vidu okretanja očiju ulevo i nagore, kao i nevoljnih pokreta palca leve ruke tokom obroka, javili su se u njegovim četrdesetim godinama. Nekoliko meseci nakon toga bolest je napredovala, navodi da je izgubio kontrolu nad levom nogom, dolazilo je do nevoljnih uvijanja, a tegobe su se pogoršavale tokom hodanja. Hod je kompromitovan distoničkim pokretima. CT endokranijuma: U moždanom parenhimu se ne vide anomalije gustine. Sistem komora je uredne širine i

oblika. Subarahnoidalni prostori iznad baze i konveksnosti su naglašeni kao deo kortikalnih reduktivnih promena. MR glave: pregled ukazuje na simetrične lezije putamena otvorene etiologije, moguće kao deo osnovne bolesti (distonije).

Analizom panela klinički egzom detektovana je nova jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta nejasnog značaja p.Leu239Pro (c.716T>C, NM_002608.2) u egzonu 6 gena *PDGFB*. Ova promena se nalazi u populacionoj bazi podataka gnomAD Exomes (njena učestalost je procenjena na 0,00000657%). Odsutna je u bazama vezanim za bolesti LOVD i HGMD. Varijanta nije pronađena u 200 zdravih kontrola iz Srbije. Varijanta je deponovana u ClinVar bazu podataka (podnesak br. 930299). *In silico* predikcionim softverima je okarakterisana kao verovatno patološka (tabela 4.6). Varijanta se nalazi u očuvanom regionu gena.

Patogene i verovatno patogene heterozigotne varijante u genu *PDGFB* su poznati uzrok idiopatske kalcifikacije bazalnih ganglija, tip 5 (IBGC5).

Potvrda NGS detektovane *PDGFB* varijante u uzorku probanda je urađena sekvenciranjem po Sangeru (slika 4.9).



Slika 4.9: Elektroferogramski prikaz heterozigotne c.716T>C u genu *PDGFB*.

4.2.2.2.1.2. Prikaz bolesnika sa c.1732G>A *DCTN1* varijantom

Bolesnik br. 2 je muškog pola, star 17 godina. Rođen je u normalnoj trudnoći, sa normalnim razvojem. Porodična istorija je negativna. Bio je potpuno funkcionalan do 12. godine, kada su roditelji primetili nesiguran hod, smanjenje snage u nogama i manje smetnje u govoru. Neurološki pregled je otkrio disimetrične sakade, vertikalnu supranuklearnu paralizu pogleda, kvadratne trzaje i cerebelarnu dizartriju. Bolesnik se žalio na blage probleme sa gutanjem. Cerebelarni znaci su bili pozitivni na gornjim i donjim ekstremitetima. Tetivni refleksi su bili živahni; Babinski znak- negativan. Otkriven je spastično-ataksičan hod na široj osnovi. Rombergov test je bio negativan. MMSE 30/30.

MRI mozga (T2v FLAIR) otkrio je opsežne promene. Elektromioneurografija (EMNG) na gornjim i donjim udovima je bila normalna. Standardni biohemijski pregledi, bris krvi na akantocite i ispitivanje na Vilsonovu bolest nisu otkrili nikakve abnormalnosti.

Analizom panela klinički egzom detektovana je nova jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta nejasnog značaja p.Val578Met (c.1732G>A, NM_004082) u egzonu 16 gena *DCTN1*. Varijanta nije zabeležena u bazi podataka populacijskih genetičkih varijacija - dbSNP v138 i nije bila prisutna među 138.000 kontrola gnomAD projekta, ExAC i 1000G, a takođe je odsutna u bazama vezanim za bolesti LOVD i HGMD. Varijanta nije pronađena ni u 200 zdravih kontrola iz Srbije. Varijanta je deponovana u ClinVar bazu podataka (podnesak br. 930984). *In silico* predikcionim softverima je okarakterisana kao patološka (tabela 4.6). Varijanta se nalazi u očuvanom regionu gena. Metodom sekvenciranja po Sangeru varijanta je potvrđena u uzorku probanda ali je testiranjem uzoraka roditelja otkrivena i kod klinički asimptomatske majke bolesnika (slika 4.10).



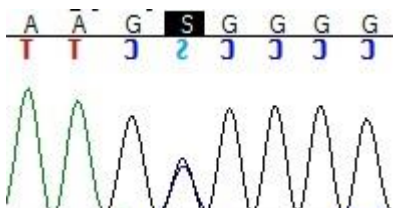
Slika 4.10: Elektroferogramski prikaz heterozigotne c.1732G>A u genu *DCTN1*.

4.2.2.2.1.3. Prikaz bolesnika sa c.3151G>C *POLG* varijantom

Bolesnik br. 3 je muškog pola, star 32 godine. Prvi put je zatražio medicinsku pomoć sa 29 godina zbog trogodišnje medicinske istorije teškoća u govoru, nestabilnosti hoda i blage ataksije. Doživio je i česte padove zbog nestabilnosti. Njegova majka i baka sa majčine strane imaju iste simptome bolesti.

Analizom panela klinički egzom detektovana je poznata patogena jednonukleotidna heterozigotna *missense* varijanta p.Gly1051Arg (c.3151G>C, NM_001126131.2) u egzonu 20 gena *POLG*. Ova promena se nalazi u populacionoj bazi podataka gnomAD Exomes (njena učestalost je procenjena na 0,0000199 %) i prisutna je u ClinVar bazi podataka pod pristupnim brojem 13501 i okarakterisana je kao verovatno patogena. Varijanta je takođe opisana i u literaturi (tabela 4.6). Varijanta nije otkrivena u kohorti od 200 zdravih kontrola iz Srbije. Prema *in silico* predviđanju, p.Gli1051Arg (c.3151G>C) je okarakterisana kao patološka.

Varijanta je najpre potvrđena metodom sekvenciranja po Sangeru u uzorku probanda a potom i u uzorku majke (slika 4.11). Baka po majci nije testirana.



Slika 4.11: Elektroferogramski prikaz heterozigotne c.3151G>C u genu *POLG*.

Tabela 4.6: Detektovane varijante nejasnog značaja kod bolesnika sa poremećajima pokreta

Naziv gena	HGVS	Tip varijante, molekularna posledica i mesto varijante	Klinička značajnost/ Klasifikacija varijante*	Učestalost varijanti kod 200 zdravih kontrola iz Srbije	GnomAD v2.1 i 3.1 baze MAF	ClinVar pristupni broj #	Teoretske predikcije za date varijante	Tip nasleđivanja /zigotnost	Reference	Nova varijanta
<i>PDGFB</i>	<i>NM_002608.2, c.716T>C, p.Leu239Pro</i>	SNV, missense, egzon	Varijanta nejasnog značaja-3	0	0.0000657	SCV001366278.2	<i>MutationTaster: disease causing, CADD:28.2, MetaLR: tolerated, REVEL: benign, Polyphen: probably damaging</i>	AD/het	/	Da
<i>DCTN1</i>	<i>NM_004082, c.1732G>A, p.Val578Met</i>	SNV, missense, egzon	Varijanta nejasnog značaja-3	0	Nije prijavljena	SCV001367698.2	<i>MutationTaster: disease causing, CADD: 28.8, MetaLR: damaging, REVEL:benign, Polyphen:probably damaging</i>	AD/het	/	Da
<i>POLG</i>	<i>NM_001126131.2, c.3151G>C, p.Gly1051Arg</i>	SNV, missense, egzon	Varijanta nejasnog značaja-3	0	0.0000199	Nije prijavljena	<i>MutationTaster: disease causing automatic, CADD: 27.6, MetaLR: damaging, REVEL: pathogenic, Polyphen: probably damaging</i>	AD i AR/het	<i>ClinVar13501; Mancuso et al., 2004; Baruffini et al., 2007; Stumpf et al., 2010</i>	Ne

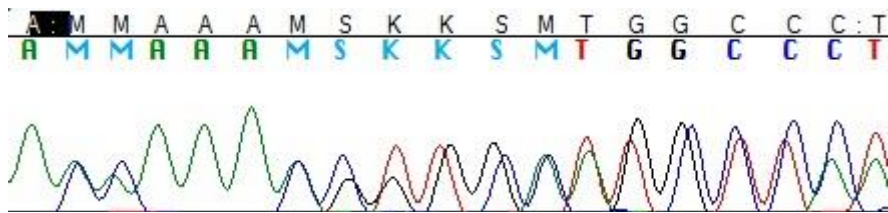
SNV-jednonukleotidna varijanta (engl. *single nucleotide variant*), AD: autozomno dominantno, AR: autozomno recesivno; het-heterozigot; *klasifikacija prema smernicama i preporukama ACMG/AMP asocijacije (Richards et al., 2015); #brojevi podnesaka za date varijante deponovane u ClinVar bazu podataka; CADDv1.6-predloženi cutoff za patogenost je između 10 i 20; MAF- učestalost ređeg alela (engl. *minor allele frequency*)

4.2.2.2.2. Analiza parova srodnika

Kod tri para srodnika uključenih u ovu studiju nije detektovan zajednički uzrok bolesti. Analizom panela klinički egzom detektovana je jedna zajednička nova verovatno patogena heterozigotna duplikacija p.Gln4004ThrfsTer65 (c.12009dupA, NM_182961.3) kod samo jednog para srodnika sa ataksijom u klinički relevantnom genu *SYNE*. Radi se o bratu starosti 47 godina i sestri starosti 55 godina sa istorijom cerebelarne ataksije, nestabilnošću hoda, problemima u govoru i promenjenim rukopisom. U porodičnoj anamnezi navodi se da imaju i sestru koja takođe ima slične simptome, kao i da je očevoj ujak imao ataksičan hod. Roditelji su asimptomatski. Niko od navedenih srodnika nije neurološki i genetički ispitivan.

Varijanta je deponovana u ClinVar bazu podataka (podnesak br. 930980). Varijanta je potvrđena u uzorcima oba probanda metodom sekvenciranja po Sangeru (slika 4.12).

Kod navedenog para srodnika druga potencijalno uzročna varijanta u dubokim intronskim i promotorskim regionima ili kompleksne strukturne promene se ne mogu isključiti.



Slika 4.12: Elektroferogramski prikaz heterozigotne c.12009dupA u genu *SYNE1*.

4.3. Algoritam za genetičko testiranje bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije

Imajući u vidu definisane ciljeve ovog istraživanja i dobijene rezultate mogu se formirati preporuke za testiranje bolesnika sa kognitivnim poremećajima i poremećajima pokreta u srpskoj populaciji, primenom NGS panela “klinički egzom”.

1. Od ukupnog broja bolesnika sa pozitivnim genetičkim nalazom (njih devet) šest je bilo familijarnih i tri sporadična slučaja, što ukazuje na veću stopu nalaženja verovatnog genetičkog uzroka kod familijarnih slučajeva;

2. Kod većine bolesnika sa pozitivnim genetičkim nalazom, prethodno urađen radiološki i biohemijski nalaz je ukazivao na dato oboljenje ili specifičnu grupu oboljenja, što je dodatno olakšalo analizu dobijenih podataka;

3. Kod bolesnika sa poremećajima pokreta pokazano je da je veći dijagnostički prinos kod onih sa ranijim početkom bolesti (odnosno prosek početka bolesti kod genetički pozitivnih bolesnika je 32,2 godine, a kod genetički negativnih je 38 godina), dok je kod bolesnika sa kognitivnim poremećajima taj odnos skoro isti (odnosno 52,75 je prosek godina kod genetički pozitivnih, dok je kod genetički negativnih prosek godina 51).

4. Dodatno, kod bolesnika kod kojih je postojao neki specifičan klinički znak bolesti kao kod bolesnika sa *SETX* varijantom (prisustvo okulomotorne apraksije) je pomoglo u otkrivanju genetičkog uzroka.

Na osnovu uočenog može se obrazovati algoritam za praktični rad.

4.4. Algoritam za bioinformatičku analizu podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom kod bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije

U ovoj studiji analiza dobijenih rezultata NGS metodom vršena je uz pomoć dostupne platforme za analizu, odnosno Illuminog Variant studio softvera (Shema 3.1, A) kao i uz pomoć prethodno razvijenog toka rada na Institutu za medicinsku genomiku, UKCLJ, Ljubljana (Maver *et al.*, 2016 i Bergant *et al.*, 2018) (Shema 3.1, B). Analizom podataka uz pomoć oba pristupa nađen je isti rezultat, osim kod jednog bolesnika. Naime, u ovoj studiji, pomoću Illuminog Variant studio softvera nađene su uzročne patološke varijante kod osam bolesnika od devet opisanih bolesnika sa patološkim varijantama. Kod dodatnog, devetog bolesnika sa varijantom u genu *TUBB4A*, varijanta je otkrivena uz pomoć pomenutog razvijenog niza softvera za analizu. Na taj način je povećan dijagnostički prinos za jednog bolesnika, odnosno rešena je dijagnostička odiseja jedne čitave porodice.

5. DISKUSIJA

Zbog kompleksnosti kliničke prezentacije različitih neuroloških oboljenja, doći do tačne dijagnoze je i dalje izazov. U svrhu postavljanja precizne dijagnoze se pored kliničke evaluacije, raznih biohemijskih i radioloških testova sve više primenjuju i genetički testovi. U poslednje vreme, NGS čini jedan od glavnih alata za brzo uspostavljanje genetičke dijagnoze.

S obzirom na monogensku prirodu velikog broja ovih bolesti opravdano je genetičko testiranje i stoga su NGS testovi široko primenjeni za neurodegenerativne bolesti. Veliki deo neurodegenerativnih bolesti čine kognitivni poremećaji i poremećaji pokreta. Razvijen je veliki broj NGS testova za genetičko dijagnostikovanje ove dve vrste poremećaja.

5.1. Kognitivni poremećaji

Sekvenciranje različitih genskih panela omogućava testiranje skoro svih poznatih glavnih genetičkih uzročnika demencija istovremeno (Hinz and Geschwind 2017). NGS značajno smanjuje vreme dobijanja genetičke dijagnoze kod bolesnika u poređenju sa testiranjem pojedinačnih gena i može takođe da smanji troškove asociirane sa više dijagnostičkih testova. Dodatno, mogućnost istovremene analize većeg broja gena znači da brojne bolesti sa varijabilnom ekspresijom a koje nisu uzete u obzir kao diferencijalne dijagnoze na osnovu kliničke slike bolesnika, mogu biti istraživane istovremeno (Hinz and Geschwind 2017).

Prethodne studije koje su koristile NGS metode pokazale su da se patološke varijante detektuju kod 12-13% bolesnika sa demencijom sa ranim početkom bolesti sa ili bez porodične istorije, posebno u genu *PSEN1* (Koriath *et al.*, 2020; Lacour *et al.*, 2019). Treba istaći da kod slučajeva bez porodične istorije bolesti takođe može postojati genetički uzrok. Demencija se može pokazati kao sporadična u slučajevima kada je autozomno recesivan uzrok bolesti bez aficiranih srodnika (*NPC1* patološke varijante), kod X-vezanih bolesti (*UBQLN2* patološke varijante) sa blagim simptomima kod srodnika ili bez drugih aficiranih srodnika koji se mogu pratiti, neka mitohondrijalna genetička oboljenja (kao što je MELAS), anticipacija kod bolesti ponovaka (*C9ORF72* ekspanzije), *de novo* nastale promene kada patološka varijanta nastane po prvi put kod probanda (npr. *PSEN1*), kao i kod nekompletne porodične istorije sa prevremenim smrtnim slučajevima ili nedostatak tačne nedvosmislene dijagnoze.

Naslednu formu AB ranog početka u odnosu na sporadičnu formu karakterišu raniji početak bolesti, agresivniji tok, prisustvo neuroloških simptoma poput epilepsije, mioklonusa, glavobolja i drugih. Kod nasledne forme klinička slika se na početku bolesti karakteriše gubitkom pamćenja, dok prisustvo npr. bihevioralnih ispada sugerise da je u pitanju sporadična forma AB ranog početka (Cacace and Van Broeckhoven 2016; Lerner 2013).

U našoj studiji testirali smo 15 bolesnika sa kognitivnim poremećajima i analizom panela klinički egzom postignut je dijagnostički prinos od 26,7% (četiri genetički pozitivna). Slični rezultati dobijeni su u prethodnoj studiji koja se bavila analizom panela klinički egzom kod bolesnika sa neselektovanim demencijama gde je postignut dijagnostički prinos od 33% (Zalar *et al.*, 2018). Kod nedijagnostikovanih slučajeva sa kognitivnim poremećajima, patološke varijante mogu biti locirane u nekodirajućim regionima, kao što su regulatorni ili duboki intronski regioni. Takođe, uzrok bolesti kod ovih slučajeva mogu biti i varijacije u broju kopija koje nije moguće detektovati analizom panela klinički egzom uz primenu ovde korišćenih softvera. Ne može se isključiti ni mogućnost da su uzročne varijante u genima koji

nisu obuhvaćeni panelom klinički egzom. Stoga se u ovim slučajevima može predložiti proširena analiza većeg broja gena poput WES-a najpre, a onda i WGS-a.

5.1.1. Patogene varijante

Detektovane su ukupno tri jednonukleotidne varijante kod četiri nesrodna probanda (*PSEN1* c.416T>C, *PSEN1* c.799C>A i *OPTN* c.403G>T) i kod ovih bolesnika genetički nalazi su u skladu sa njihovim kliničkim fenotipovima.

Patološke varijante detektovane u genu *PSEN1* predstavljaju uzrok bolesti kod dva bolesnika sa ranim početkom Alchajmerove bolesti (Tabela 4.3: slučaj br.1 i slučaj br.2). Njihova klinička slika i porodična istorija bolesti su ukazivale na postojanje patološke varijante u genu *PSEN1* čime je znatno olakšana analiza podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom. Do sada je opisano više od 300 uzročnih varijanti u genu *PSEN1* (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>).

Detektovana varijanta *PSEN1* c.416T>C je opisana kod većeg broja nesrodnih bolesnika sa Alchajmerovom bolešću kao patološka (Campion *et al.*, 1995; Queralt *et al.*, 2001; Lleó *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2021). Ova promena dovodi do aminokiselinske zamene metionina u treonin na poziciji 139 lociranoj u drugom transmembranskom domenu (TM-II) proteina PSEN1. Više različitih aminokiselinskih zamena opisano je na istoj poziciji (p.M139K, p.M139L, p.M139I, p.M139V) kod sporadičnih slučajeva i porodica sa ranom AB (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>; Lanoiselée *et al.*, 2017; Boteva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2016) što ukazuje da je ova pozicija najverovatnije “vruće mesto” (engl. *hot spot*) za mutaciju (Queralt *et al.*, 2001). Pokazano je da se verovatni biološki efekat ove varijante ogleda u povećanju nivoa Aβ1-42 u ćelijama i da ova varijanta može uzrokovati AB stimulišući isecanje Aβ sekvence posredovano γ-sekretazom na aminokiselinskoj poziciji 42 (Portelius *et al.*, 2012).

Varijanta *PSEN1* c.799C>A, detektovana kod našeg drugog bolesnika sa ranom AB, dovodi do aminokiselinske zamene prolina u treonin na poziciji 267 proteina PSEN1 lociranoj u unutarćelijskoj petlji između transmembranskih domena 6 i 7. Ova promena je nova, odnosno nije do sada opisana kod bolesnika sa demencijom. Međutim, druge aminokiselinske zamene su opisane na istoj poziciji (p.P267A, p.P267S, p.P267L) kod bolesnika sa ranom AB (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>; Ringman *et al.*, 2016; Ben-Gedalya *et al.*, 2015). Takođe, c.799C>A varijanta se nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena, nije prijavljena u gnomAD kohorti (Karczewski *et al.*, 2020) kao ni u našoj kohorti od 200 zdravih individua, što sve ukazuje na verovatno patogenu prirodu date varijante. Što se tiče biološke uloge p.P267 varijanti, pokazano je da učestvuju u redukcivanju sazrevanja PSEN1 i abnormalne mitohondrijalne aktivnosti (Ben-Gedalya *et al.*, 2015).

Kod dve bolesnice sa frontotemporalnom demencijom detektovana je ista patološka varijanta u genu *OPTN* (Tabela 4.3: slučaj br.3 i slučaj br.4). S obzirom na činjenicu da su patološke varijante u genima *GRN*, *MAPT* i *C9ORF72* u većini slučajeva opisanih u literaturi zadužene za nastanak ove bolesti, u našoj studiji je pokazano drugačije. Patološke varijante u genu *OPTN* su povezane sa nastankom ne samo frontotemporalne demencije (Pottier *et al.*, 2015) nego i amiotrofične lateralne skleroze (Maruyama *et al.*, 2010). *OPTN* detektovana varijanta (c.403G>T) kod naših ispitanika je opisana u literaturi, ali kod bolesnika sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom (Müller *et al.*, 2018). Tako da naše bolesnice predstavljaju prve slučajeve sa ovom varijantom koje imaju frontotemporalnu demenciju. Još jedno značajno otkriće je i to da rođena sestra jednog probanda (slučaj br. 4) sa *OPTN* varijantom ima postavljenu kliničku dijagnozu amiotrofične lateralne skleroze. Poznat je komorbiditet između FTD-a i ALS-a, odnosno pojava da ALS bolesnici ispoljavaju znake

FTD-a i suprotno (Lillo and Hodges 2009), a takođe je poznato i da oboleli članovi porodice sa istom varijantom ispoljavaju drugačiji fenotip. Primer postojanja ALS-FTD fenotipa kod iste individue je opisan u literaturi kod bolesnika sa *OPTN* varijantama, ali ne i sa c.403G>T varijantom (Pottier *et al.*, 2018). Dodatno, prema našim saznanjima nisu opisani slučajevi postojanja dva različita fenotipa kod članova jedne porodice sa c.403G>T varijantom. Tako da, ovo predstavlja i prvi slučaj gde je detektovana c.403G>T *OPTN* varijanta kod dve obolele sestre koje ispoljavaju različit fenotip. Ovim našim nalazom smo svakako povećali broj varijanti asociranih sa FTD, a takođe smo i potvrdili da ALS i FTD imaju preklapajuću genetičku osnovu (Taes *et al.*, 2010).

S obzirom na činjenicu da je po prvi put *OPTN* varijanta c.403G>T opisana kod dva izabrana nesrodna probanda sa FTD-om i jednim srodnikom FTD probanda sa ALS-om u populaciji Srbije, postoji mogućnost da se radi o efektu osnivača (engl. *founder effect*). U tom slučaju bi dalja ispitivanja išla u pravcu utvrđivanja potencijalnih novih bolesnika sa varijantama u genu *OPTN* kako bi se ova pretpostavka potvrdila. Takođe, za gene u osnovi FTD-a poznata je različita geografska zastupljenost pa je tako predominantna zastupljenost *GRN* varijanti u Severnoj Italiji (Borroni *et al.*, 2011) i Baskiji (Barandiaran *et al.*, 2012). Stoga, istraživanja bi mogla ići i u smeru razjašnjenja pretpostavke da su *OPTN* varijante geografski više zastupljene na našim prostorima.

5.2. Poremećaji pokreta

Poremećaji pokreta su klinički i genetički raznolika grupa neuroloških poremećaja koji predstavljaju značajan uzrok bolesti i smrti. Zbog složenosti kliničkih slika i genetičkih uzroka kod različitih poremećaja pokreta, brzo postavljanje tačne dijagnoze kod bolesnika i dalje predstavlja veliki izazov (Federico 2013). NGS tehnologija je omogućila velike, brze i jeftine analize genoma i u velikoj meri je primenjena na poremećaje pokreta (Foo *et al.*, 2012). Postoje različiti paneli gena NGS-a i glavna razlika između njih je broj gena koji se analizira (Xue *et al.*, 2015). Upotreba manjih genskih panela je pogodnija za manje genetičke centre sa ograničenim resursima. Takođe, obim podataka dobijenih sa manjim genskim panelima je manji nego sa WES/WGS, što čini interpretaciju podataka lakšom i bržom (Reale *et al.*, 2018; Montaut *et al.*, 2018).

Ciljani NGS je do sada pokazao sličan dijagnostički prinos kao sekvenciranje egzoma za različite poremećaje, uključujući intelektualnu onesposobljenost (25%) (Redin *et al.*, 2014), mitohondrijalne poremećaje (22%) (Lieber *et al.*, 2013), cerebelarne ataksije (18%) (Németh *et al.*, 2013) i spastičnu paraplegiju (17%) (van de Warrenburg *et al.*, 2016). Zajedno, ove studije pokazuju da je ciljano sekvenciranje korišćenjem NGS panela poznatih gena povezanih sa bolestima odgovarajući kompromis između pouzdanosti i prinosa (Németh *et al.*, 2013; van de Warrenburg *et al.*, 2016; Sikkema-Raddatz *et al.*, 2013).

U našoj studiji, dijagnostička moć panela kliničkog egzoma koji se sastoji od 4813 gena je analizirana kod bolesnika sa poremećajima pokreta. Analizirali smo 36 nesrodnih bolesnika i tri para braće i sestara kojima su dijagnostikovani različiti poremećaji pokreta. Genotipovi koji uzrokuju bolest otkriveni su kod pet nesrodnih probanada, odnosno dobijen je dijagnostički prinos od 12,82%. Studije koje su uključivale bolesnike sa različitim poremećajima pokreta, slično dizajnu naše studije, koristeći različite male panele gena, prijavile su dijagnostičke prinose od 11,3% (Reale *et al.*, 2018) i 22% (Montaut *et al.*, 2018). Kod nedijagnostikovanih slučajeva sa poremećajima pokreta, patološke varijante mogu biti locirane u nekodirajućim regionima, kao što su regulatorni ili duboki intronski regioni. Takođe, uzrok bolesti kod ovih slučajeva mogu biti i varijacije u broju kopija koje nije

moгуće detektovati analizom panela klinički egzom uz primenu ovde korišćenih softvera. Ne može se isključiti ni mogućnost da su uzročne varijante u genima koji nisu obuhvaćeni panelom klinički egzom. Stoga se i u ovim slučajevima može predložiti proširena analiza većeg broja gena poput WES-a najpre, a onda i WGS-a.

5.2.1. Patogene i verovatno patogene varijante

Detektovano je ukupno osam jednonukleotidnih varijanti kod pet nesrodnih probanda (*TUBB4A* c.1174T>C, *MFSD8* c.923A>G i c.754+2T>A, *PANK2* c.1583C>T i c.1213T>G, *SETX* c.5825T>C, *ARSA* c.763G>A i c.542T>G) i kod ovih bolesnika genetički nalazi su u skladu sa njihovim kliničkim fenotipovima.

Detektovana varijanta *TUBB4A* c.1174T>C je nova, odnosno nije do sada opisana, nalazi se u evoluciono očuvanom regionu gena, odsutna je iz populacije zdravih kontrola (Karczewski *et al.*, 2020) i naše kohorte od 200 zdravih individua, a takođe je i okarakterisana kao patogena prema teorijskim predikcijama patogenosti (Tabela 4.4). U ovom genu su opisane druge varijante koje su povezane sa distonijom tip 4 kod bolesnika čija se klinička slika manifestovala prisustvom spazmodične distonije, izmenama u ponašanju i intelektualnim poteškoćama (Blumkin *et al.*, 2014) što je vrlo slično kliničkoj prezentaciji bolesti kod našeg probanda sa c.1174T>C varijantom. Bolesnica sa *TUBB4A* verovatno patogenom varijantom (Tabela 4.5, slučaj br.1) je član porodice sa istorijom neuroloških oboljenja. Rođenom bratu probanda je postavljena klinička dijagnoza distonije. On je preminuo i nažalost njegova DNK nam nije bila dostupna za analizu. Rođena sestra probanda kao i ćerka te sestre takođe imaju neuroloških smetnji i obe su analizirane. Rezultat je bio pozitivan na prisustvo iste verovatno patogene varijante u genu *TUBB4A*. Nekoliko asimptomatskih članova porodice je testirano na prisustvo ove promene u genu *TUBB4A* i njihovi rezultati su negativni. Međutim, funkcionalne studije će biti neophodne da bi se definitivno definisala patogenost opisane varijante.

Posebna zanimljivost u vezi sa ovim slučajem jeste da je varijanta detektovana u genu koji nije u panelu klinički egzom. Dakle, u panel, koji se sastoji od 4813 klinički relevantnih gena, uključeni su neki geni iz *TUBB* porodice (*TUBB1*, *TUBB2B*, *TUBB3*) ali ne i gen *TUBB4A*. On je naknadno uvršten u prošireni panel koji se sastoji od 6794 klinički relevantnih gena. Pretpostavka je da su podaci dobijeni za gen *TUBB4A* tako što su se u toku pripreme biblioteke probe dizajnirane da se komplementarno sparuju sa genom *TUBB2B* hibridizovale sa fragmentima gena *TUBB4A* zbog velike sličnosti u sekvenci ova dva gena i da su tako dobijeni podaci i za taj gen. Druga mogućnost je da je takođe zbog sličnosti sekvenci BWA algoritam, koji je korišćen za poravnavanje u toku obrade podataka, poravnao dobijene kratke sekvence sa *TUBB4A* genom pored poravnavanja sa *TUBB2B* genom. Ova varijanta u genu *TUBB4A* je otkrivena uz pomoć razvijenog niza softvera za analizu na Institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani, čime je pokazana prednost ovakve bioinformatičke analize u odnosu na analizu uz pomoć dostupnih platformi.

Kod bolesnice sa varijantama u genu *MFSD8* (Tabela 4.5, slučaj br. 2) radi se o slučaju sa vrlo kompleksnim fenotipom gde je postavljeno više različitih kliničkih dijagnoza. Pretpostavka je bila da se radi o oboljenjima vezanim za uzročne varijante u genu *POLG*. Međutim, analizom panela klinički egzom, otkrivene su dve heterozigotne *in trans* uzročne varijante (c.923A>G i c.754+2T>A) u genu *MFSD8* koje su u osnovi neuronalne ceroidne lipofuscinoze tip 7 (engl. *Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal, 7, CLN7*) (OMIM: 610951), oboljenja sličnog po kliničkim karakteristikama *POLG* vezanim oboljenjima. Klinička prezentacija *CLN7* obuhvata ataksiju, epileptične napade, progresivni gubitak vida sa

početkom bolesti najčešće između druge i sedme godine života (Haltia 2003; Topçu *et al.*, 2004), što je u skladu sa kliničkom manifestacijom bolesti našeg probanda.

Varijanta c.923A>G nije do sada opisana kod ljudi i dovodi do aminokiselinske zamene tirozina u cistein na poziciji 308 proteina MFSD8. Varijanta nije zabeležena u gnomAD kohorti u homozigotnom obliku (Karczewski *et al.*, 2020), a takođe je odsutna i iz naše kontrolne grupe. Ne može se isključiti prisustvo varijante u populaciji zdravih kontrola u složenom heterozigotnom obliku sa drugim patogenom varijantom.

Druga detektovana varijanta u genu *MFSD8* (c.754+2T>A) je opisana kod većeg broja bolesnika sa neuronalnom ceroidnom lipofuscinozom tip 7 (Maggi *et al.*, 2021; Kousi *et al.*, 2012; Sintola *et al.*, 2007; Baralle and Baralle 2005). Eksperimentalne studije su pokazale da ova varijanta dovodi do promene u donorskom mestu konsenzusne sekvence za iskrcavanje introna (Sintola *et al.*, 2007). Ovakve varijante tipično dovode do gubitka funkcije proteina (Baralle and Baralle 2005), što je slučaj i kod MFSD8 (Aiello *et al.*, 2009). Varijanta nije zabeležena u gnomAD kohorti u homozigotnom obliku (Karczewski *et al.*, 2020), a takođe je odsutna i iz naše kontrolne grupe. Ne može se isključiti prisustvo varijante u populaciji zdravih kontrola u složenom heterozigotnom obliku sa drugim patogenom varijantom.

Varijante su potvrđene u uzorcima roditelja, gde je pokazano da su oni nosioci po jedne heterozigotne *MFSD8* varijante.

Kod slučajeva sa uzročnim varijantama u genima *PANK2*, *SETX* i *ARSA* genetička analiza je bila značajno olakšana zbog prethodno pozitivnih radioloških i biohemijskih analiza.

Kod bolesnice sa *PANK2* varijantama (Tabela 4.5: slučaj br. 3) karakterističan nalaz na MRI (*eye-of-the-tiger*) ukazivao je da se radi o PKAN oboljenju što je genetičkim testovima i potvrđeno. Dakle, nakon detaljnog kliničkog pregleda, biohemijskih analiza, urađena je i magnetna rezonanca mozga koja je ukazala na moguće deponovanje gvožđa u određenim regijama mozga. Standardnim genetičkim testom (sekvenciranje po Sangeru egzona 5 i 6 gena *PANK2*) otkrivena je jedna heterozigotna najčešća patološka varijanta (c.1583C>T). Dalje, analizom panela klinički egzom detektovana je i druga uzročna varijanta (c.1213T>G) u ovom genu čime je potvrđeno da bolesnica ima neurodegeneraciju povezanu sa pantotenat kinazom.

Detektovana *PANK2* c.1583C>T varijanta je opisana kod većeg broja nesrodnih bolesnika sa PKAN-om (Zhou *et al.*, 2001; Hayflick *et al.*, 2003; Hartig *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013; Paraskevas *et al.*, 2017), a takođe i u srpskoj populaciji kao najčešća patološka varijanta u genu *PANK2* (Hartig *et al.*, 2006; Svetel *et al.*, 2019) kod bolesnika sa PKAN-om. Štaviše, pokazano je da je *PANK2* c.1583C>T varijanta osnivačka mutacija u našoj populaciji (Svetel *et al.*, 2019). Ova promena dovodi do aminokiselinske zamene treonina u metionin na poziciji 528 lociranoj u katalitičkom domenu enzima PANK2. Varijanta nije zabeležena u gnomAD kohorti u homozigotnom obliku (Karczewski *et al.*, 2020), a takođe je odsutna i iz naše kontrolne grupe. Ne može se isključiti prisustvo varijante u populaciji zdravih kontrola u složenom heterozigotnom obliku sa drugim patogenom varijantom.

Druga detektovana *PANK2* c.1213T>G varijanta je nova, odnosno nije opisana u literaturi. Ova promena dovodi do aminokiselinske zamene tirozina u aspartat na poziciji 405 lociranoj u proteinu PANK2 i nije prisutna u našoj i gnomAD kohorti (Karczewski *et al.*, 2020). Prema teorijskim predikcijama patogenosti okarakterisana je kao patološka, a takođe se nalazi u evolutivno očuvanom regionu gena. U neposrednoj blizini ove varijante opisana je patološka varijanta (p.Asn404Ile) kod bolesnika sa PKAN-om (Morales-Briceño *et al.*, 2015; Diaz 2013). Varijante su potvrđene u uzorcima roditelja, gde je pokazano da su oni nosioci po jedne heterozigotne *PANK2* varijante.

U slučaju *SETX* varijante detektovane najpre kod probanda sa ataksijom (Tabela 4.5: slučaj br. 4), njegova klinička slika nam nije bila dostupna zbog izostajanja sa redovnih lekarskih kontrola. Međutim, njegova rođaka sa simptomima ataksije je testirana na prisustvo

date varijante i njen nalaz se pokazao kao pozitivan. Ona je u svojoj kliničkoj slici imala razvijenu ataksiju sa okulomotorom apraksijom, polineuropatiju i povišen nivo enzima alfa-fetoproteina. Homozigotne i složene heterozigotne varijante u genu *SETX* su u osnovi autozomno recesivne ataksije sa aksonalnom neuropatijom tip 2 koja se još označava i kao ataksija sa okulomotorom apraksijom (engl. *Ataxia with Oculomotor Apraxia*, AOA) (iako samo 50% bolesnika ima okulomotoru apraksiju). AOA se takođe karakteriše početkom bolesti pre tridesete godine, cerebelarnom ataksijom, polineuropatijom i povišenim nivoom serumskog alfa-fetoproteina (Anheim *et al.*, 2009). Za razliku od nekoliko drugih autozomno recesivnih cerebelarnih ataksija sindroma, nivo alfa-fetoproteina je skoro uvek povišen kod AOA2 što sužava listu diferencijalnih dijagnoza (Paucar *et al.*, 2019).

Detektovana *SETX* c.5825T>C varijanta je prethodno opisana kod bolesnika sa AOA (Brugger *et al.*, 2014; Laššuthova *et al.*, 2016; Marelli *et al.*, 2016) i dovodi do aminokiselinske zamene izoleucina u treonin na poziciji 1942. Ova pozicija je visoko evolutivno konzervisana (Adzhubei *et al.*, 2010). Varijanta nije zabeležena u gnomAD kohorti u homozigotnom obliku (Karczewski *et al.*, 2020), pri čemu se ne može isključiti prisustvo varijante u populaciji zdravih kontrola u složenom heterozigotnom obliku sa drugom patogenom varijantom. Kod 200 zdravih kontrola iz Srbije nađena je kod jedne zdrave kontrole u heterozigotnom obliku.

Najzad, bolesnici sa varijantama u genu *ARSA* (Tabela 4.5: slučaj br.5) postavljena je klinička dijagnoza Hantingtonove bolesti zbog prisustva horejičnih pokreta, tikova i kognitivnih smetnji. Standardan genetički test na prisustvo trinukleotidnih ponovaka u genu *HTT* je bio negativan i ukazao da se verovatno ne radi o Hantingtonovoj horeji. Istraživanje je nastavljeno u pravcu biohemijskih i radioloških nalaza. Biohemijski nalazi su pokazali da je prisutna smanjena aktivnost enzima arilsulfataze A (*ARSA*) u serumu, a radiološki nalaz je ukazao na leukodistrofiju (prisustvo depozita lipida u nervnom sistemu). Metahromatska leukodistrofija (*MLD*) (OMIM:250100) je poznata i kao deficijencija arilsulfataze A (*ARSA*) enzima, odnosno bolest nastaje kada usled patoloških promena u genu *ARSA*, dolazi do deficijencije enzima *ARSA* koji razgrađuje lipide koji se formiraju u mijelinu (Austin *et al.*, 1964). Najčešće se karakteriše prisustvom poremećaja pokreta, ponašanja i kognitivnog pada što je u skladu sa kliničkom prezentacijom našeg probanda. Analizom panela klinički egzom je potvrđeno da bolesnica ima metahromatsku leukodistrofiju.

Prva detektovana *ARSA* c.763G>A varijanta je prethodno opisana kod bolesnika sa metahromatskom leukodistrofijom (Biffi *et al.*, 2008; Grossi *et al.*, 2008; Regis *et al.*, 2002) i dovodi do zamene aminokiseline glutamat u lizin na poziciji 255 u proteinu *ARSA*. Varijanta nije zabeležena u gnomAD kohorti u homozigotnom obliku (Karczewski *et al.*, 2020), a takođe je odsutna i iz naše kontrolne grupe. Ne može se isključiti prisustvo varijante u populaciji zdravih kontrola u složenom heterozigotnom obliku sa drugom patogenom varijantom.

Funkcionalne studije su pokazale da je varijanta c.763G>A povezana sa značajnom redukcijom aktivnosti enzima *ARSA* (Regis *et al.*, 2002).

Druga detektovana *ARSA* c.542T>G varijanta je takođe prethodno opisana kod bolesnika sa metahromatskom leukodistrofijom (Berger *et al.*, 1997; Ługowska *et al.*, 2005; Luzi *et al.*, 2013; Cesani *et al.*, 2016; Stoeck *et al.*, 2016; Beerepoot *et al.*, 2020) i dovodi do aminokiselinske zamene izoleucina u serina na poziciji 181 u proteinu *ARSA*. Jedna je od najčešćih varijanti detektovanih u genu *ARSA* i nije zabeležena u gnomAD kohorti u homozigotnom obliku (Karczewski *et al.*, 2020), a takođe je odsutna i iz naše kontrolne grupe. Ne može se isključiti prisustvo varijante u populaciji zdravih kontrola u složenom heterozigotnom obliku sa drugom patogenom varijantom.

I u ovom primeru su funkcionalne studije pokazale redukovanu aktivnost enzima *ARSA* kada je prisutna navedena c.542T>G varijanta (Fluharty *et al.*, 1991). Koliko nam je poznato,

do sada, ove dve heterozigotne varijante, osim kod našeg probanda nisu opisane zajedno u složenom heterozigotnom obliku kod drugih bolesnika.

5.2.2. Varijante nejasnog značaja

Proširivanjem panela gena koji se analiziraju povećava se i šansa detektovanja varijanti nejasnog značaja. To je jedna od glavnih mana većih panela koji se analiziraju i umnogome otežava interpretaciju podataka i samu genetičku analizu i donošenje definitivne odluke o dijagnozi datog bolesnika. U našoj studiji detektovane su tri varijante nejasnog značaja kod bolesnika sa poremećajima pokreta.

Patološke varijante u genu *PDGFB* su u osnovi idiopatske kalcifikacije bazalnih ganglija, tip 5 (IBGC5), koja se obično manifestuje progresivnim neurološkim simptomima koji su povezani sa kalcifikacijama mozga (Keller *et al.*, 2013). Obolele osobe imaju motoričke simptome, kao što su parkinsonizam, teški poremećaj hoda sa zamrzavanjem hoda, diskinezije i psihijatrijske manifestacije (Kostić *et al.*, 2011).

Iako je otkrivena varijanta c.716T>C nova, retka, za koju se predviđa da je patogena pomoću *in silico* alata i nalazi se u očuvanom regionu gena što sve govori u prilog patogenosti varijante, naš bolesnik (Tabela 4.6: slučaj br. 1) nema kalcifikacije mozga koje su patognomonične za IBGC5. Trenutno su dokazi previše ograničeni da bi se utvrdilo da li ova varijanta uzrokuje bolest ili je retka populaciona benigna varijanta. Neophodni su dodatni naučni i klinički dokazi da bi se utvrdila njena značajnost.

Patološke varijante u genu *DCTN1* su poznati uzročnici Perijeveg sindroma (Perry *et al.*, 1975) i distalne nasledne motorne neuropatije, tip 8 (Puls *et al.*, 2003). Naš proband (Tabela 4.6, slučaj br.2) kome je detektovana nova heterozigotna varijanta (c.1732G>A) u genu *DCTN1*, ima neke od simptoma Perijeveg sindroma, ali ne i one patognomonične za ovo oboljenje. Data varijanta je *in silico* predviđena kao patogena od strane većine softvera, odsutna je iz svih kontrolnih populacija i nalazi se u očuvanom regionu gena. Međutim, trenutno ne postoji dovoljno funkcionalnih dokaza o patogenosti varijante. Dok se sve varijante u *DCTN1* povezane sa Perijevevim sindromom do sada nalaze u egzonu 2 (Farrer *et al.*, 2009), naša varijanta se nalazi u egzonu 16. Dalje, varijanta je takođe pronađena kod asimptomatske majke bolesnika, mada je poznata smanjena penetrantnost za ovaj gen (Newsway *et al.*, 2010). Uzimajući sve navedeno u obzir, verovatno je da varijanta nije uzročnik bolesti, a pravi (ako postoji) genetički uzrok bolesti kod ovog probanda je još uvek neutvrđen. Trenutno dostupne informacije su oskudne i stoga je nemoguće sa sigurnošću odrediti da li je detektovana varijanta patogena ili je retka populacijska benigna varijanta. Stoga klasifikujemo varijantu kao varijantu nejasnog značaja.

Bolesniku sa detektovanom *POLG* heterozigotnom opisanom varijantom (c.3151G>C) postavljena je klinička dijagnoza ataksije (Tabela 4.6, slučaj br.3). Poremećaji izazvani patološkim varijantama u genu *POLG* se nasleđuju autozomno recesivno (Alpers-Hutenloherov sindrom (AHS), spektar miocerebrohepatopatije u detinjstvu (MCHS), mioklonična epilepsija, miopatija i senzorna ataksija (MEMSA), spektar neuropatije i ataksije (ANS) i autozomno recesivna spoljašnja progresivna oftalmoplegija, arPEO) i autozomno dominantno (autozomno dominantna progresivna spoljašnja oftalmoplegija, tip 1, adPEO) (Cohen *et al.*, 2010).

Njegova porodična istorija bolesti ukazuje da se najverovatnije radi o dominantnom oboljenju jer su i njegova majka i baka po majci obolele, odnosno imaju simptome ataksije. Majka je testirana i nosilac je iste varijante, dok baka nije testirana. Međutim adPEO kao jedino dominantno oboljenje povezano sa uzročnim heterozigotnim varijantama u genu *POLG* je opisano kod bolesnika sa vrlo teškom kliničkom slikom (Komaki *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002), kakvu naš proband i oboleli srodnici ne ispoljavaju. Dalje, svi do sada opisani slučajevi

sa ovom varijantom u homozigotnom ili složenom heterozigotnom obliku su imali arPEO i tešku kliničku sliku, koja nije u skladu sa kliničkim fenotipom naše porodice (Formichi *et al.*, 2016; Mancuso *et al.*, 2004). Međutim, Mancuso i saradnici su takođe prijavili nekoliko heterozigotnih pojedinaca koji su bili ili potpuno normalni ili oligosimptomatski bez ptoze ili oftalmoplegije sa migrenom i psihijatrijskim poremećajima (Mancuso *et al.*, 2004).

Naša pretpostavka je da bi se naš slučaj mogao objasniti kao redak slučaj fenotipske ekspresije recesivne patološke varijante kod heterozigotnih nosilaca, što bi objasnilo njihovu blažu kliničku sliku. Uzimajući u obzir sve navedeno, trenutno nema dovoljno dokaza da bi otkrivena *POLG* varijantu definisali kao uzrok bolesti u ovoj porodici. Iz tog razloga ovu varijantu klasifikujemo kao varijantu nejasnog značaja.

Kod svih navedenih bolesnika sa varijantama nejasnog značaja neophodni su dalji naučni i klinički dokazi da bi se ustanovila povezanost varijante sa kliničkom dijagnozom bolesnika. Takođe, kod ovih slučajeva ne može se isključiti prisustvo druge varijante koja izaziva bolest u genima koji nisu obuhvaćeni panelom klinički egzom, u dubokim intronskim ili promotorskim regionima ili bilo koje složene strukturne varijante.

5.2.3. Analiza parova srodnika

Od tri para obolelih srodnika (braća, sestre) kod kojih je analiziran panel klinički egzom, samo u jednom paru sa ataksijom otkrivena je zajednička patogena varijanta u klinički relevantnom *SYNE1* genu. Međutim, kod oba bolesnika, primećena je samo varijanta sa jednim alelom kao navodni uzrok autozomno recesivne bolesti. Njihova sestra takođe pokazuje znake bolesti, ali ona nije analizirana u ovoj studiji. Takav pedigree sa asimptomatskim roditeljima sugerise autozomno recesivni obrazac nasleđivanja. Homozogotne ili složene heterozigotne patogene i verovatno patogene varijante u genu *SYNE1* su odgovorne za nastanak autozomno recesivne spinocerebelarne ataksije tip 8 (OMIM:610743) (Gros-Louis *et al.*, 2007).

5.3. Algoritam za genetičko testiranje bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije

Uzrok bolesti kod familijarnih slučajeva je uglavnom genetička patološka varijanta, pa je kod ovih bolesnika veća verovatnoća detekcije uzročne patološke varijante u poređenju sa sporadičnim slučajevima. Kada su u pitanju naši bolesnici pokazano je da je od devet bolesnika sa detektovanom patološkom uzročnom varijantom šest sa porodičnom istorijom bolesti a tri su sporadična slučaja. Odnosno, od 57 bolesnika uključenih u ovu studiju, 20 je sa porodičnom istorijom bolesti od čega je kod njih sedam detektovan genetički uzrok bolesti (35%), a 37 je sporadični slučaj, od čega je kod samo dva bolesnika detektovan genetički uzrok bolesti (5,4%). Naši rezultati su u skladu sa prethodno urađenim studijama gde je takođe pokazan veći dijagnostički prinos kod familijarnih (60%) u odnosu na sporadične slučajeve (24%) (Sun *et al.*, 2021). Međutim, neke studije su pokazale da je veći dijagnostički prinos genetičkog testiranja postignut kod sporadičnih slučajeva (Fogel *et al.*, 2014), što ukazuje na to da su i familijarni i sporadični slučajevi kandidati za genetičko testiranje.

Takođe, uz dodatan biohemijski i radiološki nalaz postavljanje definitivne dijagnoze je znatno olakšano čime se takođe smanjuje i broj diferencijalnih dijagnoza. U ovoj studiji je

kod većine bolesnika sa detektovanom genetičkom uzročnom varijantom neki prethodni nalaz krvi ili radiološki nalaz ukazivao na dato oboljenje. Međutim, u brojnim studijama je pokazano da normalan radiološki nalaz ili biohemijski nalaz krvi, pogotovo u ranom početku bolesti, ne isključuje postojanje datog oboljenja (Chiapparini *et al.*, 2011). To ukazuje na važnost genetičkog testiranja i njegovu prednost u odnosu na druge analize koje se sprovode. Kod bolesnika sa poremećajem pokreta kod najmanje troje njih sa utvrđenim genetičkim uzrokom rezultati radioloških i/ili biohemijskih analiza su ukazivali na dato oboljenje. To su slučaj br. 4 (Tabela 4.5) kod koga je detektovan povišen nivo alfafetoproteina, zatim kod slučaja br. 3 (Tabela 4.5) je postojao specifičan nalaz na MRI (*eye-of-the-tiger*), dok je kod slučaja br. 5 (Tabela 4.5) bila snižena aktivnost enzima arilsulfataze A. U primeru bolesnika sa kognitivnim poremećajima, najčešće je specifičan nalaz na FDG-PET (engl. *Positron Emission Tomography with [18F] fluorodeoxyglucose*, FDG-PET) skeneru govorio u prilog datog oboljenja. Poznato je da se osim po kliničkoj slici, histopatološkim i genetičkim nalazima, AD i FTD razlikuju po hipometabolizmu glukoze koji se uočava FDG-PET skenerom. Tako, kod FTD-a hipometabolizam glukoze je uočen u prednjim regijama, a kod AD-a u zadnjim regijama mozga (Foster *et al.*, 2007).

Uglavnom se smatra da su bolesti ranog početka asocirane sa genetičkim uzrokom a da se bolesti kasnog početka generalno smatraju multifaktorskim (Reitz *et al.*, 2020). U ovoj studiji kod bolesnika sa motornim poremećajima gde je utvrđen genetički uzrok oboljenja prosek godina početka bolesti je 32,2 godine, a kod negativnih je 38 godina. Kod bolesnika sa kognitivnim poremećajem prosek godina početka bolesti je sličan u grupi sa pozitivnim i negativnim genetičkim nalazom (52,75 kod pozitivnih i 51 kod negativnih).

Doprinos rezultata ove studije je, pored uspostavljanja brže i preciznije dijagnoze bolesnicima sa kognitivnim poremećajima i poremećajima pokreta, davanje smernica za opredeljenje u daljoj molekularno genetičkoj dijagnostici bolesnika sa ovim grupama poremećaja. U slučaju postojanja specifičnog fenotipa koji ukazuje na dato oboljenje, kod većeg broja bolesnika može se uraditi analiza panela koji se sastoji od nekoliko gena (*custom panel*). Ciljani NGS genski paneli sa visokom pouzdanošću sekvenciranja i dubokom pokrivenošću uključenih gena, značajno smanjuju troškove i olakšavaju interpretaciju rezultata (Lin *et al.*, 2012). Uzimajući u obzir panel klinički egzom od 4813 gena, glavne prednosti bi bile prihvatljivi finansijski troškovi, obezbeđeni komercijalni kitovi i bioinformatička podrška, manje podataka za analizu i manja verovatnoća detekcije slučajnih nalaza (Okazaki *et al.*, 2016; Chérot *et al.*, 2018; Gieldon *et al.*, 2018; Pajusalu *et al.*, 2018). Glavni nedostatak je što ne može da otkrije nove gene koji izazivaju bolesti, već je ograničen na one poznate. Njegova glavna primena bi bila kod klinički i genetički heterogenih oboljenja, posebno kada postoji manji broj bolesnika određenih fenotipski heterogenih karakteristika. U tom slučaju *custom panel* ne bi bio pogodno rešenje zbog malog broja kandidata za analizu, a sekvenciranje po Sangeru se takođe može isključiti kao opcija ukoliko gen ima veći broj egzona ili ako je više gena u osnovi date bolesti.

Rezultati pojedinih studija su ukazali da se kod Mendelovskih bolesti sekvenciranjem celog egzoma postiže slična detekcija uzročnih varijanti kao i primenom manjih genskih panela, što znači da se upotrebom manjih genskih panela može pokriti više od 98% uzročnih varijanti detektovanih WES-om (LaDuca *et al.*, 2017).

Međutim, iako nije dostupno manjim genetičkim centrima (poput našeg) zbog zahtevne implementacije i interpretacije rezultata, sekvenciranje celog egzoma je korak koji treba uraditi nakon dobijanja negativnih genetičkih rezultata upotrebom prethodno navedenih manjih panela. Brojne studije su pokazale dijagnostički značaj WES-a. Nedavna studija koja je sprovedena na 35 bolesnika iz 22 porodice sa ataksijom a koja je koristila sekvenciranje čitavog egzoma za analizu, postavljena je definitivna molekularna dijagnoza kod 64% porodica (Pyle *et al.*, 2015). U drugoj studiji, koja je takođe obuhvatala bolesnike sa

ataksijom, nađene su klinički relevantne genetičke varijante kod 61% ispitanika upotrebom metode sekvenciranja čitavog egzoma (Fogel *et al.*, 2014). Postoje brojne studije koje su otkrile nove gene u osnovi ataksija (Wang *et al.*, 2010) kao i nove patološke varijante u već poznatim genima povezanim sa ataksijom (Li *et al.*, 2013) koristeći metodu sekvenciranja čitavog egzoma.

5.4. Algoritam za bioinformatičku analizu podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom kod bolesnika sa neurodegenerativnim bolestima u populaciji Srbije

Analiza dobijenih rezultata sekvenciranjem panela klinički egzom rađena je pomoću dostupne platforme za analizu, odnosno Illumina Variant studio softvera kao i uz pomoć prethodno razvijenog toka rada na Institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani. Analizom podataka softverom Variant Studio dobijen je rezultat za osam bolesnika opisanih u ovoj tezi. Kod dodatnog devetog bolesnika (sa varijantom u genu *TUBB4A*) varijanta je otkrivena uz pomoć razvijenog niza softvera za analizu. Mogući razlozi za dobijanje podataka u genu koji nije uključen u panel od 4813 gena dati su u prethodnom poglavlju. U ovom primeru bi mogli zaključiti da u prvom koraku tercijarne analize podataka dobijenih NGS-om možemo primeniti dostupnu platformu za analizu, poput Variant studio softvera, gde bi primenom određenih filtera došli do željenih rezultata. Kod genetički negativnih bolesnika, svakako bi trebalo raditi celokupnu analizu upotrebom toka rada, jer se u našem slučaju to pokazalo kao efikasno iz razloga što smo detektovali varijantu u genu koji nije u panelu klinički egzom. Na taj način smo rešili dijagnostičku odiseju jedne porodice.

U prethodnim studijama pokazana je korisnost softvera Variant Studio u tercijarnoj analizi podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom, gde je ovim pristupom otkriven i novi gen u osnovi poznatog oboljenja (Andjelkovic *et al.*, 2018). Takođe je pokazano i u drugim studijama da je upotreba softvera Variant Studio uspešan deo dijagnostičkog algoritma za detekciju genetičkog uzroka određenih oboljenja (Yamamoto *et al.*, 2016; Stevanovic *et al.*, 2021).

S druge strane korisnost ovde toka rada za analizu podataka pokazana je u brojnim studijama koje su se bavile sekvenciranjem panela klinički egzom, sekvenciranjem celog egzoma i sekvenciranjem celog genoma (Maver *et al.*, 2016; Babić Božović *et al.*, 2021; Bergant *et al.*, 2021).

Prema našim saznanjima ovo bi bila prva sudija u kojoj su korišćena oba načina za analizu podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom i dobijeni rezultati umnogome pomažu u našem daljem izboru metoda za analizu podataka.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti sledeće:

1. U ovom istraživanju bavili smo se utvrđivanjem genetičke osnove kod 15 nesrodnih bolesnika sa kognitivnim poremećajima i 42 bolesnika sa poremećajem pokreta (od kojih su 36 nesrodnih i tri para srodnih bolesnika) analizom panela klinički egzom.

2. Detektovali smo 11 jednonukleotidnih patoloških varijanti kod devet bolesnika (*PSEN1* c.416T>C, *PSEN1* c.799C>A i *OPTN* c.403G>T, *TUBB4A* c.1174T>C, *MFSD8* c.923A>G i c.754+2T>A, *PANK2* c.1583C>T i c.1213T>G, *SETX* c.5825T>C, *ARSA* c.763G>A i c.542T>G), čime je postignut ukupan dijagnostički prinos od 16,7% (odnosno dijagnostički prinos u kohorti bolesnika sa kognitivnim poremećajima je 26,7%, dok je kod bolesnika sa poremećajima pokreta prinos 12,8%).

3. Kod dodatna tri bolesnika detektovali smo tri varijante nejasnog značaja u genima *PDGFB* (c.716T>C), *DCTNI* (c.1732G>A) i *POLG* (c.3151G>C) koje mogu predstavljati potencijalni uzrok bolesti datih bolesnika i za koje su neophodne dodatne analize kako bi se definitivno utvrdio njihov značaj.

4. Od tri para obolelih srodnika (braća, sestre) kod kojih je analiziran panel klinički egzom, samo kod jednog para sa ataksijom otkrivena je zajednička patogena heterozigotna varijanta (c.12009dupA) u klinički relevantnom *SYNE1* genu.

5. U populaciji 200 zdravih kontrola iz Srbije prisutna je samo *SETX* c.5825T>C varijanta u heterozigotnom obliku kod jedne zdrave kontrole.

6. Genotip bolesnika sa detektovanim uzročnim varijantama odgovara fenotipu opisanom za dati gen.

7. U našoj kohorti bolesnika sa poremećajima pokreta i kognitivnim poremećajima je pokazano da se češće dobija pozitivan genetički nalaz:

- ukoliko postoji pozitivna porodična anamneza za dato oboljenje;
- kada se simptomi bolesti ispolje u ranijem životnom dobu;
- kada dodatne biohemijske i radiološke analize ukazuju na dato oboljenje.

8. Pokazano je i da se uspešnost bioinformatičke analize podataka dobijenih sekvenciranjem panela klinički egzom ogleda u kombinaciji već dostupnih platformi za analizu i primene novorazvijenog algoritma toka rada.

7. LITERATURA

AlzBiomaker Database, Version 3 (www.alzforum.org/alzbiomaker). Alzforum. Pristupljeno septembar 2022.

A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). *Cell*, 72(6), 971–983.

Abdo, W. F., van de Warrenburg, B. P., Burn, D. J., Quinn, N. P., & Bloem, B. R. (2010). The clinical approach to movement disorders. *Nature reviews. Neurology*, 6(1), 29–37.

Abramycheva, N.Yu & Fedotova, E.Yu & Klyushnikov, Sergey & Ustinova, V. & Kunetsky, Vladislav & Stepanova, Maria & Timerbaeva, S.L. & Alekseev, Ya.I. & Illarioshkin, Sergei. (2016). An Original Target Genetic Panel to Diagnose Neurodegenerative Diseases on the Basis of Next-Generation Sequencing: First Experience. *Sovremennye tehnologii v medicine*. 8. 185-190.

Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermod, J. J., Mayer, P., & Kawashima, E. (2000). Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic acids research*, 28(20), E87.

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*, 7(4), 248–249.

Aiello, C., Terracciano, A., Simonati, A., Discepoli, G., Cannelli, N., Claps, D., Crow, Y. J., Bianchi, M., Kitzmuller, C., Longo, D., Tavoni, A., Franzoni, E., Tessa, A., Veneselli, E., Boldrini, R., Filocamo, M., Williams, R. E., Bertini, E. S., Biancheri, R., Carozzo, R., ... Santorelli, F. M. (2009). Mutations in MFSD8/CLN7 are a frequent cause of variant-late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Human mutation*, 30(3), E530–E540.

Alazami, A. M., Al-Saif, A., Al-Semari, A., Bohlega, S., Zlitni, S., Alzahrani, F., Bavi, P., Kaya, N., Colak, D., Khalak, H., Baltus, A., Peterlin, B., Danda, S., Bhatia, K. P., Schneider, S. A., Sakati, N., Walsh, C. A., Al-Mohanna, F., Meyer, B., & Alkuraya, F. S. (2008). Mutations in C2orf37, encoding a nucleolar protein, cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome. *American journal of human genetics*, 83(6), 684–691.

Albanese, A., Bhatia, K., Bressman, S. B., DeLong, M. R., Fahn, S., Fung, V. S., Hallett, M., Jankovic, J., Jinnah, H. A., Klein, C., Lang, A. E., Mink, J. W., & Teller, J. K. (2013). Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28(7), 863–873.

Almeida, M. R., Letra, L., Pires, P., Santos, A., Rebelo, O., Guerreiro, R., van der Zee, J., Van Broeckhoven, C., & Santana, I. (2016). Characterization of an FTL-DDB family with the coexistence of SQSTM1 mutation and hexanucleotide (G₄C₂) repeat expansion in C9orf72 gene. *Neurobiology of aging*, 40, 191.e1–191.e8.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.

Anderson N. D. (2019). State of the science on mild cognitive impairment (MCI). *CNS spectrums*, 24(1), 78–87.

Andjelkovic, M., Minic, P., Vreca, M., Stojiljkovic, M., Skakic, A., Sovtic, A., Rodic, M., Skodric-Trifunovic, V., Maric, N., Visekruna, J., Spasovski, V., & Pavlovic, S. (2018). Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. *PLoS one*, 13(10), e0205422.

- Anheim, M., Monga, B., Fleury, M., Charles, P., Barbot, C., Salih, M., Delaunoy, J. P., Fritsch, M., Arning, L., Synofzik, M., Schöls, L., Sequeiros, J., Goizet, C., Marelli, C., Le Ber, I., Koht, J., Gazulla, J., De Bleecker, J., Mukhtar, M., Drouot, N., ... Koenig, M. (2009). Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain: a journal of neurology*, *132*(Pt 10), 2688–2698.
- Ansorge W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, *25*(4), 195–203.
- Apostolova L. G. (2016). Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, *22*(2 Dementia), 419–434.
- Armstrong, M. J., Litvan, I., Lang, A. E., Bak, T. H., Bhatia, K. P., Borroni, B., Boxer, A. L., Dickson, D. W., Grossman, M., Hallett, M., Josephs, K. A., Kertesz, A., Lee, S. E., Miller, B. L., Reich, S. G., Riley, D. E., Tolosa, E., Tröster, A. I., Vidailhet, M., & Weiner, W. J. (2013). Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology*, *80*(5), 496–503.
- Arvanitakis Z. (2010). Update on frontotemporal dementia. *The neurologist*, *16*(1), 16–22.
- Austin, J., McAfee, D., Armstrong, D., O'Rourke, M., Shearer, L., & Bachhawat, B. (1964). Abnormal sulphatase activities in two human diseases (metachromatic leucodystrophy and gargoylism). *The Biochemical journal*, *93*(2), 15C–17C.
- Babić Božović, I., Maver, A., Leonardis, L., Meznaric, M., Osredkar, D., & Peterlin, B. (2021). Diagnostic yield of exome sequencing in myopathies: Experience of a Slovenian tertiary centre. *PLoS one*, *16*(6), e0252953.
- Baig, S. S., Strong, M., & Quarrell, O. W. (2016). The global prevalence of Huntington's disease: a systematic review and discussion. *Neurodegenerative disease management*, *6*(4), 331–343.
- Balasubramanian S. (2015). Solexa sequencing: decoding genomes on a population scale. *Clinical chemistry*, *61*(1), 21–24.
- Balint, B., Mencacci, N. E., Valente, E. M., Pisani, A., Rothwell, J., Jankovic, J., Vidailhet, M., & Bhatia, K. P. (2018). Dystonia. *Nature reviews. Disease primers*, *4*(1), 25.
- Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature reviews. Genetics*, *12*(11), 745–755.
- Banér, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M., & Landegren, U. (1998). Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic acids research*, *26*(22), 5073–5078.
- Banfi, S., Servadio, A., Chung, M. Y., Kwiatkowski, T. J., Jr, McCall, A. E., Duvick, L. A., Shen, Y., Roth, E. J., Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (1994). Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia. *Nature genetics*, *7*(4), 513–520.
- Baralle, D., & Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of medical genetics*, *42*(10), 737–748.
- Barandiaran, M., Estanga, A., Moreno, F., Indakoetxea, B., Alzualde, A., Balluerka, N., Martí Massó, J. F., & López de Munain, A. (2012). Neuropsychological features of asymptomatic c.709-1G>A progranulin mutation carriers. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*, *18*(6), 1086–1090.
- Barba, R., Martínez-Espinosa, S., Rodríguez-García, E., Pondal, M., Vivancos, J., & Del Ser, T. (2000). Poststroke dementia : clinical features and risk factors. *Stroke*, *31*(7), 1494–1501.

Baruffini, E., Ferrero, I., & Foury, F. (2007). Mitochondrial DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* caused by functional interactions between DNA polymerase gamma mutations associated with disease in human. *Biochimica et biophysica acta*, *1772*(11-12), 1225–1235.

Beaudin, M., Matilla-Dueñas, A., Soong, B. W., Pedroso, J. L., Barsottini, O. G., Mitoma, H., Tsuji, S., Schmahmann, J. D., Manto, M., Rouleau, G. A., Klein, C., & Dupre, N. (2019). The Classification of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias: a Consensus Statement from the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Task Force. *Cerebellum (London, England)*, *18*(6), 1098–1125.

Beerepoot, S., van Dooren, S., Salomons, G. S., Boelens, J. J., Jacobs, E. H., van der Knaap, M. S., van Kuilenburg, A., & Wolf, N. I. (2020). Metachromatic leukodystrophy genotypes in The Netherlands reveal novel pathogenic ARSA variants in non-Caucasian patients. *Neurogenetics*, *21*(4), 289–299.

Ben-Gedalya, T., Moll, L., Bejerano-Sagie, M., Frere, S., Cabral, W. A., Friedmann-Morvinski, D., Slutsky, I., Burstyn-Cohen, T., Marini, J. C., & Cohen, E. (2015). Alzheimer's disease-causing proline substitutions lead to presenilin 1 aggregation and malfunction. *The EMBO journal*, *34*(22), 2820–2839.

Bennion Callister, J., & Pickering-Brown, S. M. (2014). Pathogenesis/genetics of frontotemporal dementia and how it relates to ALS. *Experimental neurology*, *262 Pt B*, 84–90.

Benussi, A., Padovani, A., & Borroni, B. (2015). Phenotypic Heterogeneity of Monogenic Frontotemporal Dementia. *Frontiers in aging neuroscience*, *7*, 171.

Bergant, G., Maver, A., & Peterlin, B. (2021). Whole-Genome Sequencing in Diagnostics of Selected Slovenian Undiagnosed Patients with Rare Disorders. *Life (Basel, Switzerland)*, *11*(3), 205.

Bergant, G., Maver, A., Lovrecic, L., Čuturilo, G., Hodzic, A., & Peterlin, B. (2018). Comprehensive use of extended exome analysis improves diagnostic yield in rare disease: a retrospective survey in 1,059 cases. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *20*(3), 303–312.

Berger, J., Löschl, B., Bernheimer, H., Lugowska, A., Tylki-Szymanska, A., Gieselmann, V., & Molzer, B. (1997). Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *American journal of medical genetics*, *69*(3), 335–340.

Biery, B. J., Stein, D. E., Morton, D. H., & Goodman, S. I. (1996). Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish. *American journal of human genetics*, *59*(5), 1006–1011.

Biesecker, L. G., & Green, R. C. (2014). Diagnostic clinical genome and exome sequencing. *The New England journal of medicine*, *370*(25), 2418–2425.

Biesecker, L. G., Shianna, K. V., & Mullikin, J. C. (2011). Exome sequencing: the expert view. *Genome biology*, *12*(9), 128.

Biffi, A., Cesani, M., Fumagalli, F., Del Carro, U., Baldoli, C., Canale, S., Gerevini, S., Amadio, S., Falautano, M., Rovelli, A., Comi, G., Roncarolo, M. G., & Sessa, M. (2008). Metachromatic leukodystrophy - mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation. *Clinical genetics*, *74*(4), 349–357.

Bjelica, B., Peric, S., Bozovic, I., Jankovic, M., Brankovic, M., Palibrk, A., & Rakocevic Stojanovic, V. (2021). Quality of life in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies is as impaired as in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Acta neurologica Belgica*, *121*(6), 1481–1486.

Blumkin, L., Halevy, A., Ben-Ami-Raichman, D., Dahari, D., Haviv, A., Sarit, C., Lev, D., van der Knaap, M. S., Lerman-Sagie, T., & Leshinsky-Silver, E. (2014). Expansion of the spectrum of TUBB4A-related disorders: a new phenotype associated with a novel mutation in the TUBB4A gene. *Neurogenetics*, 15(2), 107–113.

Bonafé, L., Thöny, B., Penzien, J. M., Czarnecki, B., & Blau, N. (2001). Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *American journal of human genetics*, 69(2), 269–277.

Bonvicini, C., Scassellati, C., Benussi, L., Di Maria, E., Maj, C., Ciani, M., Fostinelli, S., Mega, A., Bocchetta, M., Lanzi, G., Giacopuzzi, E., Ferraboli, S., Pievani, M., Fedi, V., Defanti, C. A., Giliani, S., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Frisoni, G. B., Ghidoni, R., & Gennarelli, M. (2019). Next Generation Sequencing Analysis in Early Onset Dementia Patients. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 67(1), 243–256.

Börklü-Yücel, E., Demiriz, Ç., Avcı, Ş., Vanlı-Yavuz, E. N., Eraslan, S., Oflazer, P., & Kayserili, H. (2020). Clinical exome sequencing in neuromuscular diseases: an experience from Turkey. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 41(8), 2157–2164.

Borroni, B., Bonvicini, C., Galimberti, D., Tremolizzo, L., Papetti, A., Archetti, S., Turla, M., Alberici, A., Agosti, C., Premi, E., Appollonio, I., Rainero, I., Ferrarese, C., Gennarelli, M., Scarpini, E., & Padovani, A. (2011). Founder effect and estimation of the age of the Progranulin Thr272fs mutation in 14 Italian pedigrees with frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiology of aging*, 32(3), 555.e1–555.e5558.

Boteva, K., Vitek, M., Mitsuda, H., de Silva, H., Xu, P. T., Small, G., & Gilbert, J. R. (1996). Mutation analysis of presenilin 1 gene in Alzheimer's disease. *Lancet* (London, England), 347(8994), 130–131.

Breedveld, G. J., van Dongen, J. W., Danesino, C., Guala, A., Percy, A. K., Dure, L. S., Harper, P., Lazarou, L. P., van der Linde, H., Joosse, M., Grüters, A., MacDonald, M. E., de Vries, B. B., Arts, W. F., Oostra, B. A., Krude, H., & Heutink, P. (2002). Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Human molecular genetics*, 11(8), 971–979.

Brugger, F., Schüpbach, M., Koenig, M., Müri, R., Bohlhalter, S., Kaelin-Lang, A., Kamm, C. P., & Kägi, G. (2014). The Clinical Spectrum of Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 2. *Movement disorders clinical practice*, 1(2), 106–109.

Cacace, R., Slegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 12(6), 733–748.

Campion, D., Flaman, J. M., Brice, A., Hannequin, D., Dubois, B., Martin, C., Moreau, V., Charbonnier, F., Didierjean, O., & Tardieu, S. (1995). Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 4(12), 2373–2377.

Cesani, M., Lorioli, L., Grossi, S., Amico, G., Fumagalli, F., Spiga, I., Filocamo, M., & Biffi, A. (2016). Mutation Update of ARSA and PSAP Genes Causing Metachromatic Leukodystrophy. *Human mutation*, 37(1), 16–27.

Chan, K. Y., Wang, W., Wu, J. J., Liu, L., Theodoratou, E., Car, J., Middleton, L., Russ, T. C., Deary, I. J., Campbell, H., Wang, W., Rudan, I., & Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG) (2013). Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis. *Lancet* (London, England), 381(9882), 2016–2023.

Charlesworth, G., Plagnol, V., Holmström, K. M., Bras, J., Sheerin, U. M., Preza, E., Rubio-Agusti, I., Ryten, M., Schneider, S. A., Stamelou, M., Trabzuni, D., Abramov, A. Y., Bhatia, K. P., & Wood, N. W. (2012). Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical

dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *American journal of human genetics*, 91(6), 1041–1050.

Chen, D. H., Brkanac, Z., Verlinde, C. L., Tan, X. J., Bylenok, L., Nochlin, D., Matsushita, M., Lipe, H., Wolff, J., Fernandez, M., Cimino, P. J., Bird, T. D., & Raskind, W. H. (2003). Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *American journal of human genetics*, 72(4), 839–849.

Chen, W. J., Lin, Y., Xiong, Z. Q., Wei, W., Ni, W., Tan, G. H., Guo, S. L., He, J., Chen, Y. F., Zhang, Q. J., Li, H. F., Lin, Y., Murong, S. X., Xu, J., Wang, N., & Wu, Z. Y. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nature genetics*, 43(12), 1252–1255.

Chen, Y. Z., Matsushita, M. M., Robertson, P., Rieder, M., Girirajan, S., Antonacci, F., Lipe, H., Eichler, E. E., Nickerson, D. A., Bird, T. D., & Raskind, W. H. (2012). Autosomal dominant familial dyskinesia and facial myokymia: single exome sequencing identifies a mutation in adenylyl cyclase 5. *Archives of neurology*, 69(5), 630–635.

Cherian, A., & Divya, K. P. (2020). Genetics of Parkinson's disease. *Acta neurologica Belgica*, 120(6), 1297–1305.

Chérot, E., Keren, B., Dubourg, C., Carré, W., Fradin, M., Lavillaureix, A., Afenjar, A., Burglen, L., Whalen, S., Charles, P., Marey, I., Heide, S., Jacquette, A., Heron, D., Doummar, D., Rodriguez, D., Billette de Villemeur, T., Moutard, M. L., Guët, A., Xavier, J., ... Mignot, C. (2018). Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: Experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clinical genetics*, 93(3), 567–576.

Chiapparini, L., Savoiaro, M., D'Arrigo, S., Reale, C., Zorzi, G., Zibordi, F., Cordelli, D. M., Franzoni, E., Garavaglia, B., & Nardocci, N. (2011). The "eye-of-the-tiger" sign may be absent in the early stages of classic pantothenate kinase associated neurodegeneration. *Neuropediatrics*, 42(4), 159–162.

Clark, M. M., Stark, Z., Farnaes, L., Tan, T. Y., White, S. M., Dimmock, D., & Kingsmore, S. F. (2018). Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ genomic medicine*, 3, 16.

Cochran, J. N., McKinley, E. C., Cochran, M., Amaral, M. D., Moyers, B. A., Lasseigne, B. N., Gray, D. E., Lawlor, J., Prokop, J. W., Geier, E. G., Holt, J. M., Thompson, M. L., Newberry, J. S., Yokoyama, J. S., Worthey, E. A., Geldmacher, D. S., Love, M. N., Cooper, G. M., Myers, R. M., & Roberson, E. D. (2019). Genome sequencing for early-onset or atypical dementia: high diagnostic yield and frequent observation of multiple contributory alleles. *Cold Spring Harbor molecular case studies*, 5(6), a003491.

Cohen, B. H., & Naviaux, R. K. (2010). The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. *Methods (San Diego, Calif.)*, 51(4), 364–373.

Cooper-Knock, J., Shaw, P. J., & Kirby, J. (2014). The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta neuropathologica*, 127(3), 333–345.

Cruts, M., Gijselinck, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J., & Van Broeckhoven, C. (2013). Current insights into the C9orf72 repeat expansion diseases of the FTL/ALS spectrum. *Trends in neurosciences*, 36(8), 450–459.

Cummings J. L. (1992). Depression and Parkinson's disease: a review. *The American journal of psychiatry*, 149(4), 443–454.

Curtis, A. R., Fey, C., Morris, C. M., Bindoff, L. A., Ince, P. G., Chinnery, P. F., Coulthard, A., Jackson, M. J., Jackson, A. P., McHale, D. P., Hay, D., Barker, W. A., Markham, A. F., Bates, D., Curtis, A., & Burn, J. (2001). Mutation in the gene encoding

ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nature genetics*, 28(4), 350–354.

Davydov, E. V., Goode, D. L., Sirota, M., Cooper, G. M., Sidow, A., & Batzoglou, S. (2010). Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS computational biology*, 6(12), e1001025.

de Carvalho Aguiar, P., Sweadner, K. J., Penniston, J. T., Zaremba, J., Liu, L., Caton, M., Linzasoro, G., Borg, M., Tijssen, M. A., Bressman, S. B., Dobyns, W. B., Brashear, A., & Ozelius, L. J. (2004). Mutations in the Na⁺/K⁺ -ATPase alpha3 gene ATP1A3 are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron*, 43(2), 169–175.

de Koning, T. J., Jongbloed, J. D., Sikkema-Raddatz, B., & Sinke, R. J. (2015). Targeted next-generation sequencing panels for monogenetic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(1), 61–70.

de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 5(6), 525–535.

De Strooper, B., Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), a006304.

Delahaye, C., & Nicolas, J. (2021). Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PloS one*, 16(10), e0257521.

Deng, H. X., Chen, W., Hong, S. T., Boycott, K. M., Gorrie, G. H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G. H., Donkervoort, S., Bigio, E. H., Brooks, B. R., Ajroud, K., Sufit, R. L., Haines, J. L., ... Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, 477(7363), 211–215.

DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T. J., Kernytsky, A. M., Sivachenko, A. Y., Cibulskis, K., Gabriel, S. B., Altshuler, D., & Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*, 43(5), 491–498.

Diamandis E. P. (2009). Next-generation sequencing: a new revolution in molecular diagnostics?. *Clinical chemistry*, 55(12), 2088–2092.

Diaz N. (2013). Late onset atypical pantothenate-kinase-associated neurodegeneration. *Case reports in neurological medicine*, 2013, 860201.

Dols-Icardo, O., García-Redondo, A., Rojas-García, R., Borrego-Hernández, D., Illán-Gala, I., Muñoz-Blanco, J. L., Rábano, A., Cervera-Carles, L., Juárez-Rufián, A., Spataro, N., De Luna, N., Galán, L., Cortes-Vicente, E., Fortea, J., Blesa, R., Grau-Rivera, O., Lleó, A., Esteban-Pérez, J., Gelpi, E., & Clarimón, J. (2018). Analysis of known amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia genes reveals a substantial genetic burden in patients manifesting both diseases not carrying the C9orf72 expansion mutation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 89(2), 162–168.

Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., & Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, 13(9), 952–963.

Dueñas, A. M., Goold, R., & Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain: a journal of neurology*, 129(Pt 6), 1357–1370.

Edvardson, S., Cinnamon, Y., Ta-Shma, A., Shaag, A., Yim, Y. I., Zenvirt, S., Jalas, C., Lesage, S., Brice, A., Taraboulos, A., Kaestner, K. H., Greene, L. E., & Elpeleg, O. (2012). A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PloS one*, 7(5), e36458.

Edvardson, S., Hama, H., Shaag, A., Gomori, J. M., Berger, I., Soffer, D., Korman, S. H., Taustein, I., Saada, A., & Elpeleg, O. (2008). Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *American journal of human genetics*, 83(5), 643–648.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Dewinter, A., Dixon, J., Foquet, M., ... Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 133–138.

Elias-Sonnenschein, L. S., Viechtbauer, W., Ramakers, I. H., Verhey, F. R., & Visser, P. J. (2011). Predictive value of APOE-ε4 allele for progression from MCI to AD-type dementia: a meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 82(10), 1149–1156.

Fahn S, Jankovic J, Hallett M. (2011). Principles and Practice of Movement Disorders. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier

Fahn S. (2011). Classification of movement disorders. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26(6), 947–957.

Fahn, S., Bressman, S. B., & Marsden, C. D. (1998). Classification of dystonia. *Advances in neurology*, 78, 1–10.

Fan, X., Hughes, K. E., Jinnah, H. A., & Hess, E. J. (2012). Selective and sustained α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor activation in cerebellum induces dystonia in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 340(3), 733–741.

Farrer, M. J., Hulihan, M. M., Kachergus, J. M., Dächsel, J. C., Stoessl, A. J., Grantier, L. L., Calne, S., Calne, D. B., Lechevalier, B., Chapon, F., Tsuboi, Y., Yamada, T., Gutmann, L., Elibol, B., Bhatia, K. P., Wider, C., Vilariño-Güell, C., Ross, O. A., Brown, L. A., Castanedes-Casey, M., ... Wszolek, Z. K. (2009). DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nature genetics*, 41(2), 163–165.

Farwell, K. D., Shahmirzadi, L., El-Khechen, D., Powis, Z., Chao, E. C., Tippin Davis, B., Baxter, R. M., Zeng, W., Mroske, C., Parra, M. C., Gandomi, S. K., Lu, I., Li, X., Lu, H., Lu, H. M., Salvador, D., Ruble, D., Lao, M., Fischbach, S., Wen, J., ... Tang, S. (2015). Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(7), 578–586.

Federico A. (2013). Rare neurological diseases: a Pandora's box for neurology (an European and Italian perspective). *Revue neurologique*, 169 Suppl 1, S12–S17.

Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., & Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research*, 34(3), e22.

Firth, H. V., Richards, S. M., Bevan, A. P., Clayton, S., Corpas, M., Rajan, D., Van Vooren, S., Moreau, Y., Pettett, R. M., & Carter, N. P. (2009). DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *American journal of human genetics*, 84(4), 524–533.

Fluharty, A. L., Fluharty, C. B., Bohne, W., von Figura, K., & Gieselmann, V. (1991). Two new arylsulfatase A (ARSA) mutations in a juvenile metachromatic leukodystrophy (MLD) patient. *American journal of human genetics*, 49(6), 1340–1350.

Fogel, B. L., Lee, H., Deignan, J. L., Strom, S. P., Kantarci, S., Wang, X., Quintero-Rivera, F., Vilain, E., Grody, W. W., Perlman, S., Geschwind, D. H., & Nelson, S. F. (2014).

Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA neurology*, 71(10), 1237–1246.

Fokkema, I. F., Taschner, P. E., Schaafsma, G. C., Celli, J., Laros, J. F., & den Dunnen, J. T. (2011). LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Human mutation*, 32(5), 557–563.

Foo, J. N., Liu, J. J., & Tan, E. K. (2012). Whole-genome and whole-exome sequencing in neurological diseases. *Nature reviews. Neurology*, 8(9), 508–517.

Formichi, P., Radi, E., Branca, C., Battisti, C., Brunetti, J., Da Pozzo, P., Giannini, F., Dotti, M. T., Bracci, L., & Federico, A. (2016). Oxidative stress-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes from patients with POLG-related disorders. *Journal of the neurological sciences*, 368, 359–368.

Foster, N. L., Heidebrink, J. L., Clark, C. M., Jagust, W. J., Arnold, S. E., Barbas, N. R., DeCarli, C. S., Turner, R. S., Koeppe, R. A., Higdon, R., & Minoshima, S. (2007). FDG-PET improves accuracy in distinguishing frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Brain: a journal of neurology*, 130(Pt 10), 2616–2635.

Freibaum, B. D., & Taylor, J. P. (2017). The Role of Dipeptide Repeats in C9ORF72-Related ALS-FTD. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 35.

Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., Marroquin, N., Nordin, F., Hübers, A., Weydt, P., Pinto, S., Press, R., Millecamps, S., Molko, N., Bernard, E., Desnuelle, C., Soriani, M. H., Dorst, J., Graf, E., Nordström, U., ... Weishaupt, J. H. (2015). Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia. *Nature neuroscience*, 18(5), 631–636.

Fuchs, T., Gavarini, S., Saunders-Pullman, R., Raymond, D., Ehrlich, M. E., Bressman, S. B., & Ozelius, L. J. (2009). Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nature genetics*, 41(3), 286–288.

Fuchs, T., Saunders-Pullman, R., Masuho, I., Luciano, M. S., Raymond, D., Factor, S., Lang, A. E., Liang, T. W., Trosch, R. M., White, S., Ainehsazan, E., Hervé, D., Sharma, N., Ehrlich, M. E., Martemyanov, K. A., Bressman, S. B., & Ozelius, L. J. (2013). Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nature genetics*, 45(1), 88–92.

Fukao, T., Scriver, C. R., Kondo, N., & t2 Collaborative Working Group (2001). The clinical phenotype and outcome of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency (beta-ketothiolase or T2 deficiency) in 26 enzymatically proved and mutation-defined patients. *Molecular genetics and metabolism*, 72(2), 109–114.

GBD 2016 Dementia Collaborators (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*, 18(1), 88–106.

Gibbs, R. A., & Caskey, C. T. (1987). Identification and localization of mutations at the Lesch-Nyhan locus by ribonuclease A cleavage. *Science (New York, N.Y.)*, 236(4799), 303–305.

Gieldon, L., Mackenroth, L., Kahlert, A. K., Lemke, J. R., Pörrmann, J., Schallner, J., von der Hagen, M., Markus, S., Weidensee, S., Novotna, B., Soerensen, C., Klink, B., Wagner, J., Tzschach, A., Jahn, A., Kuhlee, F., Hackmann, K., Schrock, E., Di Donato, N., & Rump, A. (2018). Diagnostic value of partial exome sequencing in developmental disorders. *PLoS one*, 13(8), e0201041.

Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G., & Veltman, J. A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European journal of human genetics : EJHG*, 20(5), 490–497.

Golbe, L. I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D. C., & Duvoisin, R. C. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 27(3), 276–282.

Goldman, J. S., & Van Deerlin, V. M. (2018). Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia: The Current State of Genetics and Genetic Testing Since the Advent of Next-Generation Sequencing. *Molecular diagnosis & therapy*, 22(5), 505–513.

Goldman, J. S., Farmer, J. M., Wood, E. M., Johnson, J. K., Boxer, A., Neuhaus, J., Lomen-Hoerth, C., Wilhelmsen, K. C., Lee, V. M., Grossman, M., & Miller, B. L. (2005). Comparison of family histories in FTL D subtypes and related tauopathies. *Neurology*, 65(11), 1817–1819.

Greaves, C. V., & Rohrer, J. D. (2019). An update on genetic frontotemporal dementia. *Journal of neurology*, 266(8), 2075–2086.

Gros-Louis, F., Dupré, N., Dion, P., Fox, M. A., Laurent, S., Verreault, S., Sanes, J. R., Bouchard, J. P., & Rouleau, G. A. (2007). Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nature genetics*, 39(1), 80–85.

Grossi, S., Regis, S., Rosano, C., Corsolini, F., Uziel, G., Sessa, M., Di Rocco, M., Parenti, G., Deodato, F., Leuzzi, V., Biancheri, R., & Filocamo, M. (2008). Molecular analysis of ARSA and PSAP genes in twenty-one Italian patients with metachromatic leukodystrophy: identification and functional characterization of 11 novel ARSA alleles. *Human mutation*, 29(11), E220–E230.

Grossman M. (2012). The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia. *The Lancet. Neurology*, 11(6), 545–555.

Guerrero A. & Piasecki M. (2008). *Problem-based behavioral science and psychiatry*. Springer.

Gusella, J. F., MacDonald, M. E., & Lee, J. M. (2014). Genetic modifiers of Huntington's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 29(11), 1359–1365.

Haack, T. B., Hogarth, P., Kruer, M. C., Gregory, A., Wieland, T., Schwarzmayr, T., Graf, E., Sanford, L., Meyer, E., Kara, E., Cuno, S. M., Harik, S. I., Dandu, V. H., Nardocci, N., Zorzi, G., Dunaway, T., Tarnopolsky, M., Skinner, S., Frucht, S., Hanspal, E., ... Hayflick, S. J. (2012). Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *American journal of human genetics*, 91(6), 1144–1149.

Haltia M. (2003). The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 62(1), 1–13.

Hamosh, A., Scott, A. F., Amberger, J. S., Bocchini, C. A., & McKusick, V. A. (2005). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D514–D517.

Hanein, S., Martin, E., Boukhris, A., Byrne, P., Goizet, C., Hamri, A., Benomar, A., Lossos, A., Denora, P., Fernandez, J., Elleuch, N., Forlani, S., Durr, A., Feki, I., Hutchinson, M., Santorelli, F. M., Mhiri, C., Brice, A., & Stevanin, G. (2008). Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *American journal of human genetics*, 82(4), 992–1002.

Hardy, J., & Rogaeva, E. (2014). Motor neuron disease and frontotemporal dementia: sometimes related, sometimes not. *Experimental neurology*, 262 Pt B, 75–83.

Harris, Z. L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R. T., & Gitlin, J. D. (1995). Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2539–2543.

Hartig, M. B., Hörtnagel, K., Garavaglia, B., Zorzi, G., Kmiec, T., Klopstock, T., Rostasy, K., Svetel, M., Kostic, V. S., Schuelke, M., Botz, E., Weindl, A., Novakovic, I., Nardocci, N., Prokisch, H., & Meitinger, T. (2006). Genotypic and phenotypic spectrum of

PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation. *Annals of neurology*, 59(2), 248–256.

Hartig, M. B., Iuso, A., Haack, T., Kmiec, T., Jurkiewicz, E., Heim, K., Roeber, S., Tarabin, V., Dusi, S., Krajewska-Walasek, M., Jozwiak, S., Hempel, M., Winkelmann, J., Elstner, M., Oexle, K., Klopstock, T., Mueller-Felber, W., Gasser, T., Trenkwalder, C., Tiranti, V., ... Prokisch, H. (2011). Absence of an orphan mitochondrial protein, c19orf12, causes a distinct clinical subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation. *American journal of human genetics*, 89(4), 543–550.

Harvey, R. J., Skelton-Robinson, M., & Rossor, M. N. (2003). The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 74(9), 1206–1209.

Hayflick, S. J., Westaway, S. K., Levinson, B., Zhou, B., Johnson, M. A., Ching, K. H., & Gitschier, J. (2003). Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *The New England journal of medicine*, 348(1), 33–40.

Hendriks, S., Peetoom, K., Bakker, C., van der Flier, W. M., Papma, J. M., Koopmans, R., Verhey, F., de Vugt, M., Köhler, S., Young-Onset Dementia Epidemiology Study Group, Withall, A., Parlevliet, J. L., Uysal-Bozkir, Ö., Gibson, R. C., Neita, S. M., Nielsen, T. R., Salem, L. C., Nyberg, J., Lopes, M. A., Dominguez, J. C., ... Ruano, L. (2021). Global Prevalence of Young-Onset Dementia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA neurology*, 78(9), 1080–1090.

Hensman Moss, D. J., Poulter, M., Beck, J., Hehir, J., Polke, J. M., Campbell, T., Adamson, G., Mudanohwo, E., McColgan, P., Haworth, A., Wild, E. J., Sweeney, M. G., Houlden, H., Mead, S., & Tabrizi, S. J. (2014). C9orf72 expansions are the most common genetic cause of Huntington disease phenocopies. *Neurology*, 82(4), 292–299.

Hersheson, J., Mencacci, N. E., Davis, M., MacDonald, N., Trabzuni, D., Ryten, M., Pittman, A., Paudel, R., Kara, E., Fawcett, K., Plagnol, V., Bhatia, K. P., Medlar, A. J., Stanescu, H. C., Hardy, J., Kleta, R., Wood, N. W., & Houlden, H. (2013). Mutations in the autoregulatory domain of β -tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Annals of neurology*, 73(4), 546–553.

Hinz, F. I., & Geschwind, D. H. (2017). Molecular Genetics of Neurodegenerative Dementias. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(4), a023705.

Ho, M., Chelly, J., Carter, N., Danek, A., Crocker, P., & Monaco, A. P. (1994). Isolation of the gene for McLeod syndrome that encodes a novel membrane transport protein. *Cell*, 77(6), 869–880.

Hodges, J. R., Patterson, K., Oxbury, S., & Funnell, E. (1992). Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain : a journal of neurology*, 115 (Pt 6), 1783–1806.

Hogarth, P., Gregory, A., Kruer, M. C., Sanford, L., Wagoner, W., Natowicz, M. R., Egel, R. T., Subramony, S. H., Goldman, J. G., Berry-Kravis, E., Foulds, N. C., Hammans, S. R., Desguerre, I., Rodriguez, D., Wilson, C., Diedrich, A., Green, S., Tran, H., Reese, L., Woltjer, R. L., ... Hayflick, S. J. (2013). New NBIA subtype: genetic, clinical, pathologic, and radiographic features of MPAN. *Neurology*, 80(3), 268–275.

Hollingsworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., Abraham, R., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvin, V., Dowzell, K., Jones, N., Stretton, A., Thomas, C., Richards, A., Ivanov, D., Widdowson, C., Chapman, J., Lovestone, S., Powell, J., ... Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 43(5), 429–435.

Holmes, S. E., O'Hearn, E. E., McInnis, M. G., Gorelick-Feldman, D. A., Kleiderlein, J. J., Callahan, C., Kwak, N. G., Ingersoll-Ashworth, R. G., Sherr, M., Sumner, A. J., Sharp, A.

H., Ananth, U., Seltzer, W. K., Boss, M. A., Viera-Saecker, A. M., Epplen, J. T., Riess, O., Ross, C. A., & Margolis, R. L. (1999). Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nature genetics*, 23(4), 391–392.

Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., Gall, A., ... Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D884–D891.

Huang, Y. A., Zhou, B., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2017). ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A β Secretion. *Cell*, 168(3), 427–441.e21.

Huntington, G. (1872). On chorea. *Med. Surg. Rep.* 26, 320–321.

Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., & Tsuji, S. (1994). Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nature genetics*, 8(3), 236–242.

Ikeda, Y., Dick, K. A., Weatherspoon, M. R., Gincel, D., Armbrust, K. R., Dalton, J. C., Stevanin, G., Dürr, A., Zühlke, C., Bürk, K., Clark, H. B., Brice, A., Rothstein, J. D., Schut, L. J., Day, J. W., & Ranum, L. P. (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nature genetics*, 38(2), 184–190.

Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Markova E.D. (1995). A new mutational mechanism in man: expansion of trinucleotide repeats. *Genetika*, 31(11): 1478–1489.

Illarioshkin, S. N., Shadrina, M. I., Slominsky, P. A., Bepalova, E. V., Zagorovskaya, T. B., Bagyeva, G., Markova, E. D., Limborska, S. A., & Ivanova-Smolenskaya, I. A. (2007). A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. *European journal of neurology*, 14(4), 413–417.

Ishii, K., Kawachi, T., Sasaki, H., Kono, A. K., Fukuda, T., Kojima, Y., & Mori, E. (2005). Voxel-based morphometric comparison between early- and late-onset mild Alzheimer's disease and assessment of diagnostic performance of z score images. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 26(2), 333–340.

Iwaki, A., Kawano, Y., Miura, S., Shibata, H., Matsuse, D., Li, W., Furuya, H., Ohyagi, Y., Taniwaki, T., Kira, J., & Fukumaki, Y. (2008). Heterozygous deletion of ITPR1, but not SUMF1, in spinocerebellar ataxia type 16. *Journal of medical genetics*, 45(1), 32–35.

Jankovic J. (2009). Treatment of hyperkinetic movement disorders. *The Lancet. Neurology*, 8(9), 844–856.

Jankovic, M. Z., Dobricic, V., Kresojevic, N., Markovic, V., Petrovic, I., Svetel, M., Pekmezovic, T., Novakovic, I., & Kostic, V. (2018). Identification of mutations in the PARK2 gene in Serbian patients with Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 393, 27–30.

Jansen, R., & Ledley, F. D. (1990). Heterozygous mutations at the mut locus in fibroblasts with mut0 methylmalonic acidemia identified by polymerase-chain-reaction cDNA cloning. *American journal of human genetics*, 47(5), 808–814.

Jia, L., Du, Y., Chu, L., Zhang, Z., Li, F., Lyu, D., Li, Y., Li, Y., Zhu, M., Jiao, H., Song, Y., Shi, Y., Zhang, H., Gong, M., Wei, C., Tang, Y., Fang, B., Guo, D., Wang, F., Zhou, A., ... COAST Group (2020). Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study. *The Lancet. Public health*, 5(12), e661–e671.

Jin, S. C., Pastor, P., Cooper, B., Cervantes, S., Benitez, B. A., Razquin, C., Goate, A., Ibero-American Alzheimer Disease Genetics Group Researchers, & Cruchaga, C. (2012). Pooled-DNA sequencing identifies novel causative variants in PSEN1, GRN and MAPT in a

clinical early-onset and familial Alzheimer's disease Ibero-American cohort. *Alzheimer's research & therapy*, 4(4), 34.

Josephs, K. A., Petersen, R. C., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Whitwell, J. L., Duffy, J. R., Parisi, J. E., & Dickson, D. W. (2006). Clinicopathologic analysis of frontotemporal and corticobasal degenerations and PSP. *Neurology*, 66(1), 41–48.

Jun, G., Naj, A. C., Beecham, G. W., Wang, L. S., Buross, J., Gallins, P. J., Buxbaum, J. D., Ertekin-Taner, N., Fallin, M. D., Friedland, R., Inzelberg, R., Kramer, P., Rogava, E., St George-Hyslop, P., Alzheimer's Disease Genetics Consortium, Cantwell, L. B., Dombroski, B. A., Saykin, A. J., Reiman, E. M., Bennett, D. A., ... Schellenberg, G. D. (2010). Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Archives of neurology*, 67(12), 1473–1484.

Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological psychiatry*, 77(1), 43–51.

Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., Walters, R. K., ... MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434–443.

Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., & Akiguchi, I. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature genetics*, 8(3), 221–228.

Ke, R., Mignardi, M., Hauling, T., & Nilsson, M. (2016). Fourth Generation of Next-Generation Sequencing Technologies: Promise and Consequences. *Human mutation*, 37(12), 1363–1367.

Ke, R., Mignardi, M., Pacureanu, A., Svedlund, J., Botling, J., Wählby, C., & Nilsson, M. (2013). In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nature methods*, 10(9), 857–860.

Keller, A., Westenberger, A., Sobrido, M. J., García-Murias, M., Domingo, A., Sears, R. L., Lemos, R. R., Ordoñez-Ugalde, A., Nicolas, G., da Cunha, J. E., Rushing, E. J., Hugelshofer, M., Wurnig, M. C., Kaech, A., Reimann, R., Lohmann, K., Dobričić, V., Carracedo, A., Petrović, I., Miyasaki, J. M., ... Oliveira, J. R. (2013). Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nature genetics*, 45(9), 1077–1082.

Khachaturian Z. S. (1985). Diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of neurology*, 42(11), 1097–1105.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608.

Klein C. (2014). Genetics in dystonia. *Parkinsonism & related disorders*, 20 Suppl 1, S137–S142.

Köhler, S., Gargano, M., Matentzoglou, N., Carmody, L. C., Lewis-Smith, D., Vasilevsky, N. A., Danis, D., Balagura, G., Baynam, G., Brower, A. M., Callahan, T. J., Chute, C. G., Est, J. L., Galer, P. D., Ganesan, S., Griese, M., Haimel, M., Pazmandi, J., Hanauer, M., Harris, N. L., ... Robinson, P. N. (2021). The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D1207–D1217.

Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., & Hayashi, T. (1994). Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nature genetics*, 6(1), 9–13.

Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Yamada, M., Takahashi, H., & Tsuji, S. (1999). A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease?. *Human molecular genetics*, 8(11), 2047–2053.

Komaki, H., Fukazawa, T., Houzen, H., Yoshida, K., Nonaka, I., & Goto, Y. (2002). A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions. *Annals of neurology*, 51(5), 645–648.

Koob, M. D., Moseley, M. L., Schut, L. J., Benzow, K. A., Bird, T. D., Day, J. W., & Ranum, L. P. (1999). An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nature genetics*, 21(4), 379–384.

Koriath, C., Kenny, J., Adamson, G., Drueyeh, R., Taylor, W., Beck, J., Quinn, L., Mok, T. H., Dimitriadis, A., Norsworthy, P., Bass, N., Carter, J., Walker, Z., Kipps, C., Coulthard, E., Polke, J. M., Bernal-Quiros, M., Denning, N., Thomas, R., Raybould, R., ... Mead, S. (2020). Predictors for a dementia gene mutation based on gene-panel next-generation sequencing of a large dementia referral series. *Molecular psychiatry*, 25(12), 3399–3412.

Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., & Turner, S. W. (2010). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods in enzymology*, 472, 431–455.

Kostić, V. S., Lukić-Ječmenica, M., Novaković, I., Dobričić, V., Brajković, L., Krajinović, M., Klein, C., & Pavlović, A. (2011). Exclusion of linkage to chromosomes 14q, 2q37 and 8p21.1-q11.23 in a Serbian family with idiopathic basal ganglia calcification. *Journal of neurology*, 258(9), 1637–1642.

Kousi, M., Lehesjoki, A. E., & Mole, S. E. (2012). Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Human mutation*, 33(1), 42–63.

Kovacs G. G. (2017). Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handbook of clinical neurology*, 145, 301–307.

Kovacs, G. G. (2015). Introduction: classification of neurodegenerative diseases. *Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide; Kovacs, GG, Ed*, 1-8.

Krebs, C. E., Karkheiran, S., Powell, J. C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., Di Paolo, G., Walker, R. H., Shahidi, G. A., Buxbaum, J. D., De Camilli, P., Yue, Z., & Paisán-Ruiz, C. (2013). The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Human mutation*, 34(9), 1200–1207.

Kvello-Alme, M., Bråthen, G., White, L. R., & Sando, S. B. (2019). The Prevalence and Subtypes of Young Onset Dementia in Central Norway: A Population-Based Study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 69(2), 479–487.

Lacour, M., Quenez, O., Rovelet-Lecrux, A., Salomon, B., Rousseau, S., Richard, A. C., Quillard-Muraine, M., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Zarea, A., de la Sayette, V., Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., Rouaud, O., ... collaborators of the CNR-MAJ (2019). Causative Mutations and Genetic Risk Factors in Sporadic Early Onset Alzheimer's Disease Before 51 Years. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 71(1), 227–243.

LaDuca, H., Farwell, K. D., Vuong, H., Lu, H. M., Mu, W., Shahmirzadi, L., Tang, S., Chen, J., Bhide, S., & Chao, E. C. (2017). Exome sequencing covers >98% of mutations identified on targeted next generation sequencing panels. *PloS one*, 12(2), e0170843.

Landrum, M. J., Chitipiralla, S., Brown, G. R., Chen, C., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Kaur, K., Liu, C., Lyoshin, V., Maddipatla, Z., Maiti, R., Mitchell, J., O'Leary, N., Riley, G. R., Shi, W., Zhou, G., Schneider, V., Maglott, D., ... Kattman, B. L. (2020). ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic acids research*, 48(D1), D835–D844.

Lanoiselée, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A. C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., de la Sayette, V., Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., Rouaud, O., ... collaborators of the CNR-MAJ project (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine*, 14(3), e1002270.

Laplanche, J. L., Hachimi, K. H., Durieux, I., Thuillet, P., Defebvre, L., Delasnerie-Lauprêtre, N., Peoc'h, K., Foncin, J. F., & Destée, A. (1999). Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene. *Brain : a journal of neurology*, 122 (Pt 12), 2375–2386.

Larner A. J. (2013). Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease: an update on genotype-phenotype relationships. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 37(4), 653–659.

Laššuthová, P., Šafka Brožková, D., Krůtová, M., Neupauerová, J., Haberlová, J., Mazanec, R., Dřimal, P., & Seeman, P. (2016). Improving diagnosis of inherited peripheral neuropathies through gene panel analysis. *Orphanet journal of rare diseases*, 11(1), 118.

Le Ber, I., Camuzat, A., Guerreiro, R., Bouya-Ahmed, K., Bras, J., Nicolas, G., Gabelle, A., Didic, M., De Septenville, A., Millicamps, S., Lenglet, T., Latouche, M., Kabashi, E., Champion, D., Hannequin, D., Hardy, J., Brice, A., & French Clinical and Genetic Research Network on FTD/FTD-ALS (2013). SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA neurology*, 70(11), 1403–1410.

Lee, H., Deignan, J. L., Dorrani, N., Strom, S. P., Kantarci, S., Quintero-Rivera, F., Das, K., Toy, T., Harry, B., Yourshaw, M., Fox, M., Fogel, B. L., Martinez-Agosto, J. A., Wong, D. A., Chang, V. Y., Shieh, P. B., Palmer, C. G., Dipple, K. M., Grody, W. W., Vilain, E., ... Nelson, S. F. (2014). Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*, 312(18), 1880–1887.

Lees, A. J., & Smith, E. (1983). Cognitive deficits in the early stages of Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*, 106 (Pt 2), 257–270.

Lewis, S., Hutchison, W., Thyagarajan, D., & Dahl, H. H. (2002). Clinical and molecular features of adPEO due to mutations in the Twinkle gene. *Journal of the neurological sciences*, 201(1-2), 39–44.

Li J. (2012). Inherited neuropathies. *Seminars in neurology*, 32(3), 204–214.

Li, M., Pang, S. Y., Song, Y., Kung, M. H., Ho, S. L., & Sham, P. C. (2013). Whole exome sequencing identifies a novel mutation in the transglutaminase 6 gene for spinocerebellar ataxia in a Chinese family. *Clinical genetics*, 83(3), 269–273.

Lidstone, S. C., Costa-Parke, M., Robinson, E. J., Ercoli, T., Stone, J., & FMD GAP Study Group (2022). Functional movement disorder gender, age and phenotype study: a systematic review and individual patient meta-analysis of 4905 cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 93(6), 609–616.

Lieber, D. S., Calvo, S. E., Shanahan, K., Slate, N. G., Liu, S., Hershman, S. G., Gold, N. B., Chapman, B. A., Thorburn, D. R., Berry, G. T., Schmahmann, J. D., Borowsky, M. L., Mueller, D. M., Sims, K. B., & Mootha, V. K. (2013). Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. *Neurology*, 80(19), 1762–1770.

Lillo, P., and Hodges, J. R. (2009). Frontotemporal dementia and motor neuron disease: overlapping clinic-pathological disorders. *J. Clin. Neurosci.* 16, 1131–1135.

Lin, X., Tang, W., Ahmad, S., Lu, J., Colby, C. C., Zhu, J., & Yu, Q. (2012). Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hearing research*, 288(1-2), 67–76.

Litvan, I., Agid, Y., Calne, D., Campbell, G., Dubois, B., Duvoisin, R. C., Goetz, C. G., Golbe, L. I., Grafman, J., Growdon, J. H., Hallett, M., Jankovic, J., Quinn, N. P., Tolosa, E.,

& Zee, D. S. (1996). Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology*, 47(1), 1–9.

Lleó, A., Blesa, R., Queralt, R., Ezquerra, M., Molinuevo, J. L., Peña-Casanova, J., Rojo, A., & Oliva, R. (2002). Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain. *Archives of neurology*, 59(11), 1759–1763.

Lobo, A., Launer, L. J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M. M., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., Soininen, H., & Hofman, A. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*, 54(11 Suppl 5), S4–S9.

Lomen-Hoerth, C., Murphy, J., Langmore, S., Kramer, J. H., Olney, R. K., & Miller, B. (2003). Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal?. *Neurology*, 60(7), 1094–1097.

Lüdecke, B., Dworniczak, B., & Bartholomé, K. (1995). A point mutation in the tyrosine hydroxylase gene associated with Segawa's syndrome. *Human genetics*, 95(1), 123–125.

Ługowska, A., Berger, J., Tylki-Szymańska, A., Löschl, B., Molzer, B., Zobel, M., & Czartoryska, B. (2005). Molecular and phenotypic characteristics of metachromatic leukodystrophy patients from Poland. *Clinical genetics*, 68(1), 48–54.

Luzi, P., Rafi, M. A., Rao, H. Z., & Wenger, D. A. (2013). Sixteen novel mutations in the arylsulfatase A gene causing metachromatic leukodystrophy. *Gene*, 530(2), 323–328.

MacDonald M. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72(6), 971–983.

Maggi, J., Koller, S., Bähr, L., Feil, S., Kivrak Pfiffner, F., Hanson, J., Maspoli, A., Gerth-Kahlert, C., & Berger, W. (2021). Long-Range PCR-Based NGS Applications to Diagnose Mendelian Retinal Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1508.

Mahoney, C. J., Beck, J., Rohrer, J. D., Lashley, T., Mok, K., Shakespeare, T., Yeatman, T., Warrington, E. K., Schott, J. M., Fox, N. C., Rossor, M. N., Hardy, J., Collinge, J., Revesz, T., Mead, S., & Warren, J. D. (2012). Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain : a journal of neurology*, 135(Pt 3), 736–750.

Makino, S., Kaji, R., Ando, S., Tomizawa, M., Yasuno, K., Goto, S., Matsumoto, S., Tabuena, M. D., Maranon, E., Dantes, M., Lee, L. V., Ogasawara, K., Tooyama, I., Akatsu, H., Nishimura, M., & Tamiya, G. (2007). Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *American journal of human genetics*, 80(3), 393–406.

Mancuso, M., Filosto, M., Bellan, M., Liguori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., DiMauro, S., & Carelli, V. (2004). POLG mutations causing ophthalmoplegia, sensorimotor polyneuropathy, ataxia, and deafness. *Neurology*, 62(2), 316–318.

Mardis E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, 387–402.

Marelli, C., Guissart, C., Hubsch, C., Renaud, M., Villemin, J. P., Larrieu, L., Charles, P., Aygnac, X., Sacconi, S., Collignon, P., Cuntz-Shadfar, D., Perrin, L., Benarrosh, A., Degardin, A., Lagha-Boukbiza, O., Mutez, E., Carlander, B., Morales, R. J., Gonzalez, V., Carra-Dalliere, C., ... Koenig, M. (2016). Mini-Exome Coupled to Read-Depth Based Copy Number Variation Analysis in Patients with Inherited Ataxias. *Human mutation*, 37(12), 1340–1353.

Margolis, R. L., O'Hearn, E., Rosenblatt, A., Willour, V., Holmes, S. E., Franz, M. L., Callahan, C., Hwang, H. S., Troncoso, J. C., & Ross, C. A. (2001). A disorder similar to Huntington's disease is associated with a novel CAG repeat expansion. *Annals of neurology*, *50*(6), 373–380.

Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B. P., Sue, C. M., Tabrizi, S. J., Bertram, L., Mercimek-Mahmutoglu, S., Ebrahimi-Fakhari, D., Warner, T. T., Durr, A., Assmann, B., Lohmann, K., Kostic, V., & Klein, C. (2016). Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *31*(4), 436–457.

Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., ... Kawakami, H. (2010). Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *465*(7295), 223–226.

Matsuura, T., Yamagata, T., Burgess, D. L., Rasmussen, A., Grewal, R. P., Watase, K., Khajavi, M., McCall, A. E., Davis, C. F., Zu, L., Achari, M., Pulst, S. M., Alonso, E., Noebels, J. L., Nelson, D. L., Zoghbi, H. Y., & Ashizawa, T. (2000). Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature genetics*, *26*(2), 191–194.

Matthews, F. E., Brayne, C., Lowe, J., McKeith, I., Wharton, S. B., & Ince, P. (2009). Epidemiological pathology of dementia: attributable-risks at death in the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study. *PLoS medicine*, *6*(11), e1000180.

Maver, A., Lovrecic, L., Volk, M., Rudolf, G., Writzl, K., Blatnik, A., Hodzic, A., & Borut, P. (2016). Phenotype-driven gene target definition in clinical genome-wide sequencing data interpretation. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, *18*(11), 1102–1110.

Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(8), a006239.

McKeith, I. G., Dickson, D. W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J. T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J. E., Lippa, C., Perry, E. K., Aarsland, D., Arai, H., Ballard, C. G., Boeve, B., Burn, D. J., Costa, D., Del Ser, T., Dubois, B., Galasko, D., Gauthier, S., ... Consortium on DLB (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*, *65*(12), 1863–1872.

McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr, Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 263–269.

Mendez M. F. (2006). The accurate diagnosis of early-onset dementia. *International journal of psychiatry in medicine*, *36*(4), 401–412.

Méneret, A., Garcin, B., Frismand, S., Lannuzel, A., Mariani, L. L., & Roze, E. (2021). Treatable Hyperkinetic Movement Disorders Not to Be Missed. *Frontiers in neurology*, *12*, 659805.

Mikheyev, A. S., & Tin, M. M. (2014). A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Molecular ecology resources*, *14*(6), 1097–1102.

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, *16*(3), 1215.

Mohan, D., Iype, T., Varghese, S., Usha, A., & Mohan, M. (2019). A cross-sectional study to assess prevalence and factors associated with mild cognitive impairment among older adults in an urban area of Kerala, South India. *BMJ open*, *9*(3), e025473.

Montaut, S., Tranchant, C., Drouot, N., Rudolf, G., Guissart, C., Tarabeux, J., Stemmelen, T., Velt, A., Fourrage, C., Nitschké, P., Gerard, B., Mandel, J. L., Koenig, M., Chelly, J., Anheim, M., & French Parkinson's and Movement Disorders Consortium (2018). Assessment of a Targeted Gene Panel for Identification of Genes Associated With Movement Disorders. *JAMA neurology*, *75*(10), 1234–1245.

Morales-Briceño, H., Chacón-Camacho, O. F., Pérez-González, E. A., Arteaga-Vázquez, J., Rodríguez-Violante, M., Cervantes-Arriaga, A., Pérez-Rodríguez, L., Zenteno, J. C., & Mutchinick, O. M. (2015). Clinical, imaging, and molecular findings in a sample of Mexican families with pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Clinical genetics*, *87*(3), 259–265.

Müller, K., Brenner, D., Weydt, P., Meyer, T., Grehl, T., Petri, S., Grosskreutz, J., Schuster, J., Volk, A. E., Borck, G., Kubisch, C., Klopstock, T., Zeller, D., Jablonka, S., Sendtner, M., Klebe, S., Knehr, A., Günther, K., Weis, J., Claeys, K. G., ... German ALS network MND-NET (2018). Comprehensive analysis of the mutation spectrum in 301 German ALS families. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *89*(8), 817–827.

Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, *155*, 335–350.

Münchau, A., Valente, E. M., Davis, M. B., Stinton, V., Wood, N. W., Quinn, N. P., & Bhatia, K. P. (2000). A Yorkshire family with adult-onset cranio-cervical primary torsion dystonia. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, *15*(5), 954–959.

Mundwiler, A., & Shakkottai, V. G. (2018). Autosomal-dominant cerebellar ataxias. *Handbook of clinical neurology*, *147*, 173–185.

Murray, M. E., Graff-Radford, N. R., Ross, O. A., Petersen, R. C., Duara, R., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *The Lancet. Neurology*, *10*(9), 785–796.

Németh, A. H., Kwasniewska, A. C., Lise, S., Parolin Schneckenberg, R., Becker, E. B., Bera, K. D., Shanks, M. E., Gregory, L., Buck, D., Zameel Cader, M., Talbot, K., de Silva, R., Fletcher, N., Hastings, R., Jayawant, S., Morrison, P. J., Worth, P., Taylor, M., Tolmie, J., O'Regan, M., ... Ragoussis, J. (2013). Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain: a journal of neurology*, *136*(Pt 10), 3106–3118.

Neudorfer, O., Giladi, N., Elstein, D., Abrahamov, A., Turezkite, T., Aghai, E., Reches, A., Bembi, B., & Zimran, A. (1996). Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, *89*(9), 691–694.

Neveling, K., Feenstra, I., Gilissen, C., Hoefslot, L. H., Kamsteeg, E. J., Mensenkamp, A. R., Rodenburg, R. J., Yntema, H. G., Spruijt, L., Vermeer, S., Rinne, T., van Gassen, K. L., Bodmer, D., Lugtenberg, D., de Reuver, R., Buijsman, W., Derks, R. C., Wieskamp, N., van den Heuvel, B., Ligtenberg, M. J., ... Nelen, M. R. (2013). A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Human mutation*, *34*(12), 1721–1726.

Newsday, V., Fish, M., Rohrer, J. D., Majounie, E., Williams, N., Hack, M., Warren, J. D., & Morris, H. R. (2010). Perry syndrome due to the DCTN1 G71R mutation: a distinctive levodopa responsive disorder with behavioral syndrome, vertical gaze palsy, and respiratory failure. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *25*(6), 767–770.

- Nicolini, P., Mari, D., Abbate, C., Inglese, S., Bertagnoli, L., Tomasini, E., Rossi, P. D., & Lombardi, F. (2020). Autonomic function in amnesic and non-amnesic mild cognitive impairment: spectral heart rate variability analysis provides evidence for a brain-heart axis. *Scientific reports*, *10*(1), 11661.
- Nilsson, M., Malmgren, H., Samiotaki, M., Kwiatkowski, M., Chowdhary, B. P., & Landegren, U. (1994). Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science (New York, N.Y.)*, *265*(5181), 2085–2088.
- Ogar, J. M., Dronkers, N. F., Brambati, S. M., Miller, B. L., & Gorno-Tempini, M. L. (2007). Progressive nonfluent aphasia and its characteristic motor speech deficits. *Alzheimer disease and associated disorders*, *21*(4), S23–S30.
- Okazaki, T., Murata, M., Kai, M., Adachi, K., Nakagawa, N., Kasagi, N., Matsumura, W., Maegaki, Y., & Nanba, E. (2016). Clinical Diagnosis of Mendelian Disorders Using a Comprehensive Gene-Targeted Panel Test for Next-Generation Sequencing. *Yonago acta medica*, *59*(2), 118–125.
- Olszewska, D. A., Lonergan, R., Fallon, E. M., & Lynch, T. (2016). Genetics of Frontotemporal Dementia. *Current neurology and neuroscience reports*, *16*(12), 107.
- Origone, P., Accardo, J., Verdiani, S., Lamp, M., Arnaldi, D., Bellone, E., Picco, A., Morbelli, S., Mandich, P., & Nobili, F. (2015). Neuroimaging features in C9orf72 and TARDBP double mutation with FTD phenotype. *Neurocase*, *21*(4), 529–534.
- Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience*, *30*, 575–621.
- Ozelius, L. J., Hewett, J. W., Page, C. E., Bressman, S. B., Kramer, P. L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M. F., Raymond, D., Corey, D. P., Fahn, S., Risch, N. J., Buckler, A. J., Gusella, J. F., & Breakefield, X. O. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nature genetics*, *17*(1), 40–48.
- Paisán-Ruiz, C., Bhatia, K. P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N. W., Hardy, J., Houlden, H., Singleton, A., & Schneider, S. A. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Annals of neurology*, *65*(1), 19–23.
- Paisán-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simón, J., van der Brug, M., López de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A. M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J. R., Nicholl, D., Martí Carrera, I., Pena, A. S., de Silva, R., Lees, A., Martí-Massó, J. F., Pérez-Tur, J., Wood, N. W., ... Singleton, A. B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, *44*(4), 595–600.
- Pajusalu, S., Kahre, T., Roomere, H., Murumets, Ü., Roht, L., Simenson, K., Reimand, T., & Öunap, K. (2018). Large gene panel sequencing in clinical diagnostics—results from 501 consecutive cases. *Clinical genetics*, *93*(1), 78–83.
- Paraskevas, G. P., Yapijakis, C., Bougea, A., Constantinides, V., Bourbouli, M., Stamboulis, E., & Kapaki, E. (2017). Novel PANK2 mutation in the first Greek compound heterozygote patient with pantothenate-kinase-associated neurodegeneration. *SAGE open medical case reports*, *5*, 2050313X17720101.
- Paucar, M., Taylor, A. M. R., Hadjivassiliou, M., Fogel, B. L., & Svenningsson, P. (2019). Progressive Ataxia with Elevated Alpha-Fetoprotein: Diagnostic Issues and Review of the Literature. Tremor and other hyperkinetic movements (New York, N.Y.), *9*, 10.7916/tohm.v0.708.
- Paulson H. L. (2009). The spinocerebellar ataxias. *Journal of neuro-ophthalmology: the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, *29*(3), 227–237.
- Perry, T. L., Bratty, P. J., Hansen, S., Kennedy, J., Urquhart, N., & Dolman, C. L. (1975). Hereditary mental depression and Parkinsonism with taurine deficiency. *Archives of neurology*, *32*(2), 108–113.

Petersen, R. C., Stevens, J. C., Ganguli, M., Tangalos, E. G., Cummings, J. L., & DeKosky, S. T. (2001). Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, *56*(9), 1133–1142.

Petronis, A., Heng, H. H., Tatuch, Y., Shi, X. M., Klempan, T. A., Tsui, L. C., Ashizawa, T., Surh, L. C., Holden, J. J., & Kennedy, J. L. (1996). Direct detection of expanded trinucleotide repeats using PCR and DNA hybridization techniques. *American journal of medical genetics*, *67*(1), 85–91.

Pick A. Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager Medizinische Wochenschrift*. 1892;17:165–167.

Plassman, B. L., Langa, K. M., Fisher, G. G., Heeringa, S. G., Weir, D. R., Ofstedal, M. B., Burke, J. R., Hurd, M. D., Potter, G. G., Rodgers, W. L., Steffens, D. C., McArdle, J. J., Willis, R. J., & Wallace, R. B. (2008). Prevalence of cognitive impairment without dementia in the United States. *Annals of internal medicine*, *148*(6), 427–434.

Platonov F.A., Illarioshkin S.N., Kononova S.K., Gogolev M.P., Ivanova-Smolenskaya I.A. (2004). Type 1 spinocerebellar ataxia in Yakutia: incidence and clinico-genetic comparisons. *Meditsinskaya genetika*, *3*(5): 242–248.

Portelius, E., Fortea, J., Molinuevo, J. L., Gustavsson, M. K., Andreasson, U., & Sanchez-Valle, R. (2012). The amyloid- β isoform pattern in cerebrospinal fluid in familial PSEN1 M139T- and L286P-associated Alzheimer's disease. *Molecular medicine reports*, *5*(4), 1111–1115.

Pottier, C., Bieniek, K. F., Finch, N., van de Vorst, M., Baker, M., Perkersen, R., Brown, P., Ravenscroft, T., van Blitterswijk, M., Nicholson, A. M., DeTure, M., Knopman, D. S., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Petersen, R. C., Boylan, K. B., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Veltman, J. A., Gilissen, C., ... Rademakers, R. (2015). Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta neuropathologica*, *130*(1), 77–92.

Pottier, C., Rampersaud, E., Baker, M., Wu, G., Wu, J., McCauley, J. L., Zuchner, S., Schule, R., Bermudez, C., Hussain, S., Cooley, A., Wallace, M., Zhang, J., Taylor, J. P., Benatar, M., & Rademakers, R. (2018). Identification of compound heterozygous variants in OPTN in an ALS-FTD patient from the CReATe consortium: a case report. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, *19*(5-6), 469–471.

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, *9*(1), 63–75.e2.

Puls, I., Jonnakuty, C., LaMonte, B. H., Holzbaur, E. L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M. K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S. J., Brown, R. H., Jr, Ludlow, C. L., & Fischbeck, K. H. (2003). Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature genetics*, *33*(4), 455–456.

Pulst, S. M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X. N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S., Orozco-Diaz, G., Lunkes, A., DeJong, P., Rouleau, G. A., Auburger, G., Korenberg, J. R., Figueroa, C., & Sahba, S. (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nature genetics*, *14*(3), 269–276.

Puschmann A. (2017). New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Current neurology and neuroscience reports*, *17*(9), 66.

Pyle, A., Smertenko, T., Bargiela, D., Griffin, H., Duff, J., Appleton, M., Douroudis, K., Pfeffer, G., Santibanez-Koref, M., Eglon, G., Yu-Wai-Man, P., Ramesh, V., Horvath, R., & Chinnery, P. F. (2015). Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain: a journal of neurology*, *138*(Pt 2), 276–283.

Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgiati, S., Breedveld, G. J., Graafland, J., Wu, B., Xu, F., Erro, R., Amboni, M., Pappatà, S., Quarantelli, M., Annesi, G., Quattrone, A., Chien, H. F., Barbosa, E. R., International Parkinsonism Genetics Network, Oostra, B. A., Barone, P., Wang, J., ... Bonifati, V. (2013). Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Human mutation*, 34(9), 1208–1215.

Queralt, R., Ezquerro, M., Castellví, M., Lleó, A., Blesa, R., & Oliva, R. (2001). Detection of the presenilin 1 gene mutation (M139T) in early-onset familial Alzheimer disease in Spain. *Neuroscience letters*, 299(3), 239–241.

Quinn N. (1989). Multiple system atrophy--the nature of the beast. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, Suppl*(Suppl), 78–89.

Rainier, S., Thomas, D., Tokarz, D., Ming, L., Bui, M., Plein, E., Zhao, X., Lemons, R., Albin, R., Delaney, C., Alvarado, D., & Fink, J. K. (2004). Myofibrillogenesis regulator 1 gene mutations cause paroxysmal dystonic choreoathetosis. *Archives of neurology*, 61(7), 1025–1029.

Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Goebel, I., Mubaidin, A. F., Wriekat, A. L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A. M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C. G., Behrens, M. I., & Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics*, 38(10), 1184–1191.

Rampoldi, L., Dobson-Stone, C., Rubio, J. P., Danek, A., Chalmers, R. M., Wood, N. W., Verellen, C., Ferrer, X., Malandrini, A., Fabrizi, G. M., Brown, R., Vance, J., Pericak-Vance, M., Rudolf, G., Carrè, S., Alonso, E., Manfredi, M., Németh, A. H., & Monaco, A. P. (2001). A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nature genetics*, 28(2), 119–120.

Rascovsky, K., Hodges, J. R., Knopman, D., Mendez, M. F., Kramer, J. H., Neuhaus, J., van Swieten, J. C., Seelaar, H., Dopper, E. G., Onyike, C. U., Hillis, A. E., Josephs, K. A., Boeve, B. F., Kertesz, A., Seeley, W. W., Rankin, K. P., Johnson, J. K., Gorno-Tempini, M. L., Rosen, H., Prioleau-Latham, C. E., ... Miller, B. L. (2011). Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain: a journal of neurology*, 134(Pt 9), 2456–2477.

Ratnavalli, E., Brayne, C., Dawson, K., & Hodges, J. R. (2002). The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*, 58(11), 1615–1621.

Razay, G., & Vreugdenhil, A. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: midlife obesity increases risk of future dementia. *BMJ (Clinical research ed.)*, 331(7514), 455.

Reale, C., Panteghini, C., Carecchio, M., & Garavaglia, B. (2018). The relevance of gene panels in movement disorders diagnosis: A lab perspective. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 22(2), 285–291.

Redin, C., Gérard, B., Lauer, J., Herenger, Y., Muller, J., Quartier, A., Masurel-Paulet, A., Willems, M., Lesca, G., El-Chehadeh, S., Le Gras, S., Vicaire, S., Philipps, M., Dumas, M., Geoffroy, V., Feger, C., Haumesser, N., Alembik, Y., Barth, M., Bonneau, D., ... Piton, A. (2014). Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *Journal of medical genetics*, 51(11), 724–736.

Refsum, S., & Skre, H. (1978). Neurological approaches to the inherited ataxias. *Advances in neurology*, 21, 1–13.

Regis, S., Corsolini, F., Stroppiano, M., Cusano, R., & Filocamo, M. (2002). Contribution of arylsulfatase A mutations located on the same allele to enzyme activity reduction and metachromatic leukodystrophy severity. *Human genetics*, 110(4), 351–355.

- Reitz, C., Rogaeva, E., & Beecham, G. W. (2020). Late-onset vs nonmendelian early-onset Alzheimer disease: A distinction without a difference?. *Neurology. Genetics*, *6*(5), e512.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., Hernandez, D. G., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, *72*(2), 257–268.
- Rentzsch, P., Schubach, M., Shendure, J., & Kircher, M. (2021). CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome medicine*, *13*(1), 31.
- Richard, E., Desviat, L. R., Pérez, B., Pérez-Cerdá, C., & Ugarte, M. (1997). Three novel splice mutations in the PCCA gene causing identical exon skipping in propionic acidemia patients. *Human genetics*, *101*(1), 93–96.
- 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., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (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. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, *17*(5), 405–424.
- Ringholz, G. M., Appel, S. H., Bradshaw, M., Cooke, N. A., Mosnik, D. M., & Schulz, P. E. (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*, *65*(4), 586–590.
- Ringman, J. M., Monsell, S., Ng, D. W., Zhou, Y., Nguyen, A., Coppola, G., Van Berlo, V., Mendez, M. F., Tung, S., Weintraub, S., Mesulam, M. M., Bigio, E. H., Gitelman, D. R., Fisher-Hubbard, A. O., Albin, R. L., & Vinters, H. V. (2016). Neuropathology of Autosomal Dominant Alzheimer Disease in the National Alzheimer Coordinating Center Database. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *75*(3), 284–290.
- Robinson, P. N., & Mundlos, S. (2010). The human phenotype ontology. *Clinical genetics*, *77*(6), 525–534.
- Rogaeva E. (2002). The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, *2*(1), 1–10.
- Rohrer, J. D., Guerreiro, R., Vandrovicova, J., Uphill, J., Reiman, D., Beck, J., Isaacs, A. M., Authier, A., Ferrari, R., Fox, N. C., Mackenzie, I. R., Warren, J. D., de Silva, R., Holton, J., Revesz, T., Hardy, J., Mead, S., & Rossor, M. N. (2009). The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*, *73*(18), 1451–1456.
- Ross, G. W., & Petrovitch, H. (2001). Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs & aging*, *18*(11), 797–806.
- Rosso, S. M., Donker Kaat, L., Baks, T., Joosse, M., de Koning, I., Pijnenburg, Y., de Jong, D., Dooijes, D., Kamphorst, W., Ravid, R., Niermeijer, M. F., Verheij, F., Kremer, H. P., Scheltens, P., van Duijn, C. M., Heutink, P., & van Swieten, J. C. (2003). Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain: a journal of neurology*, *126*(Pt 9), 2016–2022.
- Rossor, M. N., Fox, N. C., Mummery, C. J., Schott, J. M., & Warren, J. D. (2010). The diagnosis of young-onset dementia. *The Lancet. Neurology*, *9*(8), 793–806.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, *475*(7356), 348–352.

- 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*(3), 174–183.
- Sá, F., Pinto, P., Cunha, C., Lemos, R., Letra, L., Simões, M., & Santana, I. (2012). Differences between Early and Late-Onset Alzheimer's Disease in Neuropsychological Tests. *Frontiers in neurology*, *3*, 81.
- Sachs-Ericsson, N., & Blazer, D. G. (2015). The new DSM-5 diagnosis of mild neurocognitive disorder and its relation to research in mild cognitive impairment. *Aging & mental health*, *19*(1), 2–12.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, *239*(4839), 487–491.
- San Lucas, F. A., Wang, G., Scheet, P., & Peng, B. (2012). Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *28*(3), 421–422.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467.
- Savva, G. M., Wharton, S. B., Ince, P. G., Forster, G., Matthews, F. E., Brayne, C., & Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (2009). Age, neuropathology, and dementia. *The New England journal of medicine*, *360*(22), 2302–2309.
- Schneider, S. A., Schneider, U. H., & Klein, C. (2011). Genetic testing for neurologic disorders. *Seminars in neurology*, *31*(5), 542–552.
- Schwarz, J. M., Rödelserger, C., Schuelke, M., & Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*, *7*(8), 575–576.
- Sciamanna, G., Tassone, A., Martella, G., Mandolesi, G., Puglisi, F., Cuomo, D., Madeo, G., Ponterio, G., Standaert, D. G., Bonsi, P., & Pisani, A. (2011). Developmental profile of the aberrant dopamine D2 receptor response in striatal cholinergic interneurons in DYT1 dystonia. *PloS one*, *6*(9), e24261.
- Seidner, G., Alvarez, M. G., Yeh, J. I., O'Driscoll, K. R., Klepper, J., Stump, T. S., Wang, D., Spinner, N. B., Birnbaum, M. J., & De Vivo, D. C. (1998). GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nature genetics*, *18*(2), 188–191.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *1*(1), a006189.
- Shahi, G. S., & Moochhala, S. M. (1991). Smoking and Parkinson's disease--a new perspective. *Reviews on environmental health*, *9*(3), 123–136.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, *26*(10), 1135–1145.
- Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., Rosenbaum, A. M., Wang, M. D., Zhang, K., Mitra, R. D., & Church, G. M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5741), 1728–1732.
- Shi, Y., Lin, S., Staats, K. A., Li, Y., Chang, W. H., Hung, S. T., Hendricks, E., Linares, G. R., Wang, Y., Son, E. Y., Wen, X., Kisler, K., Wilkinson, B., Menendez, L., Sugawara, T., Woolwine, P., Huang, M., Cowan, M. J., Ge, B., Koutsodendris, N., ... Ichida, J. K. (2018). Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nature medicine*, *24*(3), 313–325.

Shojaee, S., Sina, F., Banihosseini, S. S., Kazemi, M. H., Kalhor, R., Shahidi, G. A., Fakhrai-Rad, H., Ronaghi, M., & Elahi, E. (2008). Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *American journal of human genetics*, 82(6), 1375–1384.

Sieben, A., Van Langenhove, T., Engelborghs, S., Martin, J. J., Boon, P., Cras, P., De Deyn, P. P., Santens, P., Van Broeckhoven, C., & Cruts, M. (2012). The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta neuropathologica*, 124(3), 353–372.

Siintola, E., Topcu, M., Aula, N., Lohi, H., Minassian, B. A., Paterson, A. D., Liu, X. Q., Wilson, C., Lahtinen, U., Anttonen, A. K., & Lehesjoki, A. E. (2007). The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *American journal of human genetics*, 81(1), 136–146.

Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L. F., de Boer, E. N., Almomani, R., Boven, L. G., van den Berg, M. P., van Spaendonck-Zwarts, K. Y., van Tintelen, J. P., Sijmons, R. H., Jongbloed, J. D., & Sinke, R. J. (2013). Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Human mutation*, 34(7), 1035–1042.

Sisodia S. S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 6075–6079.

Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M. N., Gade, A., Johannsen, P., Sørensen, S. A., Gydesen, S., Fisher, E. M., & Collinge, J. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nature genetics*, 37(8), 806–808.

Snowden, J. S., Rollinson, S., Thompson, J. C., Harris, J. M., Stopford, C. L., Richardson, A. M., Jones, M., Gerhard, A., Davidson, Y. S., Robinson, A., Gibbons, L., Hu, Q., DuPlessis, D., Neary, D., Mann, D. M., & Pickering-Brown, S. M. (2012). Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. *Brain: a journal of neurology*, 135(Pt 3), 693–708.

Soden, S. E., Saunders, C. J., Willig, L. K., Farrow, E. G., Smith, L. D., Petrikin, J. E., LePichon, J. B., Miller, N. A., Thiffault, I., Dinwiddie, D. L., Twist, G., Noll, A., Heese, B. A., Zellmer, L., Atherton, A. M., Abdelmoity, A. T., Safina, N., Nyp, S. S., Zuccarelli, B., Larson, I. A., ... Kingsmore, S. F. (2014). Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Science translational medicine*, 6(265), 265ra168.

Sonnen, J. A., Larson, E. B., Crane, P. K., Haneuse, S., Li, G., Schellenberg, G. D., Craft, S., Leverenz, J. B., & Montine, T. J. (2007). Pathological correlates of dementia in a longitudinal, population-based sample of aging. *Annals of neurology*, 62(4), 406–413.

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–840.

Steeves, T. D., Day, L., Dykeman, J., Jette, N., & Pringsheim, T. (2012). The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 27(14), 1789–1796.

Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., & Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human mutation*, 21(6), 577–581.

Stevanin, G., & Brice, A. (2008). Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4). *Cerebellum (London, England)*, 7(2), 170–178.

Stevanin, G., Fujigasaki, H., Lebre, A. S., Camuzat, A., Jeannequin, C., Dode, C., Takahashi, J., San, C., Bellance, R., Brice, A., & Durr, A. (2003). Huntington's disease-like

phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain : a journal of neurology*, 126(Pt 7), 1599–1603.

Stevanin, G., Paternotte, C., Coutinho, P., Klebe, S., Elleuch, N., Loureiro, J. L., Denis, E., Cruz, V. T., Dürr, A., Prud'homme, J. F., Weissenbach, J., Brice, A., & Hazan, J. (2007). A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia (SPG32) on chromosome 14q12-q21. *Neurology*, 68(21), 1837–1840.

Stevanovic, N., Skakic, A., Minic, P., Sovtic, A., Stojiljkovic, M., Pavlovic, S., & Andjelkovic, M. (2021). Identification and Classification of Novel Genetic Variants: En Route to the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8821.

Stoeck, K., Psychogios, M. N., Ohlenbusch, A., Steinfeld, R., & Schmidt, J. (2016). Late-Onset Metachromatic Leukodystrophy with Early Onset Dementia Associated with a Novel Missense Mutation in the Arylsulfatase A Gene. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 51(3), 683–687.

Stopford, C. L., Snowden, J. S., Thompson, J. C., & Neary, D. (2008). Variability in cognitive presentation of Alzheimer's disease. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*, 44(2), 185–195.

Stumpf, J. D., Bailey, C. M., Spell, D., Stillwagon, M., Anderson, K. S., & Copeland, W. C. (2010). mip1 containing mutations associated with mitochondrial disease causes mutagenesis and depletion of mtDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Human molecular genetics*, 19(11), 2123–2133.

Svetel M, Hartig M, Cvetković D, Beaubois C, Maksić J, Novaković I, Krajinović M, Kostić V. (2019). Phenotypic expression and founder effect of PANK2 c.1583C>T (p.T528M) mutation in Serbian pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients. *Arch Biol Sci*, 71(2), 275-80.

Sun, L., Huang, Y., Zhao, S., Zhao, J., Yan, Z., Guo, Y., Lin, M., Zhong, W., Yin, Y., Chen, Z., Zhang, N., Zhang, Y., Zhao, Z., Li, Q., Wang, L., Dong, X., Li, Y., Li, X., Qiu, G., DISCO (Deciphering Disorders Involving Scoliosis & COmorbidities) study group, ... Wu, N. (2021). Deciphering the mutational signature of congenital limb malformations. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 24, 961–970.

Taes, I., Goris, A., Lemmens, R., van Es, M. A., van den Berg, L. H., and Chio, A. (2010). Tau levels do not influence human ALS or motor neuron degeneration in the *SOD1^{G93A}* mouse. *Neurology* 74, 1687–1693.

Tandberg, E., Larsen, J. P., & Karlsen, K. (1998). A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 13(6), 895–899.

Termsarasab P. (2019). Chorea. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 25(4), 1001–1035.

Tomić, A., Dobričić, V., Novaković, I., Svetel, M., Pekmezović, T., Kresojević, N., Potrebić, A., & Kostić, V. S. (2013). Mutational analysis of ATP7B gene and the genotype-phenotype correlation in patients with Wilson's disease in Serbia. *Vojnosanitetski pregled*, 70(5), 457–462.

Tomić, A., Petrović, I., Svetel, M., Dobričić, V., Mišković, N. D., & Kostić, V. S. (2015). Pattern of disease progression in atypical form of pantothenate-kinase-associated neurodegeneration (PKAN)—Prospective study. *Parkinsonism & related disorders*, 21(5), 521–524.

Topçu, M., Tan, H., Yalnizoğlu, D., Usubütün, A., Saatçi, I., Aynaci, M., Anlar, B., Topaloğlu, H., Turanlı, G., Köse, G., & Aysun, S. (2004). Evaluation of 36 patients from Turkey with neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical, neurophysiological, neuroradiological and histopathologic studies. *The Turkish journal of pediatrics*, 46(1), 1–10.

Torpy, J. M., Burke, A. E., & Glass, R. M. (2008). JAMA patient page. Delirium. *JAMA*, *300*(24), 2936.

Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., & Tora, L. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, *378*(6555), 403–406.

Tsuji, S., Choudary, P. V., Martin, B. M., Stubblefield, B. K., Mayor, J. A., Barranger, J. A., & Ginns, E. I. (1987). A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *The New England journal of medicine*, *316*(10), 570–575.

Ueno, S., Maruki, Y., Nakamura, M., Tomemori, Y., Kamae, K., Tanabe, H., Yamashita, Y., Matsuda, S., Kaneko, S., & Sano, A. (2001). The gene encoding a newly discovered protein, chorein, is mutated in chorea-acanthocytosis. *Nature genetics*, *28*(2), 121–122.

Ullrich, D., Ullrich, K., & Marten, M. (2014). A longitudinal assessment of early childhood education with integrated speech therapy for children with significant language impairment in Germany. *International journal of language & communication disorders*, *49*(5), 558–566.

Uttley, L., Carroll, C., Wong, R., Hilton, D. A., & Stevenson, M. (2020). Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic review of global incidence, prevalence, infectivity, and incubation. *The Lancet. Infectious diseases*, *20*(1), e2–e10.

Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., ... Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5674), 1158–1160.

van Blitterswijk, M., Baker, M. C., DeJesus-Hernandez, M., Ghidoni, R., Benussi, L., Finger, E., Hsiung, G. Y., Kelley, B. J., Murray, M. E., Rutherford, N. J., Brown, P. E., Ravenscroft, T., Mullen, B., Ash, P. E., Bieniek, K. F., Hatanpaa, K. J., Karydas, A., Wood, E. M., Coppola, G., Bigio, E. H., ... Rademakers, R. (2013). C9ORF72 repeat expansions in cases with previously identified pathogenic mutations. *Neurology*, *81*(15), 1332–1341.

van de Leemput, J., Chandran, J., Knight, M. A., Holtzclaw, L. A., Scholz, S., Cookson, M. R., Houlden, H., Gwinn-Hardy, K., Fung, H. C., Lin, X., Hernandez, D., Simon-Sanchez, J., Wood, N. W., Giunti, P., Rafferty, I., Hardy, J., Storey, E., Gardner, R. J., Forrest, S. M., Fisher, E. M., ... Singleton, A. B. (2007). Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS genetics*, *3*(6), e108.

van de Warrenburg, B. P., Schouten, M. I., de Bot, S. T., Vermeer, S., Meijer, R., Pennings, M., Gilissen, C., Willemsen, M. A., Scheffer, H., & Kamsteeg, E. J. (2016). Clinical exome sequencing for cerebellar ataxia and spastic paraplegia uncovers novel gene-disease associations and unanticipated rare disorders. *European journal of human genetics : EJHG*, *24*(10), 1460–1466.

van der Flier, W. M., Pijnenburg, Y. A., Fox, N. C., & Scheltens, P. (2011). Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ε4 allele. *The Lancet. Neurology*, *10*(3), 280–288.

van Duijn, C. M., Dekker, M. C., Bonifati, V., Galjaard, R. J., Houwing-Duistermaat, J. J., Snijders, P. J., Testers, L., Breedveld, G. J., Horstink, M., Sandkuijl, L. A., van Swieten, J. C., Oostra, B. A., & Heutink, P. (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *American journal of human genetics*, *69*(3), 629–634.

van Swieten, J. C., Brusse, E., de Graaf, B. M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B. A., & Heutink, P. (2003).

A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *American journal of human genetics*, 72(1), 191–199.

Vanier, M. T., & Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clinical genetics*, 64(4), 269–281.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., ... Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 735–741.

Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Révész, T., Plant, G., & Ghiso, J. (1999). A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature*, 399(6738), 776–781.

Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O. A., Dachsel, J. C., Kachergus, J. M., Lincoln, S. J., Soto-Ortolaza, A. I., Cobb, S. A., Wilhoite, G. J., Bacon, J. A., Behrouz, B., Melrose, H. L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D. M., Conibear, E., Wasserman, W. W., Aasly, J. O., Burkhard, P. R., Djaldetti, R., ... Farrer, M. J. (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *American journal of human genetics*, 89(1), 162–167.

Vlachos, G. S., Kosmidis, M. H., Yannakoulia, M., Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G., Tzoulaki, I., Georgiou, A. N., Sakka, P., Anastasiou, C. A., Stefanis, L., & Scarmeas, N. (2021). Incidence of mild cognitive impairment in the elderly population in Greece: results from the HELIAD study. *Aging clinical and experimental research*, 33(10), 2679–2688.

Wang, J. L., Yang, X., Xia, K., Hu, Z. M., Weng, L., Jin, X., Jiang, H., Zhang, P., Shen, L., Guo, J. F., Li, N., Li, Y. R., Lei, L. F., Zhou, J., Du, J., Zhou, Y. F., Pan, Q., Wang, J., Wang, J., Li, R. Q., ... Tang, B. S. (2010). TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain: a journal of neurology*, 133(Pt 12), 3510–3518.

Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research*, 38(16), e164.

Watts, G. D., Wymer, J., Kovach, M. J., Mehta, S. G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M. P., & Kimonis, V. E. (2004). Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics*, 36(4), 377–381.

Wenning, G. K., Kiechl, S., Seppi, K., Müller, J., Högl, B., Saletu, M., Rungger, G., Gasperi, A., Willeit, J., & Poewe, W. (2005). Prevalence of movement disorders in men and women aged 50-89 years (Bruneck Study cohort): a population-based study. *The Lancet. Neurology*, 4(12), 815–820.

Williams, A. J., & Paulson, H. L. (2008). Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends in neurosciences*, 31(10), 521–528.

Worth, P. F., Giunti, P., Gardner-Thorpe, C., Dixon, P. H., Davis, M. B., & Wood, N. W. (1999). Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: linkage in a large British family to a 7.6-cM region on chromosome 15q14-21.3. *American journal of human genetics*, 65(2), 420–426.

Wu, Y. W., Hess, C. P., Singhal, N. S., Groden, C., & Toro, C. (2013). Idiopathic basal ganglia calcifications: an atypical presentation of PKAN. *Pediatric neurology*, 49(5), 351–354.

Xiao, X., Liu, H., Liu, X., Zhang, W., Zhang, S., & Jiao, B. (2021). APP, PSEN1, and PSEN2 Variants in Alzheimer's Disease: Systematic Re-evaluation According to ACMG Guidelines. *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 695808.

Xue, Y., Ankala, A., Wilcox, W. R., & Hegde, M. R. (2015). Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation

sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(6), 444–451.

Yamamoto, T., Igarashi, N., Shimojima, K., Sangu, N., Sakamoto, Y., Shimoji, K., & Nijima, S. (2016). Use of targeted next-generation sequencing for molecular diagnosis of craniosynostosis: Identification of a novel de novo mutation of EFN1. *Congenital anomalies*, 56(2), 91–93.

Yan, J., Deng, H. X., Siddique, N., Fecto, F., Chen, W., Yang, Y., Liu, E., Donkervoort, S., Zheng, J. G., Shi, Y., Ahmeti, K. B., Brooks, B., Engel, W. K., & Siddique, T. (2010). Frameshift and novel mutations in FUS in familial amyotrophic lateral sclerosis and ALS/dementia. *Neurology*, 75(9), 807–814.

Yang, Y., Muzny, D. M., Xia, F., Niu, Z., Person, R., Ding, Y., Ward, P., Braxton, A., Wang, M., Buhay, C., Veeraraghavan, N., Hawes, A., Chiang, T., Leduc, M., Beuten, J., Zhang, J., He, W., Scull, J., Willis, A., Landsverk, M., ... Eng, C. M. (2014). Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*, 312(18), 1870–1879.

Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11), 1544–1557.

Zalar, B., Maver, A., Kovanda, A., Peterlin, A., & Peterlin, B. (2018). Clinical exome sequencing in dementias: a preliminary study. *Psychiatria Danubina*, 30(2), 216–219.

Zhang, D. F., Li, J., Wu, H., Cui, Y., Bi, R., Zhou, H. J., Wang, H. Z., Zhang, C., Wang, D., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI), Kong, Q. P., Li, T., Fang, Y., Jiang, T., & Yao, Y. G. (2016). CFH Variants Affect Structural and Functional Brain Changes and Genetic Risk of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 41(4), 1034–1045.

Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 38(3), 95–109.

Zhou, B., Westaway, S. K., Levinson, B., Johnson, M. A., Gitschier, J., & Hayflick, S. J. (2001). A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nature genetics*, 28(4), 345–349.

Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W. B., Subramony, S. H., Zoghbi, H. Y., & Lee, C. C. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nature genetics*, 15(1), 62–69.

Zimprich, A., Grabowski, M., Asmus, F., Naumann, M., Berg, D., Bertram, M., Scheidtmann, K., Kern, P., Winkelmann, J., Müller-Myhsok, B., Riedel, L., Bauer, M., Müller, T., Castro, M., Meitinger, T., Strom, T. M., & Gasser, T. (2001). Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nature genetics*, 29(1), 66–69.

8. Prilozi

8.1 Prilog 1- Dozvola Etičkog komiteta Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije



Broj: 402/6
Dana: 30.01.2020. godine

Na osnovu odredaba Zakona zdravstvenoj zaštiti Republike Srbije („Službeni glasnik RS” br. 25/2019), Zakona o lekovima i medicinskim sredstvima Republike Srbije („Službeni glasnik RS” br. 30/2010, 107/2012, 105/2017 i 113/2017), Zakona o pravima pacijenata („Sl. glasnik RS”, br. 45/13), Zakona o zaštiti podataka o ličnosti „Sl. glasnik RS”, br. 97/2008, 104/2009, idr. Zakon), Zakona o zdravstvenoj dokumentaciji i evidencijama u oblasti zdravstva („Sl. glasnik RS”, br. 123/2014, 106/2015, 105/2017, postupajući u skladu sa Smernicama Dobre kliničke prakse u kliničkom ispitivanju (GCP)- („Sl. glasnik RS”, br. 106/2017), Poslovnika o radu Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije br. 3098/39 od 26.04.2012. god., Etički odbor Kliničkog centra Srbije u sastavu: Prof. dr Andrija Bogdanović – predsednik, Prof. dr Branislava Milenković- zamenik predsednika, Prof. dr Marina Svetel (nije učestvovala u glasanju), Prof. dr Aleksandra Perić-Popadić, Dr sci med Dijana Šefer - klinički farmakolog, Prof. dr Aleksandra Jotić i Doc. dr Danijel Galun – lekari specijalisti svi zaposleni u Kliničkom centru Srbije, odlučujući o zahtevu Prof. dr Marine Svetel, na svojoj 3. sednici održanoj dana 30.01.2020. godine, doneo je sledeću

О Д Л У К У

Odobrava se sprovođenje kliničkog ispitivanja pod nazivom: "Analiza retkih neurodegenerativnih bolesti metodom nove generacije sekvenciranja". Glavni istraživač je Prof. dr Marina Svetel. Članovi istraživačkog tima su: Prof. dr Vladimir Kostić i Prof. dr Nataša Dragašević. Istraživači saradnici su: Prof. dr Ivana Novaković i Marija Branković.

Ispitivanje će biti sprovedeno na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije u saradnji sa Medicinskim fakultetom Univerziteta u Beogradu. Rezultati ispitivanja biće korišćeni za izradu doktorske disertacije (Marija Branković). Mentor doktorske disertacije je Prof. dr Ivana Novaković.

Priklom donošenja ove odluke, Etički odbor je razmatrao sledeću dokumentaciju:

- 1). Propratno pismo/Obrasci za odobrenje akademskog kliničkog ispitivanja podneti Etičkom odboru KCS,
- 2). Saglasnost stručnog Kolegijuma Klinike za neurologiju KCS od 15.01.2020. godine,
- 3). Protokol /plan ispitivanja,
- 4). Obrazloženje doktorske teze,
- 5). Informacija za pacijenta sa obrascem za davanje pisanog pristanka i
- 6). Biografija glavnog istraživača i istraživača saradnika.

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА
Prof. dr Andrija Bogdanović


8.2 Prilog 2

Tabela 8.2.1: standardni genetički testovi prethodno implementirani u dijagnostiku neuroloških oboljenja u laboratoriji za molekularni u genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja Klinike za Neurologiju, UKCS, Beograd, Srbija

Oboljenje	Naziv gena	Sekvenca od interesa	Metoda	Uzročna mutacija
Demencije	<i>C9orf72, APP, MAPT, GRN, APOE, VCP</i>	<i>C9ORF72</i> -intronska sekvenca; <i>APP</i> -egzoni 16 i 17; <i>MAPT</i> - ex1,9-13; <i>GRN</i> -od 0 do 12; <i>VCP</i> -ex5	Fragment analiza, sekvenciranje po Sangeru, tr-, Real-Time pcr	Ekspanzije mikrosatelitskih ponovaka, tačkaste varijante, kratke insercije i delecije, varijante faktori rizika
Parkinsonova bolest	<i>PARKIN, GBA, LRRK2, VPS35</i>	<i>GBA</i> - ex 8-11; <i>VPS35</i> - ex 15; <i>LRRK2</i> - ex 24,25,29,30,31,35,38,40,41; <i>PARKIN</i> -ex 1-12	Sekvenciranje po Sangeru, MLPA	Tačkaste varijante, kratke insercije i delecije, velike delecije i duplikacije
Primarne i sekundarne distonije	<i>TORIA, GCHI, THAP1, PNKD, PRRT2, SGCE, SLC2A1, PANK2, ATP7B, NPC1</i>	<i>TORIA</i> -delecija tri bazna para za; <i>THAP1</i> - ex 1,2,3; <i>GCHI</i> -promotor – ex 6; <i>PNKD</i> -ex 1 i 2; <i>SLC2A1</i> -od 1 do 10; <i>PRRT2</i> -ex 1-4; <i>PANK2</i> -ex 5 i 6; <i>ATP7B</i> -ex 5,8,13,14,15; <i>NPC1</i> -ex 8,19,20,21	Fragment analiza, sekvenciranje po Sangeru	Delecija tri bazna para, tačkaste varijante, kratke insercije i delecije
Spinocerebelarne ataksije	<i>ATXN1, ATXN2, ATXN3, CACNA1A, ATXN7, TBP, ANO10, FXN</i>	Ekspanzije u kodirajućim regionima gena <i>ATXN1, ATXN2, ATXN3, CACNA1A, ATXN7 i TBP</i> ; <i>ANO10</i> -ex 6-ciljana patološka varijanta; <i>FXN</i> -intron 1	Fragment analiza, sekvenciranje po Sangeru, agarozna gel elektroforeza	Ekspanzije mikrosatelitskih ponovaka, tačkaste varijante, kratke insercije i delecije
Horeja	<i>HTT</i>	Ekspanzije u genu <i>HTT</i>	Fragment analiza	Ekspanzije mikrosatelitskih ponovaka
Amiotrofična lateralna skleroza	<i>C9ORF72, SOD1, ANG, FUS, TDP43, VCP</i>	<i>C9ORF72</i> -intronska sekvenca; <i>SOD</i> -ex. 1-5; <i>ANG</i> -ex1, <i>FUS</i> -ex 14 i 15, <i>TDP43</i> -ex 6, <i>VCP</i> -ex 5	Fragment analiza, sekvenciranje po Sangeru, RP-PCR	Ekspanzije mikrosatelitskih ponovaka, tačkaste varijante, kratke insercije i delecije
Mitohondrijska oboljenja	Najčešće se testiraju : <i>MT-ND4, MT-ND6, MT-ND1</i>	Kodirajuće sekvence fragmenata navedenih gena	Sekvenciranje po Sangeru	Ciljane tačkaste patološke varijante navedenih gena-(m.11778G>A, m.14484T>C, m.3460G>A)

RP-PCR-repeat primed PCR; ex-egzon

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Branković je rođena 1. jula 1992. u Šapcu. Diplomirala je 2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, sa prosečnom ocenom 9,12. Master akademske studije, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Humana molekularna biologija, završila je 2016. godine sa prosekom 9,67 i master radom pod nazivom „Analiza gena *NPC2* kod bolesnika sa Niman-Pikovom bolešću tipa C”, čime je stekla zvanje master biolog. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 2016. godine. Od 2017. godine je angažovana na projektu „Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma: kliničke, morfološke i molekularno genetičke korelacije“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Dobila je stipendiju Ministarstva za nauku, obrazovanje i sport Republike Slovenije za tromesečnu stručnu praksu na Kliničkom institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani. Autor je i koautor više naučnih radova objavljenih u međunarodnim časopisima i časopisima međunarodnog značaja kao i većeg broja saopštenja koji su prezentovani na konferencijama u zemlji i inostranstvu. Član je srpskog društva za molekularnu biologiju, društva genetičara Srbije i društva za neuronauke Srbije. Govori engleski i slovenački jezik.

Izjava 1

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Бранковић
број индекса М3001/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утврђивање генетичке основе ретких неуродегенеративних болести анализом клиничког егзома“

резултат сопственог истраживачког рада,

- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Бранковић

Број индекса М3001/2016

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Утврђивање генетичке основе ретких неуродегенеративних болести анализом клиничког егзома“

Ментор Проф. др Ивана Новаковић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду; Доц. Др Милица Кецкаревић Марковић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утврђивање генетичке основе ретких неуродегенеративних болести анализом клиничког егзома“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.