

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana S. Marjanović

Zastupljenost ekspanzija heksanukleotidnih ponovaka
u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* kod različitih
neurodegenerativnih bolesti

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana S. Marjanović

The prevalence of hexanucleotide repeats expansions
in the non-coding region of *C9orf72* gene in different
neurodegenerative disorders

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentori:

dr Ivana Novaković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Milica Keckarević Marković, docent
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Elka Stefanova, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Zorica Stević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Dušan Keckarević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem Prof. Dr Ivani Novaković na ukazanom poverenju i prilici da budem deo tima Laboratorije za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti, Klinike za neurologiju, UKCS. Njena velika podrška, saveti, znanje, veliko strpljenje i razumevanje učinili su ovaj put izrade disertacije mnogo lakšim.

Veliku zahvalnost dugujem Akademiku Prof. Dr Vladimiru Kostiću na ukazanoj prilici da budem deo njegovog istraživačkog tima.

Profesorkama Elki Stefanovoj i Zorici Stević zahvaljujem se na velikoj pomoći, podršci, savetima i dragocenom prenetom znanju iz oblasti neurologije koje je ne samo olakšalo pisanje ove disertacije, već i oblikovalo moje dalje usavršavanje u oblasti neurogenetike.

Docentkinji Milici Keckarević Marković zahvaljujem se na podršci, dragocenim savetima i smernicama prilikom pisanja ove teze.

Profesoru Dušanu Keckareviću hvala na predanom pristupu i savetima prilikom pisanja ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem Valeriji Dobričić na prijateljstvu, velikoj podršci i prenetom znanju u mojim prvim koracima kroz svet neurogenetike.

Koleginicama Mileni Janković i Mariji Branković veliko hvala na pomoći, podršci i vedrom duhu koji ispunjava naš svakodnevni zajednički rad u laboratoriji.

Hvala svim kolegama sa Klinike za neurologiju na stručnoj pomoći i saradnji prilikom sprovođenja ove studije kao i svim ispitanicima koji su pristali da budu deo ovog istraživanja.

Mojim „Žarkovčankama“ hvala na nesebičnom, iskrenom prijateljstvu i podršci od prvih studentskih dana.

Roditeljima i bratu hvala na strpljenju, razumevanju, motivaciji i podršci. Hvala što su moj oslonac, vetar u leđa i sigurna luka svih ovih godina.

Naslov: Zastupljenost ekspanzija heksanukleotidnih ponovaka u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* kod različitih neurodegenerativnih bolesti

Sažetak:

Otkriće ekspanzija heksanukleotidnih GGGGCC ponovaka u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* predstavlja značajan doprinos rasvetljavanju genetičke osnove amiotrofične lateralne skleroze i frontotemporalne demencije. Godinama unazad, istraživanja su fokusirana i na otkrivanje njihove potencijalne uloge i u drugim neurodegenerativnim oboljenjima. U ovoj studiji određivana je veličina *C9orf72* alela kod nekoliko neurodegenerativnih oboljenja metodama fluorescentnog PCR-a, repeat-primed PCR-a i Southern blot metodom. Takođe, dat je prikaz kliničkih parametara kao i njihove korelacije sa veličinom *C9orf72* alela.

Heterozigotna ekspanzija u genu *C9orf72* uočena je kod 31/383 (8,09%) bolesnika sa dijagnozom ALS, 9/129 (6,98%) sa FTD, 2/49 (4,08%) sa atipičnom demencijom i kod 7/22 (31,82%) sa ALS/FTD fenotipom. Ekspanzija nije registrovana kod bolesnika sa bolešću sličnoj Huntingtonovoj bolesti (80 bolesnika), MSA (44 bolesnika), PSP (73 bolesnika), BKP (118 bolesnika), AB (176 bolesnika) kao ni kod zdravih kontrola (96 ispitanika). Ukupno 6 bolesnika su bili nosioci intermedijerne veličine ponovaka na dužem alelu: 1/383 (0,26%) kod ALS, 2/80 (2,5%) kod fenokopije HB, 1/73 (1,37%) kod PSP, 1/129 (0,78%) kod FTD i 1/176 (0,57%) kod bolesnika sa AB kao i kod 3/5 (60%) asimptomatska člana jedne porodice. Jedan ALS nosilac ekspanzije na kraćem alelu imao je intermedijernu veličinu ponovaka dok su ostali nosioci ekspanzije u ALS, FTD i sa atipičnom demencijom imali manje od 20 ponovaka na kraćem alelu. Najveću učestalost u okviru grupe normalnih alela kod svih oboljenja imali su aleli sa 2, 5 i 8 ponovaka.

Dobijeni rezultati naglašavaju značaj genetičkog testiranja na prisustvo ove ekspanzije kod bolesnika sa ALS, FTD, ALS/FTD i bolesnika sa atipičnom demencijom sa teritorije Srbije.

Ključne reči: GGGGCC, *C9orf72*, ekspanzija, amiotrofična lateralna skleroza, frontotemporalna demencija, ALS/FTD, atipična demencija, korelacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj:

Title: The prevalence of hexanucleotide repeats expansions in the non-coding region of the *C9orf72* gene in different neurodegenerative disorders

Abstract:

The discovery of the hexanucleotide GGGGCC repeats expansion in the non-coding region of the *C9orf72* gene represents a significant contribution to the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. A years back, research is focusing and on discovering their potential role in other neurodegenerative disorders as well. In this study, the size of the *C9orf72* allele in different neurodegenerative disorders has been determined with methods of fluorescent PCR, repeat-primed PCR and Southern blot. Also, clinical parameters were described as well as their correlation with *C9orf72* allele repeat size.

Heterozygous expansion in *C9orf72* gene was registered in 31/383 (8,09%) patients with ALS, 9/129 (6,98%) with FTD, 2/49 (4,08%) with atypical dementia, and in 7/22 (31,82%) ALS/FTD phenotype. The expansion was not registered in patients with HD like (80 patients), MSA (44 patients), PSP (73 patients), MCI (118 patients), AB (176 patients) nor in healthy controls (96 respondents). In total, 6 patients were carriers of the intermediate repeats size on the longer allele (1/383 (0,26%) in ALS, 2/80 (2,5%) in HD-like, 1/73 (1,37%) in PSP, 1/129 (0,78%) in FTD, and in 1/176 (0,57%) patients with AD) as well as 3/5 (60%) asymptomatic family members. One ALS expansion carrier on the shorter allele had intermediate repeats, while the rest of the expansion carriers in ALS, FTD, and atypical dementia had less than 20 repeats on the shorter allele. In all examined disorders, the highest frequency of the repeat size in the *wild-type* range had alleles with 2, 5, and 8 repeats.

The obtained results emphasize the significance of genetic testing in patients with ALS, FTD, ALS/FTD, and patients with atypical dementia in Serbia.

Key words: GGGGCC, *C9orf72*, expansion, amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, ALS/FTD, atypical dementia, correlation

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

UDC number:

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 Gen <i>C9orf72</i> | 1 |
| 1.1.1 Struktura i pozicija gena <i>C9orf72</i> | 1 |
| 1.1.2 Funkcija proteina <i>C9orf72</i> | 2 |
| 1.1.3 Kliničko-genetički značaj GGGGCC ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> | 3 |
| 1.1.4 Penetrantnost i ekspresivnost GGGGCC ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> | 5 |
| 1.1.5 Epidemiologija GGGGCC ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> | 6 |
| 1.1.6 Mehanizmi patogeneze GGGGCC ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> | 7 |
| 1.1.7 Genetički i epigenetički modifikatori GGGGCC ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> | 9 |
| 1.2 Bolesti sa predominantno motornim poremećajima | 10 |
| 1.2.1 Amiotrofična lateralna skleroza..... | 10 |
| 1.2.2 Bolest slična Huntingtonovoj bolesti | 11 |
| 1.2.3 Multipla sistemska atrofija | 12 |
| 1.2.4 Progresivna supranuklearna paraliza | 13 |
| 1.3 Bolesti sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima..... | 13 |
| 1.3.1 Blagi kognitivni poremećaj | 13 |
| 1.3.2 Frontotemporalna demencija | 14 |
| 1.3.3 Alchajmerova bolest..... | 15 |
| 1.3.4 Atipična demencija..... | 16 |
| 2. CILJEVI RADA | 17 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 18 |
| 3.1 Ispitanici | 18 |
| 3.1.1 Bolesnici i članovi porodice | 18 |
| 3.1.2 Kontrolna grupa..... | 19 |
| 3.2 Metode molekularno genetičke analize | 20 |
| 3.2.1 Izolacija i određivanje koncentracije izolovane genomske DNK..... | 20 |
| 3.2.1.1 Protokol za izolaciju genomske DNK iz krvi upotrebom seta <i>PureLink™ Genomic DNA Mini Kit</i> <i>INVITROGEN</i> | 21 |
| 3.2.1.2 Protokol za izolaciju genomske DNK iz krvi metodom isoljavanja..... | 21 |
| 3.2.1.3 Određivanje koncentracije izolovane DNK pomoću seta <i>Qubit™ dsDNA BR Assay Kits</i> | 22 |
| 3.2.2 Lančana reakcija polimerizacije – PCR..... | 22 |
| 3.2.2.1 Fluorescentni PCR..... | 22 |
| 3.2.2.2 Repeat-primed PCR..... | 24 |
| 3.2.2.3 Small-pool PCR..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3 Kapilarna elektroforeza | 29 |
| 3.2.3.1 Fragmentna analiza..... | 30 |
| 3.2.4 Digestija genomske DNK restrikcijom..... | 31 |
| 3.2.5 <i>Southern blot</i> hibridizacija za detekciju produkata SP-PCR-a | 31 |
| 3.2.5.1 Agarozna gel elektroforeza..... | 32 |
| 3.2.5.2 Prebacivanje PCR produkata sa agaroznog gela na membranu (reverzni kapilarni transfer)..... | 32 |
| 3.2.5.3 Hibridizacija | 33 |
| 3.2.5.4 Hemiluminiscentna detekcija | 33 |
| 3.2.5.5 Određivanje veličine <i>C9orf72</i> alela detektovanih <i>Southern blot</i> metodom..... | 34 |
| 3.2.6 3' obeležavanje DNK standarda za veličinu sa digoksinom..... | 34 |
| 3.2.7 3' obeležavanje (CCCGG) ₄ probe sa digoksinom..... | 35 |
| 3.2.8 Alkalno stripovanje probe sa najlonske membrane | 35 |
| 3.2.9 Statistička analiza rezultata | 35 |
| 4. REZULTATI..... | 37 |
| 4.1 Bolesti sa predominantno motornim poremećajima..... | 37 |
| 4.1.1 Amiotrofična lateralna skleroza..... | 37 |
| 4.1.1.1 Kliničko-demografske karakteristike ALS bolesnika..... | 37 |
| 4.1.1.2 Kliničke karakteristike bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama i intermedijernim brojem GGGGCC ponovaka u genu <i>C9orf72</i> | 40 |
| 4.1.2 Bolest slična Huntingtonovoj bolesti..... | 46 |
| 4.1.2.1 Klinička slika bolesnika sa intermedijernim brojem ponovaka u genu <i>C9orf72</i> | 47 |
| 4.1.3 Multipla sistemska atrofija | 48 |
| 4.1.4 Progresivna supranuklearna paraliza | 49 |
| 4.1.4.1 Klinička slika bolesnika sa intermedijernim brojem GGGGCC ponovaka u genu <i>C9orf72</i> | 50 |
| 4.2 Bolesti sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima..... | 51 |
| 4.2.1 Blagi kognitivni poremećaj | 51 |
| 4.2.2 Frontotemporalna demencija..... | 53 |
| 4.2.2.1 Kliničko-demografske karakteristike FTD bolesnika..... | 53 |
| 4.2.2.2 Kliničke karakteristike bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama i intermedijernim brojem ponovaka u genu <i>C9orf72</i> | 55 |
| 4.2.3 Alchajmerova bolest..... | 58 |
| 4.2.3.1 Klinička slika bolesnika sa intermedijernim brojem ponovaka..... | 59 |
| 4.2.4 Atipična demencija..... | 60 |
| 4.2.4.1 Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa atipičnom demencijom | 60 |
| 4.2.4.2 Klinička slika bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama u genu <i>C9orf72</i> | 61 |
| 4.3 Preklapajući fenotip ALS/FTD i FTD/ALS | 62 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.1 Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa preklapajućim fenotipom..... | 62 |
| 4.4 Kontrole..... | 65 |
| 5. DISKUSIJA..... | 66 |
| 5.1 Bolesti sa predominantno motornim poremećajima..... | 66 |
| 5.1.1 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom..... | 66 |
| 5.1.2 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa bolesti sličnoj Hantingtonovoj bolesti i atipičnim parkinsonizmima (multipla sistemska atrofija i progresivna supranuklearna paraliza) | 69 |
| 5.1.3 Kliničko-genetičke korelacije veličine GGGGCC ponovaka u bolestima sa predominantno motornim poremećajima | 71 |
| 5.2 Bolesti sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima..... | 72 |
| 5.2.1 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa frontotemporalnom demencijom..... | 72 |
| 5.2.2 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa atipičnom demencijom..... | 74 |
| 5.2.3 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa blagim kognitivnim poremećajem i Alchajmerovom bolesti | 75 |
| 5.2.4 Kliničko-genetičke korelacije veličine GGGGCC ponovaka u bolestima sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima | 76 |
| 5.3 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa preklapajućim fenotipom ALS/FTD i FTD/ALS..... | 77 |
| 5.3.1 Kliničko-genetičke korelacije veličine GGGGCC ponovaka kod bolesnika sa preklapajućim fenotipom ALS/FTD i FTD/ALS | 78 |
| 5.4. Intermedijerni GGGGCC ponovci u bolestima sa predominantno motornim i predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima | 78 |
| 5.5 Preporuke za genetičko testiranje na prisustvo GGGGCC ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> | 80 |
| 6. ZAKLJUČCI | 81 |
| 7. LITERATURA | 83 |
| 8. PRILOZI..... | 114 |
| 8.1 Prilog 1-Dozvola Etičkog odbora Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije | 114 |
| 8.2 Prilog 2-Prikazi somatske nestabilnosti ekspanzije u genu <i>C9orf72</i> dobijene Southern blot metodom . | 115 |

1. UVOD

Neurodegenerativne bolesti obuhvataju oboljenja nervnog sistema kod kojih dolazi do oštećenja i gubitka nervnih ćelija usled brojnih etioloških faktora. Iako su za mnoga neurodegenerativna oboljenja poznati genetički uzroci i postoji direktna uzročna veza između genotipa i fenotipa, većina njih je još uvek nedovoljno razjašnjena, a u njihovom nastanku pored genetičkih uzroka učestvuju i brojni faktori spoljašnje sredine. Imajući to u vidu, genetička osnova neurodegenerativnih bolesti predstavlja kompleksno polje istraživanja zbog čestog preklapanja kliničke slike između različitih oboljenja, što otežava postavljanje precizne dijagnoze.

Jedan od takvih primera predstavljaju amiotrofična lateralna skleroza (ALS) i frontotemporalna demencija (FTD), dva oboljenja kod kojih može doći do preklapanja (ALS/FTD) kliničkih i neuropatoloških karakteristika (Lillo and Hodges, 2009), a čiju molekularnu osnovu je povezao gen *C9orf72*.

1.1 Gen *C9orf72*

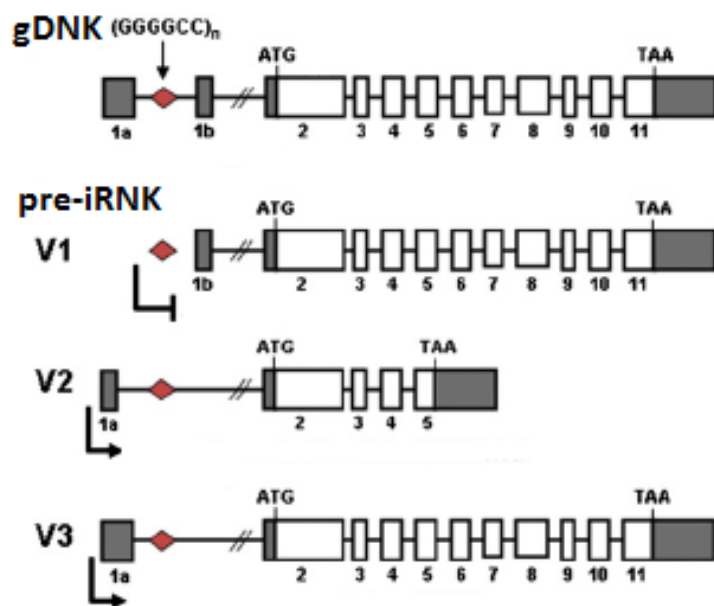
1.1.1 Struktura i pozicija gena *C9orf72*

O kliničkoj povezanosti ALS-a i FTD-a zna se godinama unazad (Hudson, 1981, Cavalleri and De Renzi, 1994, Lomen-Hoerth et al., 2002), a sa razvojem tehnologija molekularne genetike dobijaju se i podaci o njihovoj genetičkoj povezanosti.

Od izuzetnog značaja bilo je istraživanje koje je obuhvatilo članove 15 porodica obolelih od ALS-a, FTD-a kao i sa ALS/FTD preklapajućim fenotipom praćenih više generacija, kada je analiza vezanosti (eng. *linkage analysis*) mapiran lokus na kratkom kraku hromozoma 9 (9p) povezan sa ovim oboljenjima (Vance et al., 2006, Morita et al., 2006, Valdmanis et al., 2007, Luty et al., 2008, Le Ber et al., 2009, Boxer et al., 2011). Dalja istraživanja u studijama asocijacije u čitavom genomu (eng. *genome-wide association studies*, GWAS) kod ALS (van Es et al., 2009b, Shatunov et al., 2010, Laaksovirta et al., 2010), kao i FTD bolesnika (Van Deerlin et al., 2010), učvrstila su saznanja o povezanosti ovih oboljenja sa lokusom na hromozomu 9, što je potom dovelo do identifikacije haplotipa rizika na poziciji 9p21 sa učestalošću od 47,3% među familijarnim oblicima ALS-a u populaciji Finske (Laaksovirta et al., 2010). Ovom studijom iz 2010. godine napravljen je korak bliže ka identifikaciji zajedničkog genetičkog uzroka ALS-a i FTD-a. Kasnije, meta analiza GWAS studija pokazuje da haplotip rizika na hromozomu 9p21 postoji u osnovi ALS-a i FTD-a u nekoliko različitih populacija i prisutan je kod nekoliko porodica prethodno vezanih za isti region, sugerišući postojanje efekta osnivača (Mok et al., 2012a).

Mutacija u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* u vidu ekspanzije heksanukleotidnog niza GGGGCC identifikovana je 2011. godine od strane dva nezavisna istraživačka tima čime je i potvrđena genetička veza između ALS-a i FTD-a (Renton et al., 2011, DeJesus-Hernandez et al., 2011).

Humani gen *C9orf72* (*hromozom 9 otvoreni okvir čitanja 72* (eng. *chromosome 9 open reading frame 72*)) smešten je na kratkom kraku hromozoma 9 na poziciji 21.2 (9p21.2) i kodira za *C9orf72* protein. Gen sadrži 12 egzona uključujući i dva nekodirajuća egzona 1a i 1b. Niz heksanukleotidnih ponovaka, GGGGCC, smešten je upravo između ovih nekodirajućih egzona. Korišćenjem različitih promotora i alternativnom obradom nastaju tri varijante informacione RNK (iRNK) pri čemu se nekodirajući egzoni 1a i 1b različito ugrađuju u zrelu iRNK i GGGGCC niz može biti smešten ili u promotorskom regionu (transkriptna varijanta V1) ili u intronu 1 (transkriptne varijante V2 i V3) (Slika 1) (Renton et al., 2011, DeJesus-Hernandez et al., 2011).



Slika 1. Šematski prikaz strukture gena *C9orf72* i transkripata nastalih alternativnom transkripcijom i obradom. Pravougaonici predstavljaju kodirajuće egzone (bez boje) i nekodirajuće egzone (sivo obojeni). Crtice između bezbojnih pravougaonika označavaju granicu između dva egzona. Označene su pozicije start kodona (ATG) kao i stop kodona (TAA). Pozicija heksanukleotidnog niza (GGGGCC)_n u genomske DNK (gDNK) kao i u transkripcionim varijantama označena je crvenom bojom. Prilagođeno prema DeJesus-Hernandez et al., 2011.

1.1.2 Funkcija proteina *C9orf72*

Transkripcijske varijante V1 i V3 kodiraju dužu formu *C9orf72* proteina sastavljenu od 481 aminokiseline, dok varijanta V2 kodira protein od 222 aminokiseline (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Ove transkripcijske varijante su eksprimirane u različitim regionima mozga, jetri, bubrezima, plućima, srcu, testisima kao i u limfocitima (DeJesus-Hernandez et al., 2011), a visok nivo ekspresije ovog proteina zapažen je u cerebelumu (Renton et al., 2011). U neuronima neuroanatomskih regiona koji su zahvaćeni kod ALS i FTD bolesnika, *C9orf72* protein ima predominantno citoplazmatsku i lokalizaciju u regionu sinapse (DeJesus-Hernandez et al., 2011), dok je u kontrolnim humanim ćelijskim linijama fibroblasta i ćelijskim linijama motornog neurona miša (NSC-34) ovaj protein predominantno smešten u jedru (Renton et al., 2011). *C9orf72* ima različitu lokalizaciju u ćelijama ALS bolesnika pri čemu je duža izoforma difuzno raspoređena u citoplazmi neurona i pokazuje strukture slične pegama u cerebelarnim Purkinjeovim ćelijama, dok je kraća izoforma kod zdravih neurona prisutna u jedrnoj membrani, a kod obolelih dolazi do promene lokalizacije u plazma membranu (Xiao et al., 2015).

C9orf72 protein pokazuje visoku homologiju sa familijom proteina koji sadrže DENN domen (Diferencijalno eksprimiran u normalnim i neoplastičnim ćelijama (eng. *Differentially expressed in normal and neoplastic cells*)) (Levine et al., 2013, Zhang et al., 2012) pa je za njega predložen naziv DENNL72 (eng. *DENN like 72*) (Levine et al., 2013). Jedna od karakteristika ovog proteina je i evolutivna očuvanost, a o njegovom ranom pojavljivanju u evoluciji eukariota govori prisustvo i kod poslednjeg zajedničkog pretka eukariota (Zhang et al., 2012, Levine et al., 2013). Kod većine eukariota prisutna je samo jedna kopija gena po haploidnom setu, izuzetak su *Entamoeba* i *Trichomonas* koji poseduju više podfamilija, dok je *C9orf72* odsutan je kod insekata, biljaka i većine gljiva (izuzev *Rhizopus*) (Zhang et al., 2012, Levine et al., 2013).

Bioinformatička istraživanja Zhang i saradnika 2012, i Levine i saradnika 2013, nagovestila su moguću ulogu ovog proteina u membranskom transportu. Dalja istraživanja na ćelijskim linijama neurona, primarnih kortikalnih neurona i humanih motornih neurona kičmene moždine pokazala su kolokalizaciju C9orf72 proteina sa Rab proteinima i njegovu ulogu u autofagiji i transportu kroz endosome (Farg et al., 2014). Gubitak C9orf72 kod miševa vodi nastanku izmenjenog imunog odgovora u makrofagima i mikroglijalnim ćelijama (O'Rourke et al., 2016), uvećanja slezine i limfnih čvorova (O'Rourke et al., 2016, Burberry et al., 2016, Atanasio et al., 2016) kao i razvoju autoimunog fenotipa (Atanasio et al., 2016, Burberry et al., 2016). Na kulturama primarnih embrionskih motoneurona miša pokazan je uticaj C9orf72 na dužinu aksona i veličinu konusa rasta (Sivadasan et al., 2016).

1.1.3 Kliničko-genetički značaj GGGGCC ekspanzije u genu C9orf72

Broj heksanukleotidnih ponovaka u genu C9orf72 varira od 2 do preko 4000 ponovaka (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011, Beck et al., 2013, Buchman et al., 2013, van Blitterswijk et al., 2013, Gijssels et al., 2016), a njihova patogenost zavisi od veličine ekspanzovanog niza. Iako tačna granica koja deli normalan broj ponovaka od patološkog nije jasno definisana, većina autora smatra da je preko 30 ponovaka patogeno (Renton et al., 2011, Majounie et al., 2012b, Cannas et al., 2015). Takođe, postoje različiti stavovi o veličini intermedijernih ponovaka: 20-30 ponovaka (Majounie et al., 2012b, Nuytemans et al., 2013), 7-24 (van der Zee et al., 2013), 12-21 (Benussi et al., 2014), 20-29 (Xi et al., 2012, Cannas et al., 2015), 7-30 (Pamphlett et al., 2012), 9-30 ponovaka (Serpente et al., 2021), 7-45 i 20-45 (Kaivola et al., 2019). Neki autori smatraju da se aleli koji nose manje od 20 ponovaka smatraju normalnim alelima odnosno „wild type“ (Renton et al., 2011, Majounie et al., 2012b, Cannas et al., 2015).

Veličina intermedijernih alela može se menjati kroz generacije uglavnom putem paternalne transmisije, što je pokazano na kontrolnim uzorcima u studiji iz 2013. godine. Sve tri međugeneracijske promene intermedijernog alela u navedenoj studiji bile su vezane za haplotip rs3849942A sugerišući manju stabilnost ponovaka na ovom haplotipu (Beck et al., 2013). Uloga intermedijernih ponovaka u ALS-u i drugim neurodegenerativnim bolestima nije dovoljno poznata. U literaturi, podaci pokazuju da intermedijerni ponovci mogu predstavljati rizik za neuropsihijatrijske simptome, ali nisu direktno povezani sa različitim neurodegenerativnim oboljenjima uključujući ALS (Ng and Tan, 2017). Sa druge strane, neke studije i meta analize govore u prilog tome da intermedijerni aleli mogu biti uzročnici bolesti kod ALS-a (Byrne et al., 2014, Iacoangeli et al., 2019). Ne postoji mnogo podataka o ulozi intermedijernih ponovaka kod Parkinsonovoj bolesti-sličnih oboljenja, ali interesantan je nalaz kod slučajeva autopsijom potvrđene kortikobazalne degeneracije koji ukazuje da ekspanzije ponovaka intermedijarne dužine (gde je primenjena minimalna granica od 17 ponovaka) mogu biti faktor rizika za kortikobazalnu degeneraciju (Cali et al., 2019). Dobijeni podaci iz tog istraživanja baziranog na ćelijskim modelima sa intermedijernim ponovcima, pokazali su da su putevi genske ekspresije povezani sa transportom vezikula i autofagijom izloženi brojnim promenama (Cali et al., 2019). U okviru oboljenja multipla sistemska atrofija (MSA), aleli intermedijerne veličine su prijavljeni u jednoj studiji u kineskoj populaciji kod jednog bolesnika (20 GGGGCC ponovaka) (Chen et al., 2016a), kao i u italijanskoj studiji gde je 4% MSA bolesnika bilo nosilac veličine alela 20-30 ponovaka (Bonapace et al., 2022). Prisustvo intermedijernih alela smanjuje aktivnost promotora gena C9orf72 (ukoliko se intermedijernim alelima smatraju veličine 7-24 ponovka), pri čemu je smanjena aktivnost od 52% prisutna kod alela sa 24 ponovka u odnosu na alel sa 2 ponovka (van der Zee et al., 2013). Takođe, smanjena aktivnost promotora gena C9orf72 registrovana je i na ćelijskim linijama humanih bubrega (HEK293T) gde je pokazan postepeni pad aktivnosti promotora do 57% za varijantu gena sa 24 ponovka, što je bilo značajno niže u odnosu na varijantu gena sa 19 ponovaka (Gijssels et al., 2016). U literaturi je zabeležen interesantan slučaj sa 21 GGGGCC ponovkom kod bolesnice sa dugom istorijom psihijatrijskih tegoba i kasnijom pojavom progresivnog cerebelarnog sindroma, piramidnih i ekstrapiramidalnih znakova, kognitivnim

tegobama u vidu BKP kao i poremećajem spavanja poznatom kao “*rapid eye movement sleep behaviour disorder*” (Meloni et al., 2017).

O patološkim heksanukleotidnim *C9orf72* ponovcima postoji mnogo podataka u literaturi. Jednu od karakteristika ovih heksanukleotidnih ekspanzija čini somatska nestabilnost (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Beck et al., 2013) što znači prisustvo različitog broja ponovaka u različitim ćelijama jednog organizma. Znatna varijacija u broju ponovaka detektovana je u cerebelumu, frontalnom korteksu i ćelijama krvi, pri čemu je manji broj ponovaka registrovan u cerebelumu u odnosu na frontalni korteks i krv (van Blitterswijk et al., 2013). Pored varijacije ponovaka među različitim tkivima jedne osobe (Dols-Icardo et al., 2014, Fratta et al., 2015), zapažene su i varijacije među članovima porodice kao i kod monozogotnih blizanaca (Dols-Icardo et al., 2014). Istraživanje koje je obuhvatilo nervna i druga tkiva kod ALS i FTD bolesnika sa registrovanom ekspanzijom GGGGCC ponovaka u ćelijama krvi, pokazalo je da postoji varijacija u broju ponovaka između različitih tkiva posmatranih kod svakog bolesnika (intra-individualna varijacija), dok je varijacija broja ponovaka u okviru svake grupe tkiva bila manja (inter-individualna varijacija) sugerišući o postojanju mogućeg uticaja određenih karakteristika tkiva na nestabilnost ponovaka, te veličinu ekspanzije (Nordin et al., 2015). Zanimljivo je da kod kod ponovaka iz opsega 20-27 nije uočena navedena karakteristika somatske nestabilnosti (Fratta et al., 2015).

Neka od istraživanja pokazuju da broj ekspanzovanih ponovaka može da koreliše sa određenim kliničkim parametrima kao što su vreme početka bolesti i dužina preživljavanja. Broj ponovaka u frontalnom korteksu FTD bolesnika pozitivno koreliše sa godinama početka bolesti sa sličnim rezultatima za godine bolesnika u trenutku uzorkovanja krvi (van Blitterswijk et al., 2013). Međutim, kada je posmatrana čitava kohorta sastavljena od FTD, BMN (bolest motornog neurona) i BMN/FTD bolesnika ova korelacija nije uočena. U istom istraživanju manji broj ponovaka u cerebelumu doprinosa je dužem preživljavanju kod FTD bolesnika kao i u celokupnoj kohorti. Takođe, negativna korelacija veličine ponovaka u krvi i trajanja bolesti, odnosno preživljavanja primećena je kod FTD bolesnika (Suh et al., 2015).

Kod ALS bolesnika manji broj ponovaka u cerebelumu i parijetalnom režnju u korelaciji je sa ranijim početkom bolesti, a veći broj ponovaka u parijetalnom režnju korelisao je sa bržom progresijom oboljenja (Nordin et al., 2015). U ćelijama krvi takođe postoji pozitivna korelacija između godina početka bolesti bolesnika i veličine ekspanzovanih ponovaka, kao i godina života bolesnika u trenutku uzorkovanja i veličine ekspanzovanih ponovaka (Cammack et al., 2019), ali veličina niza ne koreliše značajno sa preživljavanjem (Suh et al., 2015).

Sa druge strane, postoje podaci o inverznoj korelaciji godina početka bolesti i veličine ekspanzija, kada se veličina ekspanzija grupišu na kratke ekspanzije koje imaju 45-80 ponovaka i duže ekspanzije, sa preko 80 ponovaka, što se povezuje sa različitim metilacionim statusom ove dve grupe ekspanzija (Gijssels et al., 2016). O uticaju metilacije na GGGGCC ponovke biće više rečeno u Poglavlju 1.1.7.

Kako se radi o oboljenjima koja nastaju usled uvećanja broja ponovaka, među članovima porodica nosilaca ove ekspanzije posmatran je i fenomen anticipacije. Inicijalna istraživanja koja su dovela do otkrića ekspanzije ovih ponovaka nisu detektovala prisustvo anticipacije među analiziranim porodicama (Renton et al., 2011, DeJesus-Hernandez et al., 2011), mada je ponegde primećeno prisustvo ranijeg početka bolesti kod mlađih generacija (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Tendencija ranijeg početka bolesti kod potomaka u svakoj sledećoj generaciji primećena je u studiji koja je obuhvatila članove 16 porodica (Hsiung et al., 2012). Istraživanje sprovedeno na većem uzorku analiziranih, 36 porodica iz Belgije, u okviru koga su praćene 4 generacije članova, takođe je pokazalo trend smanjenja godina početka bolesti kod mlađih generacija (Van Mossevelde et al., 2017b).

Takođe, u literaturi je zabeležen slučaj sa 56 ponovaka u ćelijama krvi koliko je nosio bolestan roditelj, do preko 1100 ponovaka koji su detektovani kod asimptomatskog potomka. U frontalnom i temporalnom korteksu kao i cerebelumu ovog roditelja zabeleženo je prisustvo većih ekspanzija (Gijssels et al., 2016). Nasuprot tome, registrovan je asimptomatski nosilac ekspanzije starosti 89 godina sa veličinom *C9orf72* alela sa 70 ponovaka, dok je kod njegovih četvero od

petoro potomaka zabeležena ekspanzija najčešće veličine oko 650 i oko 1750 ponovaka u ćelijama krvi. Kod 2 potomka postavljena je dijagnoza ALS-a, dok su preostala 2 potomka bila bez simptoma (Xi et al., 2015a). U kasnijoj studiji je utvrđeno da je asimptomatski nosilac od 70 ponovaka bio mozaični nosilac male i velike ekspanzije uz prisustvo različitog stepena somatske nestabilnosti u analiziranim nervnim i drugim tkivima (McGoldrick et al., 2018). Pored uvećanja broja ponovaka kod potomaka zabeleženi su i slučajevi gotovo iste veličine ponovaka u ispitivanom paru roditelj-dete (Fournier et al., 2019).

Nasuprot uvećanju broja ponovaka prilikom prenošenja u naredne generacije može doći i do smanjenja broja ponovaka odnosno njihove kontrakcije (Dols-Icardo et al., 2014, Gijssels et al., 2016, Jackson et al., 2020, Fournier et al., 2019). Najveći broj kontrakcija ponovaka (90%) dešavao se preko paternalne transmisije, odnosno usled kontrakcije ponovaka u muškim polnim ćelijama (Jackson et al., 2020).

1.1.4 Penetrantnost i ekspresivnost GGGGCC ekspanzije u genu *C9orf72*

Studija iz 2012. godine ukazuje da heksanukleotidne ekspanzije u genu *C9orf72* nisu penetrantne tj. ne ispoljavaju se u fenotipu ispod 35 godina života, sa 58 godina penetrantnost iznosi 50%, dok su skoro potpuno penetrantne sa 80 godina života nosioca (Majounie et al., 2012b). Istraživanje na većoj kohorti bolesnika, pored nepotpune penetrantnosti i vezanosti za godine, pokazuje i da familijarni i sporadični slučajevi GGGGCC ekspanzija imaju skoro identičnu penetrantnost, dok je poređenjem slučajeva koji imaju samo ALS ili samo FTD penetrantnost bila blago uvećana kod ALS nego kod FTD bolesnika (Murphy et al., 2017).

Ispitivanjem uticaja pola isti autori iznose da je kod ženskog pola početak bolesti kasniji u odnosu na muškarce, pogotovo kod žena koje imaju bulbarni početak ALS-a, dok za spinalni početak ALS-a ta razlika među polovima nije uočena. Sveukupno posmatrano, u okviru ALS-a, spinalni početak bolesti ima veću penetrantnost u odnosu na bulbarni početak (Murphy et al., 2017).

Ekspanzije GGGGCC mogu dovesti do ALS, FTD ili preklapajućeg ALS/FTD fenotipa (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011, Marogianni et al., 2019), a njihovo prisustvo je detektovano i u drugim neurodegenerativnim bolestima (Beck et al., 2013, Marogianni et al., 2019). *C9orf72* ekspanzije registrovane su i kod bolesnika kod kojih je postavljena klinička dijagnoza Alchajmerove bolesti (AB) (Cacace et al., 2013, Beck et al., 2013, Wojtas et al., 2012, Gomez-Tortosa et al., 2016, Mehrabian et al., 2018). U prilog kliničkoj dijagnozi AB sa prisustvom *C9orf72* ekspanzija govore i rezultati iz manjeg broja studija, u kojima je rađena autopsija kod samo nekih *C9orf72* nosilaca ekspanzije, pri čemu je neuropatološki nalaz potvrđivao kliničku dijagnozu AB (Kohli et al., 2013, Harms et al., 2013a). Sa druge strane, u studiji iz 2012. godine gde su u okviru jedne porodice registrovane 4 sestre nosioci *C9orf72* ekspanzije (od kojih su 3 imale kliničku dijagnozu verovatne AB), autopsijom kod 2 nosioca ekspanzije sa dijagnozom AB neuropatološki nalaz je ukazivao na FTD sa ubikvitin-pozitivnim, tau-negativnim inkluzijama ukazujući da je inicijalna dijagnoza nosilaca ekspanzije bila amnestička forma FTD umesto AB (Majounie et al., 2012a).

U okviru jedne porodice sa ekspanzijom aficirani članovi mogu imati različito fenotipsko ispoljavanje (Renton et al., 2011, Gijssels et al., 2012). Kompleksnost fenotipskog ispoljavanja ovih ekspanzija najbolje se može videti na primerima blizanaca. U slučaju monozigotnih blizanaca ilustrativan je primer dve sestre od kojih je jedna obolela od bulbarnog oblika ALS sa 57 godina života sa kognitivnom očuvanošću, dok je druga sestra bila bez simptoma sa 62 godine života, a njihovi kognitivni testovi su pokazali blagi kognitivne abnormalnosti u verbalnim i egzekutivnim funkcijama koje bi mogli biti prvi znaci FTD. Blizakinje su bile diskordantne za ALS pet godina što se nije moglo objasniti epigenetičkim faktorima niti razlikom u broju ponovaka jer su obe sestre imale slične veličine ponovaka (Xi et al., 2014b). Sa druge strane, navodi se primer dizigotnih blizanaca koji su razvili spinalni oblik ALS u istim godinama života sa blagom razlikom u progresiji bolesti i promenom ličnosti koja se kod jednog blizanca pojavila godinama pre pojave

motornih simptoma bolesti, dok je u istom periodu neuropsihološkog testiranja egzekutivna disfunkcija bila prisutna kod oba blizanca (Conforti et al., 2018).

U okviru FTD fenotipa nosioci GGGGCC ekspanzije najčešće ispoljavaju bihevioralnu varijantu FTD (bvFTD) (Dobson-Stone et al., 2012, Simon-Sanchez et al., 2012, Boeve et al., 2012, Van Langenhove et al., 2013, Devenney et al., 2014), mada su nosioci ekspanzije registrovani i kod bolesnika sa semantičkom demencijom i primarnom nefluentnom progresivnom afazijom (Majounie et al., 2012b).

Kod nešto manje od polovine bolesnika sa GGGGCC ekspanzijom prisutni su simptomi iz spektra motornih poremećaja koji obuhvataju tremor, parkinsonizam, mioklonus, distoniju, horeu kao i ataksiju (Estevez-Fraga et al., 2021). Od posebnog interesa za istraživanje potencijalne uloge ekspanzije GGGGCC ponovaka su ova oboljenja koja se prezentuju kliničkom slikom parkinsonizma usled observacije da je upravo prevalencija parkinsonizma povećana kod nosilaca GGGGCC ekspanzije (Boeve et al., 2012, Simon-Sanchez et al., 2012). Pored parkinsonizma mogu se javiti i znaci apraksije kao i vizuelne i auditorne halucinacije (Simon-Sanchez et al., 2012). Klinička slika parkinsonizma u vidu akinetičkog rigidnog sindroma javlja se u prve dve godine pojave simptoma kod FTD bolesnika sa ili bez prisustva znakova ALS (Boeve et al., 2012). Kod nosilaca ekspanzije kod kojih se javlja parkinsonizam, u 94% slučajeva najčešće je u vidu bradikinezije ili hipokinezije dok su rigidnost i tremor u miru prisutni kod 86% i 39% slučajeva (Wilke et al., 2016).

1.1.5 Epidemiologija GGGGCC ekspanzije u genu *C9orf72*

Učestalost heksanukleotidnih ekspanzija u genu *C9orf72* kod familijarnog oblika ALS-a (FALS) iznosi 16%, kod familijarnog oblika FTD-a (FFTD) 20%, sporadičnog oblika ALS-a (SALS) i sporadičnog oblika FTD-a 6-8% i kod ALS/FTD preklapajućeg fenotipa, čak skoro 30% (Marogianni et al., 2019). Analizom podgrupa belaćkih i azijskih populacija u istom istraživanju dobijena je prevalencija mutacija kod belaca koja je za FALS iznosila 32% (CI:28%-376%), SALS 5% (CI:4%-6%) dok je za azijske populacije prevalencija mutacija za FALS bila 4% (CI:2%-8%) i SALS 1% (CI:0%-1%). Visoka učestalost mutacija, od 46,4% kod FALS, 21,1% SALS i 29,3% FTD (od kojih je 36,4% FTD bolesnika imalo pozitivnu porodičnu anamnezu za ALS), zabeležena je u populaciji Finske (Renton et al., 2011). U zapadnoj Evropi ukupna učestalost mutacija kod pacijenata sa frontotemporalnom lobarnom degeneracijom (eng. *frontotemporal lobar degeneration*, FTLD) iznosila je 9,98% (18,52% kod familijarnih i 6,26% kod sporadnih oblika) sa izuzetkom Finske, Švedske i Španije sa pojedinačnom učestalošću od 29,33%, 20,73% i 25,49% redom, dok je u Nemačkoj prevalencija bila 4,82% (van der Zee et al., 2013). Meta analiza kod evropskih populacija je pokazala da 33,7% FALS i 5,1% SALS bolesnika ima ekspanziju GGGGCC ponovaka u genu *C9orf72* (Zou et al., 2017).

Pored ALS-a i FTD-a prisustvo heksanukleotidnih ekspanzija registrovano je i kod drugih neurodegenerativnih bolesti sa različitim učestalošću. Prema podacima iz literature ukupna učestalost ovih ekspanzija kod bolesnika sa AB iznosi 0,49%, Parkinsonovom bolesti (PB) 0,13%, dok kod bolesnika sa bolešću sličnoj Hantingtonovoj bolesti učestalost iznosi 1,6% (Marogianni et al., 2019). U studiji koja je obuhvatila asimptomatske ili simptomatske članove u porodicama kod kojih postoji prisustvo mutacija u nekom od tri ispitivana gena (*GRN* (eng. *granulin precursor*), *MAPT* (eng. *Microtubule Associated Protein Tau*), *C9orf72*), kod 18,2% simptomatskih nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* registrovan je blagi kognitivni poremećaj (BKP) (Ramos et al., 2020). Takođe, ekspanzije heksanukleotidnih ponovaka detektovane su kod bolesnika sa mogućom multiplom sistemskom atrofijom (Goldman et al., 2014), MSA (Bonapace et al., 2022) i olivopontocerebelarnom degeneracijom, oblikom multiple sistemske atrofije, (Lindquist et al., 2013), sa progresivnom supranuklearnom paralizom (PSP) (Lesage et al., 2013, Origone et al., 2013, Le Ber et al., 2013, Wilke et al., 2016), kortikobazalnim sindromom (Lindquist et al., 2013, Schottlaender et al., 2015) kao i u nekoliko drugih neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (Beck et al., 2013, Bourinaris and Houlden, 2018, Marogianni et al., 2019). Dodatni slučajevi u kojima je

ekspanzija GGGGCC ponovaka registrovana, a povezani su sa progresivnom supranuklearnom paralizom, obuhvataju ALS-plus sindrom (npr. ALS-PSP sindrom) (Ticozzi et al., 2014). Napominjemo da pojam atipični parkinsonizam obuhvata nekoliko oboljenja: MSA, PSP, kortikobazalnu degeneraciju i demenciju sa Levijevim telima, a odnosi se na bolesnike čija se klinička slika prezentuje parkinsonizmom ali takođe imaju i atipične karakteristike kao što su rana demencija, učestali padovi, okulomotorni problemi, znaci disautonomije ili ataksije (McFarland, 2016). Učestalost ekspanzija u genu *C9orf72* kod bolesti slične Huntingtonovoj bolesti je različita kao i broj bolesnika koji je analiziran, i prema podacima iz poslednje meta analize iznosi 1% (Alva-Diaz et al., 2020).

1.1.6 Mehanizmi patogeneze GGGGCC ekspanzije u genu *C9orf72*

Zajedničku patološku karakteristiku kod ALS-a i FTLD-a predstavlja prisustvo agregata TAR DNK vezujućeg proteina (eng. *TAR DNA binding protein*, TDP-43) (Arai et al., 2006, Neumann et al., 2006) što klasifikuje ova dva oboljenja kao TDP-43 proteinopatije (Arai et al., 2006). Otkrićem heksanukleotidnih ekspanzija u genu *C9orf72* rešena je zajednička genetička osnova ALS-a i FTD-a kao i preklapajućeg ALS/FTD fenotipa, ali su se otvorila nova pitanja o načinu na koji ove ekspanzije dovode do neurodegeneracije. Molekularni mehanizam delovanja ovih ekspanzija još uvek nije do kraja razjašnjen. Stoga, predloženi mehanizmi uključuju gubitak funkcije kroz haploinsuficijenciju (DeJesus-Hernandez et al., 2011), dobijanje nove funkcije RNK (eng. *RNA gain of function*) kroz sekvestraciju RNK vezujućih proteina i toksičnost posredovanu dipeptidnim ponovcima (Ash et al., 2013, Mizielinska et al., 2013).

Haploinsuficijencija

Kod nosilaca ekspanzije postoji redukcija ekspresije varijante V1 u frontalnom korteksu, u ćelijskim linijama limfoblasta za oko 50% kao i varijante V1 i V3 (Slika 1) u ćelijskim linijama limfoblasta za 34% i u frontalnom korteksu za 38% (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Smanjena ekspresija pojedinih transkripcionih varijanti prisutna je u frontalnom korteksu nosilaca velikih ekspanzija, posebno varijante koje u sebi sadrži egzon 1b i kodira za dužu izoformu proteina čija je značajno smanjena ekspresija detektovana i u cerebelumu, dok u hipokampusu i kičmenoj moždini postoji trend smanjenja ekspresije (Waite et al., 2014). Proteinska izoforma od 481 aminokiseline predstavlja predominantnu izoformu proteina u centralnom nervnom sistemu čoveka i miševa i njeno smanjenje od 20% detektovano je u tkivu cerebeluma ALS, FTD i ALS/FTD bolesnika nosilaca ekspanzije (Frick et al., 2018). Takođe, smanjen nivo *C9orf72* proteina kod nosilaca ekspanzije postoji i u frontalnom korteksu (Waite et al., 2014). Ekspresija ortologa *C9orf72* kod zebra ribice *Danio rerio* prisutna je u stadijumima razvića nervnog sistema kao i u mnogim organima kod odrasle jedinke, gde gubitak funkcije transkripata dovodi do promene ponašanja kao i smanjene pokretljivosti i aksonopatije. Na osnovu datih saznanja autori sugerišu da haploinsuficijencija dovodi do motornih poremećaja i može biti faktor patogeneze u spektru ALS/FTLD neurodegenerativnih oboljenja (Ciura et al., 2013). Delecija ortologa *C9orf72* kod valjkastog crva *Caenorhabditis elegans* dovodi do poremećaja pokretljivosti koji vode ka paralizi sa odrastanjem jedinke, što je praćeno neurodegeneracijom gabaergičkih motornih neurona (Therrien et al., 2013).

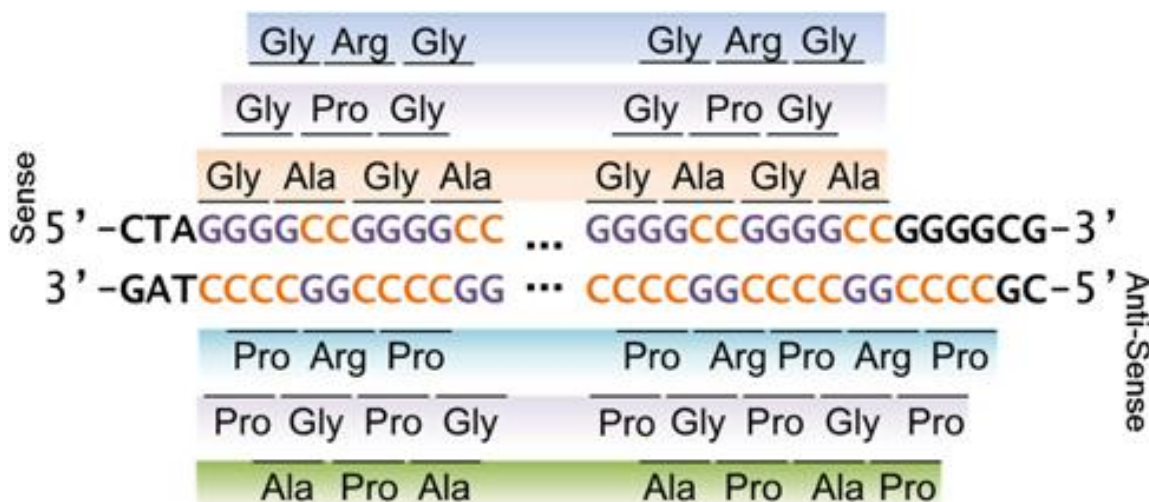
Mehanizmi vezani za nove funkcije RNK (RNA gain of function)

Kao što je već napomenuto, heksanukleotidni ponovci su sastavljeni od GC nukleotida i kao takvi na nivou RNK formiraju stabilne RNK G-kvadrupleks strukture koje su paralelno orjentisane (Fratta et al., 2012, Reddy et al., 2013) kao i strukture „ukosnice“ (*hairpin* strukture) (Reddy et al., 2013), dok na *antisense* lancu DNK formiraju i-motive (eng. *i-motifs*) (Kovanda et al., 2015). Prisustvo struktura kao što su G-kvadrupleksi dovodi do poremećaja procesa transkripcije i

nakupljanja abortivnih transkripata koji sekvstriraju RNK vezujuće proteine (Haeusler et al., 2014).

Kod bolesnika koji su nosioci GGGGCC ekspanzije u jedru ćelija frontalnog korteksa i kičmene moždine detektovano je prisustvo ribonukleinskih fokusa (eng. *RNA foci*) (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Ekspanzovani heksanukleotidni ponovci u genu *C9orf72* bidirekciono se transkribuju pa nastaju *sense* i *antisense* prepisi (Mori et al., 2013b). *Sense* ribonukleinski fokusi mogu se naći u astrocitima, mikroglialnim ćelijama i oligodendrocitima dok se *antisense* ribonukleinski fokusi, pored navedenih grupa ćelija, mogu još naći i u frontalnom korteksu, hipokampusu i cerebelumu (Mizielinska et al., 2013). Prisustvo ribonukleinskih fokusa u velikom procentu zapaženo je u Purkinjeovim ćelijama cerebeluma (DeJesus-Hernandez et al., 2017). U leukocitima periferne krvi prisutni su *sense* i *antisense* ribonukleinski fokusi sa jasnom razlikom u akumulaciji kod *antisense* fokusa gde veliki broj ćelija ima više od pet jedarnih fokusa, dok je u ćelijama koje sadrže *sense* fokuse prisutan jedan fokus po ćeliji (Zu et al., 2013).

Nakon pomenute bidirekciono transkripcije heksanukleotidnih ponovaka, procesom RAN (eng. *Repeat-associated non-AUG*) translacije u sva tri okvira čitanja nastaju agregati proteina sa dipeptidnim ponovcima: glicin-alanin (poli-GA), glicin-prolin (poli-GP), glicin-arginin (poli-GR), prolin-alanin (poli-PA), prolin-arginin (poli-PR) i prolin-glicin (poli-PG) (Ash et al., 2013, Mori et al., 2013b, Mori et al., 2013a, Gendron et al., 2013, Mann et al., 2013) (Slika 2).



Slika 2. Šematski prikaz mogućih proteina nastalih RAN translacijom ekspanzovanih GGGGCC i CCCCGG ponovaka u svim mogućim okvirima čitanja. Preuzeto iz Gendron et al. 2013.

Kod FTD i FTD/BMN nosilaca ekspanzije, proteini sa dipeptidnim ponovcima su najčešći u cerebralnom neokorteksu, hipokampusu i cerebelumu, retki ili uglavnom odsutni u srednjem mozgu, moždanom stablu, produženoj moždini i kičmenoj moždini, sa sličnom distribucijom kod BMN (Davidson et al., 2014). Proteini sa dipeptidnim ponovcima prisutni su u p62+ inkluzionim telima unutar neurona (Mann et al., 2013, Mori et al., 2013b). U moždanom tkivu nosilaca ekspanzije posebno je zapaženo povećano prisustvo poli(GA) neuronskih citoplazmatskih inkluzija (Mori et al., 2013b, Mackenzie et al., 2015). Poli(GA) proteini formiraju filamentozne strukture u mozgu kod nosilaca ekspanzije (C9ALS/FTD) i posmatranjem živih ćelija pod mikroskopom uočeno je da imaju sposobnost brzog prelaska iz difuzne distribucije u male agregate, dok u kulturama primarnih neurona ekspresija poli(GA) inhibira aktivnost proteazoma i dovodi do stresa endoplazmatskog retikuluma (Zhang et al., 2014). Kod miševa ekspresija poli(GA) utiče na veličinu i težinu mozga, dovodi do smanjenja broja Purkinjeovih ćelija u cerebelumu kao i do promene ponašanja i kognitivnog deficita (Zhang et al., 2016). Poli(GR) dovode do neurodegeneracije i utiču na motorne sposobnosti i ponašanje kod miševa. Oni kolokalizuju sa ribozomalnim proteinima i faktorom inicijacije translacije u mozgu miševa i u tkivu mozga C9FTD/ALS bolesnika i utiču na funkciju ribozoma, proces translacije i formiranje granula stresa

(Zhang et al., 2018). Takođe kod miševa ekspresija poli(PR) u velikom procentu dovodi do rane smrti jedinki, dok kod preživelih sa starenjem vodi gubitku poli(PR) pozitivnih ćelija u korteksu i cerebelumu i utiče na post-translacionu modifikaciju H3 histona (Zhang et al., 2019). Povećana ekspresija poli(GA), poli(GP) i poli(GR) u ćelijskim kulturama pokazuje toksični efekat tako što utiče na ubikvitin-proteazom sistem degradacije proteina (Yamakawa et al., 2015). Na model sistemu zebra ribice ekspresija poli(PR) i poli(GR) utiče na dužinu aksona i granjanje kod motornog neurona (Swinnen et al., 2018). Toksičnost proteina sa dipeptidnim ponovcima koji sadrže arginin pokazana je i na model sistemu *Drosophila* (Mizielinska et al., 2014, Wen et al., 2014, Boeynaems et al., 2016), kao i na linijama ćelija sličnih neuronu i primarnih neurona (Gill et al., 2019).

Kod 93,3% simptomatskih i asimptomatskih nosilaca GGGGCC ekspanzije detektovan je sličan povećan nivo poli(GP) dipeptidnog proteina u cerebrospinalnoj tečnosti što ukazuje da poli (GP) može poslužiti kao potencijalni biomarker prisustva ove ekspanzije (Lehmer et al., 2017).

1.1.7 Genetički i epigenetički modifikatori GGGGCC ekspanzije u genu *C9orf72*

Jedan od gena modifikatora kliničke slike kod nosilaca GGGGCC ekspanzije je gen *TMEM106B* (eng. *Transmembrane Protein 106B*) čija varijanta rs3173615 u homozigotnom obliku (GG) kod nosilaca ekspanzije ima zaštitni efekat za razvoj posebno FTD fenotipa, dok takav efekat nije zapažen kod BMN bolesnika (van Blitterswijk et al., 2014b). U okviru druge varijante rs1990622 kod FTLD nosilaca ekspanzije, nosioci T alela pokazuju kasniji početak bolesti kao i kasnije godine smrti (Gallagher et al., 2014). Ova varijanta je jedna od varijanti za koje je pokazana asocijacija sa FTLD-TDP, a nosioci T alela u heterozigotnom obliku imaju veći nivo ekspresije ovog gena u frontalnom korteksu kod bolesnika koji imaju mutaciju u genu *GRN* (Van Deerlin et al., 2010).

Kod ALS bolesnika pokazano je da postoji veza sa intermedijarnim brojem CAG ponovaka (27-33) u genu *ATXN2* (eng. *Ataxin 2*) (Elden et al., 2010). Intermedijerni CAG ponovci ≥ 29 prisutni su i kod GGGGCC nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* kod ALS, ALS/FTD, ali ne i kod FTD bolesnika (Lattante et al., 2014), čak ni kada se spusti granica intermedijarnih CAG ponovaka na >27 (van Blitterswijk et al., 2014a). Kod BMN i BMN/FTD nosilaca ekspanzije, poređenjem sa kontrolama, uočeno je da postoji statistički značajna asocijacija sa CAG ponovcima >27 ($p=0,013$), što ukazuje da ovi ponovci u genu *ATXN2* mogu modifikovati fenotip GGGGCC nosilaca ekspanzije ka razvoju BMN (van Blitterswijk et al., 2014a). Takođe, prisustvo ekspanzije CAG ponovaka (37 CAG ponovaka), za razliku od intermedijernih CAG alela, u genu *ATXN2* kod nosilaca GGGGCC ekspanzije nije modifikovao fenotip ka ALS-u. Kod takvih bolesnika su prisutni ataksija, demencija i parkinsonizam, ali bez znakova ALS-a (Zhang et al., 2017).

Pored *ATXN2*, CAG ponovci ≥ 33 u genu *ATXN1* (eng. *Ataxin 1*) prisutni su kod 15,82% pacijenata sa ekspanzijom u genu *C9orf72* (Lattante et al., 2018), a poslednje istraživanje na modelu *Drosophila* pokazuje da istovremena ekspresija ovih poliglutaminskih ekspanzija sa GR dipeptidnim ponovcima *C9orf72* dovodi do neurodegenerativnog fenotipa (Tazelaar et al., 2020).

Varijante rs7018487 genotipa GG u genu *UBAP1* (eng. *ubiquitin-associated protein 1*), rs7403881 genotipa GG u genu *MT-le* (eng. *metallothionein 1 E*) i rs6052771 genotipa AA/AG u genu *PRNP* (eng. *prion protein*) vezuju se za raniji početak bolesti kod nosilaca GGGGCC ekspanzije (van Blitterswijk et al., 2014c). Uticaj na preživljavanje FTD, FTD/BMN i BMN bolesnika sa GGGGCC ekspanzijom uočen je za varijantu rs5848 u genu *GRN*, dok se asocijacija sa preživljavanjem FTD bolesnika vezuju za varijante rs7403881 u genu *MT-le*, rs13268953 u genu *ELP3* (eng. *elongator acetyltransferase complex subunit 3*) i E4 alel (rs429358 i rs7412) u genu *APOE* (eng. *apolipo-protein E*). Zapažena je i povezanost preživljavanja BMN bolesnika sa varijantama rs12608932 u genu *UNC13A* (eng. *unc-13 homolog A*) i rs1800435 u genu *ALAD* (eng. *delta-aminolevulinat dehidrataza*) (van Blitterswijk et al., 2014c). Ova varijanta u genu *UNC13A* kod ALS nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* češće je prisutna kod bolesnika sa bulbarnim početkom ALS (Dekker et al., 2016).

ALS nosioci ekspanzije u genu *C9orf72* kod kojih postoji i prisustvo GCG ekspanzije ponovaka u genu *NIPA1* (eng. *NIPA magnesium transporter 1*) imaju u proseku 8 godina raniji početak bolesti sa češćim ispoljavanjem spinalnog početka u odnosu na ALS *C9orf72* bolesnike bez *NIPA1* ekspanzije (Dekker et al., 2016).

Epigenetička modifikacija procesom metilacije u blizini GGGGCC ponovaka obuhvata 5' CpG ostrvca koja su kod nosilaca ekspanzije hipermetilovana (Xi et al., 2013, Xi et al., 2014a, Belzil et al., 2014, Liu et al., 2014). Korelacija između stepena metilacije i određenih kliničkih parametara kao što su životna dob na početku bolesti i na pregledu kod ALS i FTLD bolesnika nosilaca ekspanzije nije uočena (Xi et al., 2013, Xi et al., 2014a). Međutim, kod ALS bolesnika veći stepen metilacije koreliše sa kraćim trajanjem bolesti kao i sa familijarnom pojavom oboljenja (Xi et al., 2013). Kod FTD bolesnika hipermetilacija promotora u mozgu i ćelijama krvi asocirana je sa kasnijim godinama smrti. Na osnovu toga, hipermetilacija *C9orf72* povezana je sa dužim preživljavanjem i može imati zaštitni efekat (Russ et al., 2015). Kod ALS bolesnika koji imaju preko 50 ponovaka, hipermetilacija utiče na ekspresiju *C9orf72* transkripata dovodeći do smanjenja njihove ekspresije u krvi (Xi et al., 2013), dok ponovci intermedijerne veličine (22-43 ponovka) kod ALS i FTLD bolesnika nisu metilovani (Xi et al., 2013, Xi et al., 2014a). Uticaj metilacije na razvoj određenog fenotipa (ALS, FTLD, ALS/FTLD) nije pokazan, mada je detektovan nešto veći stepen hipermetilacije ($p=0,09$) kod ALS u odnosu na FTLD nosioce ekspanzije (Xi et al., 2014a). Zaštitni efekat hipermetilacije promotora kod nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* pokazuje se kroz smanjeno stvaranje RNK fokusa kao i smanjenu akumulaciju dipeptidnih GA, GP i GR proteina u tkivu cerebeluma (Liu et al., 2014). GGGGCC ponovci takođe podležu procesu metilacije kod 97% nosilaca ekspanzije >50 ponovaka i kod 100% nosilaca ekspanzije >90 ponovaka, dok su ponovci ispod veličine 22 kao i 22-90 ponovaka nemetilovani (Xi et al., 2015b).

Još jedan epigenetički mehanizam koji je evidentiran kod nosilaca ekspanzije, i asociran je sa smanjenjem ekspresije *C9orf72* u frontalnom korteksu i cerebelumu, je modifikacija histonskih repova odnosno trimetilacija lizinskih rezidua H3 i H4 histona (Belzil et al., 2013).

1.2 Bolesti sa predominantno motornim poremećajima

1.2.1 Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza je progresivno neurodegenerativno oboljenje kod koga dolazi do oštećenja centralnog i perifernog motornog neurona. Fenotipski se karakteriše slabošću mišića koja vodi ka generalizovanoj paralizi gde smrt najčešće nastaje usled paralize respiratorne muskulature za 3-5 godina od početka simptoma (Wijesekera and Leigh, 2009, Taylor et al., 2016). Sam početak oboljenja može biti u vidu spinalne forme koja je prisutna kod 2/3 bolesnika kod koje se inicijalni simptomi javljaju u vidu slabosti ekstremiteta, bulbarne forme koja se karakteriše otežanim govorom i gutanjem kao i respiratorne forme koja se karakteriše problemima sa disanjem (Wijesekera and Leigh, 2009). Oblik početka bolesti je povezan sa dužinom života ALS bolesnika pri čemu bolesnici sa bulbarnim početkom bolesti imaju kraće preživljavanje u odnosu na bolesnike sa spinalnim oblikom i ono iznosi 2,4 godine (Testa et al., 2004).

Pored motornih simptoma kod oko 50% SALS bolesnika prisutan je neki oblik kognitivnog poremećaja (Ringholz et al., 2005). Komorbiditet sa FTD javlja se kod 13,8-15% ALS bolesnika (Ringholz et al., 2005, Phukan et al., 2012) dok je kod 1,9% bolesnika prisutna demencija Alchajmerovog tipa (Phukan et al., 2012). Simptomi bvFTD pojavljuju se nakon 16 meseci od razvoja prvih simptoma BMN i kod 48% ALS-bvFTD bolesnika prisutan je bulbarni početak bolesti (Raaphorst et al., 2012). Kod bolesnika koji ne zadovoljavaju kliničke kriterijume za postavljanje dijagnoze demencije, egzekutivna disfunkcija je prisutna kod oko 25%, a neegzekutivna disfunkcija kod oko 17% ALS bolesnika (Phukan et al., 2012). Kod ALS bolesnika koji su klasifikovani kao kognitivno normalni nosioci GGGGCC ekspanzije, u poređenju sa ALS bolesnicima bez GGGGCC ekspanzije, imaju veće poremećaje u domenu egzekutivnih funkcija, vizuelne i verbalne memorije

pokazujući da je već u ranim fazama motornih simptoma, kod nekih ALS GGGGCC nosilaca ekspanzije, prisutan subklinički kognitivni poremećaj (Iazzolino et al., 2021).

Incidencija ALS u svetu iznosi 1,68 na 100.000 stanovnika i nešto je veća za muškarce (1,96 na 100.000 stanovnika) nego za žene (1,39 na 100.000 stanovnika) dok u Evropi iznosi 1,71-1,89 na 100.000 stanovnika zavisno od dela kontinenta (Marin et al., 2017). Epidemiološki podaci incidencije ALS sa teritorije Beograda pokazuju da godišnja incidencija iznosi 1,11 na 100.000 stanovnika pri čemu je najmanja registrovana incidencija bila 1998. godine 0,61 na 100.000 stanovnika dok je najveća registrovana incidencija 2000. godine iznosila 1,88 na 100.000 stanovnika (Stevic et al., 2016). Ukupna prevalencija ALS u svetu iznosi 4,48 na 100.000 stanovnika, u Evropi 5,40 na 100.000 stanovnika (Chio et al., 2013), dok na teritoriji Beograda prema epidemiološkim podacima ukupna prevalencija iznosi 1,07 na 100.000 stanovnika (Alcaz et al., 1996). Podaci iz 2016. godine na teritoriji Beograda pokazuju da je prosečna starost na početku bolesti iznosila 57,7 godina bez razlike među polovima (prosečna starost kod muškaraca i žena iznosi 57,0 i 58,9 godina redom, $p=0,86$), kod muškaraca učestaliji je bio spinalni početak bolesti, dok je kod žena bio učestaliji bulbarni početak (Stevic et al., 2016). Isto istraživanje pokazuje da je na teritoriji Beograda prisustvo FALS registrovano kod 6,5% bolesnika i svi su imali spinalni početak oboljenja.

Generalno, ALS se smatra sporadičnim oboljenjem kod 90-95% slučajeva, a pojava familijarnog oblika bolesti prisutna je kod 5-10% bolesnika (Talbot et al., 2016). Prvi gen povezan sa familijarnom pojavom ALS je gen *SOD1* (eng. *superoxide dismutase 1*) identifikovan 1993. godine (Rosen et al., 1993). Od tada su identifikovani i mnogi drugi geni koji se povezuju sa ovim oboljenjem (Mathis et al., 2019), a neki od značajnijih su *ANG* (eng. *angiogenin*) (Greenway et al., 2006), *TARDBP* (eng. *TAR DNA-binding protein*) (Sreedharan et al., 2008, Kabashi et al., 2008), *FUS* (eng. *fused in sarcoma*) (Vance et al., 2009, Kwiatkowski et al., 2009), *OPTN* (eng. *optineurin*) (Maruyama et al., 2010), *VCP* (eng. *valosin-containing protein*) (Johnson et al., 2010) i *C9orf72* (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011).

Smatra se da je ALS oboljenje oligogene etiologije (van Blitterswijk et al., 2012) i u literaturi su zabeleženi primeri postojanja više varijanti kod jednog bolesnika u više od jednog gena koji se vezuju za ALS (van Blitterswijk et al., 2012, Krüger et al., 2016).

1.2.2 Bolest slična Huntingtonovoj bolesti

Huntingtonova bolest (HB) je autozomno dominantno neurodegenerativno oboljenje u čijoj genetičkoj osnovi postoji ekspanzija trinukleotidnih CAG ponovaka u genu *HTT* (Group, 1993). Karakteristike fenotipa kod obolelih obuhvataju dominantno motornu fenomenologiju sa prisustvom horeje kao i kognitivne i psihičke smetnje. Reč horea potiče od grčke reči χορεία koja označava igru jer su kod ovih bolesnika prisutni generalizovani nevoljni pokreti koji izgledaju kao da plešu.

Samo godinu dana od kada je identifikovan genetički uzrok (1994), utvrđeno je da 1,2% bolesnika, koji imaju kliničku sliku HB, nemaju ekspanziju ovih ponovaka i predstavljaju moguće fenokopije HB (Andrew et al., 1994). HB fenokopije podrazumevaju grupu oboljenja koja imaju kliničke karakteristike Huntingtonove bolesti i genetički dokazano odsustvo ekspanzije CAG ponovaka u genu *HTT* (Wild and Tabrizi, 2007). HB fenokopije povezuju se sa drugim neurogenetičkim sindromima: bolest slična Huntingtonovoj bolesti tip 1 (eng. *HD like 1*), bolest slična Huntingtonovoj bolesti tip 2 (eng. *HD like 2*), bolest slična Huntingtonovoj bolesti tip 3 (eng. *HD like 3*), bolest slična Huntingtonovoj bolesti tip 4 (SCA17) (eng. *HD like 4*), spinocerebelarne ataksije tip 1 (SCA1) i tip 3 (SCA3), dentatorubralna-palidoluisianska atrofija (DRPLA) (eng. *Dentatorubral-pallidoluysian atrophy*), neuroakantocitoza, benigna hereditarna horea, poremećaji akumulacije gvožđa (Wild and Tabrizi, 2007) kao i sa ekspanzijom ponovaka u genu *C9orf72* (Beck et al., 2013, Kostic et al., 2014, Hensman Moss et al., 2014) i mutacijama u genu *ADCY5* (eng. *Adenylate Cyclase 5*) (Chen et al., 2012, Chen et al., 2015). Do otkrića GGGGCC ekspanzija u genu *C9orf72* najčešći uzročnik HB fenokopija bila je ekspanzija CAG/CAA ponovaka u genu *TBP*

(eng. *TATA-Box Binding Protein*) sa učestalošću od 1,8% (Wild et al., 2008) u kome ekspanzija ovih ponovaka dovodi do oboljenja spinocerebelarne ataksije tip 17 (SCA17) (Koide et al., 1999, Nakamura et al., 2001). Nešto manju učestalost imaju *HD like 1* i *HD like 2* (Wild et al., 2008) ili genetička povezanost sa HD fenokopijama nije uočena (Keckarevic et al., 2005, Costa et al., 2006).

Ekspanzija GGGGCC ponovaka u genu *C9orf72* predstavlja najčešći genetički uzrok HB fenokopija u Ujedinjenom Kraljevstvu sa učešćem od 1,95% (Hensman Moss et al., 2014). Pored horeje, klinička slika pacijenta sa GGGGCC ekspanzijom obuhvata mioklonus, distoniju, tremor, bradikineziju, rigidnost, tortikolis, znake gornjeg motornog neurona, ataksiju, depresiju, anksioznost, apatiju, egzekutivnu disfunkciju, psihijatrijske probleme kao i probleme sa pamćenjem (Hensman Moss et al., 2014).

1.2.3 Multipla sistemska atrofija

Multipla sistemska atrofija je neurodegenerativno oboljenje progresivnog toka i kasnog početka koje karakteriše kombinacija parkinsonizma, cerebelarne ataksije, piramidalnih znakova i autonomnog oštećenja (Wenning et al., 2003). Prosečna godišnja stopa incidencije ovog oboljenja u opštoj populaciji iznosi 0,6 na 100.000 dok je u populaciji sa starošću preko 50 godina života incidencija 3,0 na 100.000 (Bower et al., 1997), stopa prevalencije u opsegu 1,9-4,9 na 100.000 stanovnika (Chiò et al., 1998, Schrag et al., 1999, Tison et al., 2000).

Prema klasifikaciji MSA ima dva podtipa: MSA-P ukoliko su predominantni znaci parkinsonozma i MSA-C kada preovladava cerebelarni sindrom (Gilman et al., 1998). Patološki, MSA se karakteriše prisustvom glijalnih citoplazmatskih inkluzija (eng. *glial cytoplasmic inclusions*, GCIs) u centralnom nervnom sistemu (Papp et al., 1989) pri čemu jednu od glavnih komponenti ovih inkluzija čini protein α sinuklein (Spillantini et al., 1998b). Prisustvo ovog proteina kod MSA upravo povezuje ovo oboljenje sa drugim neurodegenerativnim oboljenjima sa α sinuklein patologijom kao što su Parkinsonova bolest i demencija sa Lewijevim telima (DLT) (Spillantini et al., 1998b) u kojima α sinuklein čini komponentu Lewijevih tela u PB i kod DLT (Spillantini et al., 1997).

Kako α sinuklein ima ulogu u patologiji MSA, genetička istraživanja su se fokusirala na gen *SNCA* (eng. *Synuclein alpha*), ali nisu uspela da pronađu povezanost ovog gena sa ovim oboljenjem (Ozawa et al., 1999, Ozawa et al., 2006, Lincoln et al., 2007). U studiji Scholz i saradnika pokazana je značajna povezanost između polimorfizama pojedinačnih nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) u genu *SNCA* i povećanog rizika za razvoj MSA (Scholz et al., 2009), ali ovi rezultati nisu potvrđeni u narednoj studiji u kojoj je broj ispitivanih bolesnika dupliran (Sailer et al., 2016). U japanskoj studiji registrovana je varijanta V343A u genu *COQ2* (eng. *Coenzyme Q2*) kod bolesnika sa MSA (Multiple-System Atrophy Research, 2013) međutim, ovi rezultati nisu potvrđeni u Evropskoj studiji koja je uključivala kontrole i preko 300 neuropatološki potvrđenih slučajeva MSA (Schottlaender and Houlden, 2014). Genetička ispitivanja MSA obuhvatila su i druge gene kandidate: *PINK1* (eng. *PTEN-induced putative kinase 1*), *Parkin* (Brooks et al., 2011), *LRRK2* (eng. *Leucine Rich Repeat Kinase 2*) (Cho et al., 2009), *GBA* (eng. *Glucosylceramidase Beta*) (Goker-Alpan et al., 2006), *MAPT* (Morris et al., 2000), *CYP1A1* (eng. *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1*), *GSTM1* (eng. *Glutathione S-Transferase Mu 1*), *NAT2* (eng. *N-Acetyltransferase 2*), *DAT1* (eng. *Dopamine Transporter 1*), *CYP2D6* (eng. *Cytochrome P450 Family 2 Subfamily D Member 6*) (Nicholl et al., 1999) kao i druge gene čiji je pregled dat u (Federoff et al., 2015). Dobijeni rezultati su bili negativni ili nejasni, dok je za neke bila potrebna dalja verifikacija. U GWAS studiji koju su sprovedi Sailer i saradnici nisu pronađeni značajni lokusi, ali su ipak lokusi gena *FBXO47* (eng. *F-Box Protein 47*), *MAPT*, *ELOVL7* (eng. *Elongation Of Very Long Chain Fatty Acids Protein 7*) i *EDN1* (eng. *Endothelin 1*) bili su od potencijalnog interesa (Sailer et al., 2016).

1.2.4 Progresivna supranuklearna paraliza

Progresivna supranuklearna paraliza (PSP) je neurodegenerativno oboljenje čije osnovne kliničke karakteristike obuhvataju posturalnu nestabilnost, vertikalnu supranuklearnu paralizu pogleda, akineziju i kognitivnu disfunkciju (Hoglinger et al., 2017). Obuhvata više kliničkih fenotipova od kojih je jedan nazvan „Richardsonov sindrom“ i čini 54% patološki potvrđenih PSP slučajeva (Williams et al., 2005). Isti autori drugi oblik PSP nazivaju PSP-parkinsonizam koji podseća na PB sa kliničkom slikom asimetričnog početka, tremora, bradikinezije sa odgovorom na lečenje levodopom. Još jedan podtip čini čista akinezija koja obuhvata *freezing* u toku hoda, promene u rukopisu i dizatriju koja je prisutna kod oko 40% bolesnika (Owens et al., 2016). Drugi oblici PSP i njihova klinička karakterizacija su prikazani u MDS-PSP priručniku (Hoglinger et al., 2017).

Prosečna godišnja stopa incidencije PSP iznosi 1,1 na 100.000 u opštoj populaciji do 5,3 na 100.000 u populaciji preko 50 godina starosti (Bower et al., 1997) sa stopom prevalencije od 1,4-6,4 na 100.000 stanovnika (Golbe et al., 1988, Chiò et al., 1998, Schrag et al., 1999).

Patološku karakteristiku PSP čini prisustvo Tau pozitivnih neurona i glija ćelija u subkortikalnim regionima (Spillantini and Goedert, 1998, Spillantini et al., 1998a). Prisustvo Tau patologije kod PSP bolesnika povezano je ovo oboljenje sa genom *MAPT*. Na genetičkom nivou ova veza je podržana otkrićem da je dinukleotidni polimorfni marker u genu *MAPT* povezan sa PSP (Conrad et al., 1997). Kasnije je pokazano da asocijacija takođe postoji i za produženi H1 haplotip koji pokriva humani *MAPT* gen (Baker et al., 1999). Štaviše, i heterozigotne (Poorkaj et al., 2002, Ros et al., 2005, Delisle et al., 1999, Stanford et al., 2000, Rossi et al., 2004) i homozigotne (Nicholl et al., 2003) mutacije u genu *MAPT* registrovane su kod PSP bolesnika. Pored mutacija u genu *MAPT*, varijante u genu *LRRK2* su takođe povezivane sa PSP (Zimprich et al., 2004, Spanaki et al., 2006), ali istraživanja na neuropatološki potvrđenim PSP slučajevima nisu potvrdila ove rezultate (Ross et al., 2006, Gaig et al., 2008). Dalje, GWAS studije identifikovale su nekoliko lokusa, gen *MAPT*, *MOBP* (eng. *Myelin Associated Oligodendrocyte Basic Protein*), *STX6* (eng. *Syntaxin 6*), *EIF2AK3* (eng. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3*), *SLCO1A2* (eng. *Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1A2*), *DUSP10* (eng. *Dual Specificity Phosphatase 10*) koji su povezani sa PSP (Hoglinger et al., 2011, Sanchez-Contreras et al., 2018, Chen et al., 2019).

1.3 Bolesti sa predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima

1.3.1 Blagi kognitivni poremećaj

Blagi kognitivni poremećaj predstavlja međustanje između očekivanih kognitivnih promena koje se dešavaju sa starenjem i demencije (Petersen et al., 1999). BKP se može klasifikovati u dve podgrupe kao amnestički (aBKP) i neamnestički (naBKP) poremećaj, a podgrupe dalje na poremećaj u jednom kognitivnom domenu i poremećaj u multiplim kognitivnim domenima (Petersen, 2004).

Stopa incidencije BKP u populaciji koju čine osobe ≥ 65 godina života iznosi 21,5-71,3 na 1000 (Ward et al., 2012). Amnestički oblik BKP ima veću stopu incidencije (37,7 na 1000) nego neamnestički oblik (14,7 na 1000). Veća stopa incidencije pokazana je kod muškog pola, kao i kod osoba sa stepenom obrazovanja ≤ 12 godina kod aBKP i naBKP (Roberts et al., 2012). Stopa prevalencije BKP iznosi 3%-42% i povećava se sa povećanjem godina života od 65 do 85 godina starosti (Ward et al., 2012). Amnestički oblik BKP ima veću prevalenciju (11,1%) od neamnestičkog (4,9%) oblika i sa povećanjem starosti stopa prevalencije se povećava kod oba pola, za muškarce iznosi 19%, dok je za žene niža i iznosi 14,1% (Petersen et al., 2010). U meta analizi

sprovedenoj 2017. godine, nije pokazan uticaj pola na prevalenciju i incidenciju amnestičkog BKP-a kao ni u studijama koje su kombinovale amnestički i neamnestički BKP. Ženski pol kod neamnestičkog BKP imao je veću prevalenciju, ali ne i incidenciju (Au et al., 2017). Povećana stopa prevalencije javlja se kod osoba sa nižim stepenom obrazovanja (<9 godina), kao i kod osoba sa *APOE* ε3ε4 i ε4ε4 genotipom (Petersen et al., 2010).

Kod bolesnika sa dijagnozom BKP postoji povećan rizik za razvoj demencije u poređenju sa bolesnicima koji imaju normalnu kognitivnu funkciju (Ravaglia et al., 2008, Roberts et al., 2014). Oko 38% bolesnika (175,0 na 1000) sa dijagnozom BKP praćenih u intervalima po 15 meseci tokom oko 5 godina povratu normalan kognitivni status, ali se kod oko 65% naknadno razvijaju BKP ili demencija, dok kod 26% bolesnika dolazi do razvoja demencije, češće Alchajmerovog tipa bez reverzije u normalan kognitivni status (Roberts et al., 2014). Stopa reverzije u normalan kognitivni status niža je kod muškaraca sa starošću 70-79 godina nego kod žena, dok je u starijoj životnoj dobi sa 80-89 godina ona viša kod muškaraca. Kod amnestičkog BKP, BKP u multiplim kognitivnim domenima, kao i kod bolesnika koji su nosioci *APOE* ε4 alela, rizik za reverziju u normalan kognitivni status je niži (Roberts et al., 2014). Kod bolesnika sa dijagnozom BKP u dijagnostici se mogu koristiti određeni biohemijski markeri kao što su koncentracije T-tau, P-tau₁₈₁ i Aβ42 u likvoru kao prediktori razvoja AB (Hansson et al., 2006).

U faktore rizika za nastanak BKP uključeni su još i kardiovaskularni faktori rizika kao što su gojaznost, diabetes mellitus tip 2, dislipidemija (Ng et al., 2016) zatim hronična opstruktivna bolest pluća (Singh et al., 2014), depresija (Geda et al., 2014), kao i kognitivno manje aktivan način života (Verghese et al., 2006) i slabija fizička aktivnost (Geda et al., 2010).

1.3.2 Frontotemporalna demencija

Frontotemporalna demencija je treći po učestalosti oblik demencije u svim starosnim dobima, nakon AB i DLT (Arvanitakis, 2010), a kod osoba mlađih od 65 godina starosti nalazi se na drugom mestu posle AB (Arvanitakis, 2010, Knopman and Roberts, 2011). Procenjena stopa incidencije FTD iznosi 0-0,3 na 1000 sa stopom prevalencije merenom u određenom vremenskom trenutku 0,01-4,6 na 1000 osoba, dok prevalencija merena u određenom vremenskom intervalu iznosi 0,16-31,04 na 1000 osoba (Hogan et al., 2016).

Prema McKhann i saradnicima, klinička slika FTD-a se može ispoljiti u vidu promena u ponašanju ili jezičkom domenu (McKhann et al., 2001). Bihevioralna varijanta FTD se karakteriše promenama u ponašanju, apatijom, gubitkom empatije, prisustvom stereotipnog ili kompulsivnog ponašanja, promenama u ishrani, kao i otežanim egzekutivnim i kognitivnim sposobnostima (Rascovsky et al., 2011). Drugi klinički oblik FTD-a obuhvata nefluentnu/agramatičku primarnu progresivnu afaziju kod koje se javljaju motorne teškoće u govoru sa otežanim nefluentnim govorom i agramatizam koji obuhvata kratke jednostavne fraze i izostavljanje gramatičkih morfema (Ogar et al., 2007, Gorno-Tempini et al., 2011, Grossman, 2012). FTD se takođe može ispoljiti i kao semantička varijanta primarne progresivne afazije koja se karakteriše anomijom i deficitom u razumevanju pojedinačnih reči (Hodges et al., 1992, Gorno-Tempini et al., 2011). bvFTD u odnosu na primarnu progresivnu afaziju predstavlja zastupljeniji oblik sa četiri puta većom učestalošću (Hogan et al., 2016). Klinička prezentacija FTD-a u okviru preklapajućeg sindroma može se ispoljiti zajedno sa drugim neurodegenerativnim oboljenjima kao što su BMN (Seelaar et al., 2007, Burrell et al., 2011, Kertesz and McMonagle, 2011), PSP (Rohrer et al., 2010, Kertesz and McMonagle, 2011), kortikobazalna degeneracija (Gorno-Tempini et al., 2004, Kertesz and McMonagle, 2011). Znaci parkinsonizma prisutni su kod 22,7% pacijenta sa dijagnozom bvFTD pri čemu je najzastupljeniji simptom bradikinezija, a najmanje zastupljen tremor (Padovani et al., 2007).

Veoma često u literaturi sreće se temin frontotemporalna lobarna degeneracija koja se odnosi na bolesnike sa kliničkom prezentacijom FTD-a kod kojih je genetički potvrđeno postojanje varijante koja je uzročnik FTD-a ili je biopsijom ili postmortem patohistološki potvrđen FTD (Finger, 2016). Makroskopskim postmortem pregledom obično se uočava atrofija frontalnih i/ili

temporalnih režnjeva mozga (McKhann et al., 2001). Na osnovu patoloških karakteristika FTLD se može podeliti na podtipove FTLD-tau, FTLD-TDP, FTLD-FUS i FTLD-UPS (Mackenzie et al., 2010).

Dosadašnje genetičke analize povezuju FTD, bilo kao samostalni klinički fenotip ili u okviru nekog drugog sindroma, sa mutacijama u genima *MAPT* (Hutton et al., 1998), *GRN* (Cruts et al., 2006), *VCP* (Watts et al., 2004, van der Zee et al., 2009), *CHMP2B* (eng. *Charged Multivesicular Body Protein 2B*) (Skibinski et al., 2005), *TARDBP* (Benajiba et al., 2009), *FUS* (Broustal et al., 2010), *C9orf72* (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011), *CSF1R* (eng. *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*) (Rademakers et al., 2011), *SQSTM1* (eng. *Sequestosome 1*) (Rubino et al., 2012), *TREM2* (eng. *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2*) (Guerreiro et al., 2013), *UBQLN2* (eng. *Ubiquilin 2*) (Gellera et al., 2013), *CHCHD10* (eng. *Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10*) (Bannwarth et al., 2014), *OPTN* i *TBK1* (eng. *TANK Binding Kinase 1*) (Pottier et al., 2015).

1.3.3 Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest je progresivno neurodegenerativno oboljenje koje se klinički manifestuje padom kognitivnih i memorijskih sposobnosti, progresivnim pogoršanjem u izvođenju svakodnevnih životnih aktivnosti, neuropsihijatrijskim simptomima kao i poremećajima u ponašanju (Cummings, 2004). Postmortem analize su pokazale da AB čini 77% patološki potvrđenih demencija od kojih 54% ima čist oblik AB (Barker et al., 2002).

Procenjena stopa incidencije demencije usled AB u populaciji preko 60 godina starosti iznosi 15,8 na 1000, a stopa prevalencije merena u određenom vremenskom trenutku iznosi 40,2 na 1000 u populaciji preko 60 godina starosti (Fiest et al., 2016). Prema statističkoj proceni pretpostavlja se da će u Sjedinjenim Američkim Državama broj osoba sa demencijom usled AB u periodu od 2010. do 2050. godine biti utrostručen i 2050. godine iznosiće 13,8 miliona od čega će 7 miliona imati 85 ili više godina (Hebert et al., 2013).

AB se fenotipski najčešće, kao klasično ispoljavanje, javlja u obliku progresivnog amnestičkog sindroma koji obuhvata poteškoće sa pamćenjem skorašnjih događaja često praćene otežanim pronalaženjem reči kao i imena bliskih ljudi (Petersen, 1998). Prema revidiranim kriterijumima za postavljanje dijagnoze demencije usled AB prema McKhann i saradnicima iz 2011. godine, predložena terminologija obuhvata tri grupe: verovatna demencija AB, moguća demencija AB i verovatna ili moguća demencija AB sa dokazima o postojanju patofizioloških procesa koji se vezuju za AB. Verovatna demencija AB pored amnestičke kliničke prezentacije može imati i neamnestičku formu koja može biti jezička prezentacija, vizuospacijalna prezentacija i egzekutivna disfunkcija (McKhann et al., 2011). Postavljanje definitivne dijagnoze AB uključuje kliničke kriterijume za verovatnu AB kao i biopsijom ili autopsijom potvrđen histopatološki nalaz (McKhann et al., 1984).

Neke od patoloških karakteristika AB za koje se veruje da doprinose oštećenju neurona su formiranje β amiloidnih plaka van nervne ćelije koje ometaju međusobnu komunikaciju neurona na sinapsama i doprinose ćelijskoj smrti, dok akumulacija abnormalne forme proteina tau (eng. *tau tangles*) unutar neurona blokira transport esencijalnih molekula u ćeliju (Alzheimer's, 2016). 1992. godine Hardy i Higgins postavili su hipotezu amiloidne kaskade prema kojoj nakupljanje proteina amiloid β dovodi do patologije AB (Hardy and Higgins, 1992).

AB koja počinje pre 65. godine života definiše se kao AB ranog početka (ABrp), prisutna je kod manje od 10% slučajeva i uglavnom se nasleđuje autozomno-dominantno dok se početak bolesti nakon 65. godine života smatra AB kasnog početka (ABkp) i dosta je češća (Hinz and Geschwind, 2017). Kod ABrp oko 80% mutacija dešava se u genu *PSEN1* (eng. *Presenilin 1*), oko 15% u genu *APP* (eng. *Amyloid Beta Precursor Protein*) i oko 5% u genu *PSEN2* (eng. *Presenilin 2*) (Hinz and Geschwind, 2017). ABkp povezuje se sa *APOE* $\epsilon 4$ alelom koji se smatra faktorom rizika za AB kod sporadičnih i familijarnih oblika bolesti (Saunders et al., 1993). *APOE* ima tri forme alela $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$ pri čemu je alel $\epsilon 3$ u homozigotnom obliku najučestaliji u populaciji (61%),

dok alel $\epsilon 2$ u homozigotnom obliku ima najmanju učestalost, od 0,5% (Alzheimer's, 2016). Nosioci alela $\epsilon 4$ u homozigotnom obliku imaju veći rizik za razvoj AB u odnosi na nosioce ovog alela u heterozigotnom obliku (Neu et al., 2017). Takođe, uticaj pola i *APOE* genotipa povezan je sa rizikom za nastanak AB. Kod žena prisustvo *APOE* genotipa $\epsilon 2/\epsilon 3$ smanjuje rizik za AB više nego kod muškaraca, dok žene genotipa *APOE* $\epsilon 3/\epsilon 4$ u životnoj dobi 65-75 godina imaju veći rizik za AB u odnosu na muškarce (Neu et al., 2017).

1.3.4 Atipična demencija

Pored klasičnih opisa za AB i FTD, prema literaturi i u svakodnevnoj kliničkoj praksi, sreću se oblici koji ne zadovoljavaju kriterijume za navedene tipične forme demencije pa se zbog toga svrstavaju u grupu atipičnih demencija (Cipriani et al., 2015). Kod određenog broja bolesnika postojanje atipičnog kliničkog toka vodi otežanom postavljanju kliničke dijagnoze, a samim tim i terapije.

Postavljanje dijagnoze demencije podrazumeva prikupljanje podataka putem anamneze, neurološkog pregleda sa procenom mentalnog statusa, laboratorijske analize za procenu metaboličkih i fizioloških abnormalnosti kao i primenu magnetne rezonancije i kompjuterske tomografije (Gale et al., 2018), pri čemu patološka analiza predstavlja „zlatni standard“ za postavljanje dijagnoze (Cipriani et al., 2015).

Kod bolesnika koji imaju demenciju atipičnog tipa sa prisustvom pozitivne porodične anamneze, genetičke analize su pokazale prisustvo mutacije u genu *PSEN2* (Binetti et al., 2003) kao i mutacije u genu *PSEN1* kod bolesnika koji je pored demencije, koja se nije mogla klasifikovati kao demencija po tipu Alchajmera, imao i spastičnu paraparezu (Jacquemont et al., 2002). Sekvenciranjem genoma detektovano je prisustvo varijanti nejasnog značaja u genima *TNKL* (eng. *Tyrosine Kinase Non Receptor 1*), *MAPT*, *SORL1* (eng. *Sortilin Related Receptor 1*), *MME* (eng. *Membrane Metalloendopeptidase*) i *TM2D3* (eng. *TM2 Domain Containing 3*) (Cochran et al., 2019).

2. CILJEVI RADA

Predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji bila je analiza GGGGCC ponovaka u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* kod bolesnika obolelih od različitih neurodegenerativnih bolesti. U tu svrhu postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Utvrđivanje učestalosti i distribucije GGGGCC ponovaka kao i prisustva ekspanzija kod bolesnika sa teritorije Srbije sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom, bolešću sličnoj Hantingtonovoj bolesti, multiplom sistemskom atrofijom, progresivnom supranuklearnom paralizom, blagim kognitivnim poremećajem, frontotemporalnom demencijom, Alchajmerovom bolešću i atipičnom demencijom.
2. Detaljna klinička karakterizacija bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama.
3. Ispitivanje korelacije veličine ponovaka i određenih kliničkih parametara kod bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama kao i kod bolesnika bez detektovanih GGGGCC ekspanzija.
4. Formulisanje preporuka za genetičko testiranje bolesnika na prisustvo GGGGCC ekspanzije u populaciji Srbije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Ispitanici

3.1.1 Bolesnici i članovi porodice

U okviru ove doktorske disertacije istraživanje je obuhvatilo ukupno 1052 bolesnika od kojih je 1000 bolesnika ambulantno ili bolnički lečeno na Klinici za neurologiju Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije (UKCS) u periodu od 2008. do 2021. godine. Krv i prateća medicinska dokumentacija za 52 bolesnika poslata su iz drugih bolničkih ustanova u UKCS radi genetičkog testiranja. Bolesnici su registrovani u kliničkoj bazi Klinike za neurologiju, UKCS. Bolesnici sa registrovanim mutacijama u drugim genima nisu bili isključeni iz analize.

Raspodela bolesnika prema kliničkim dijagnozama bila je sledeća:

- u grupi bolesnika sa predominantno motornim poremećajima
 - 383 bolesnika bilo je sa dijagnozom amiotrofične lateralne skleroze (210 muškaraca i 173 žene),
 - 80 bolesnika sa postavljenom dijagnozom bolesti slične Hantingtonovoj bolesti (30 muškaraca i 50 žena),
 - 44 bolesnika sa postavljenom dijagnozom multiple sistemske atrofije (21 muškarac i 23 žene),
 - 73 bolesnika sa dijagnozom progresivne supranuklearne paralize (41 muškarac i 32 žene).
- u grupi bolesnika sa predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima
 - 118 bolesnika sa dijagnozom blagog kognitivnog poremećaja (34 muškarca i 84 žene),
 - 129 bolesnika sa dijagnozom frontotemporalne demencije (74 muškarca i 55 žena),
 - 176 bolesnika sa dijagnozom Alchajmerove bolesti (79 muškaraca i 97 žena),
 - 49 bolesnika sa dijagnozom atipične demencije (22 muškarca i 27 žena).

Ukupno 5 osoba je testirano presimptomatski kao srodnici bolesnice sa dijagnozom frontotemporalne demencije koja je bila nosilac intermedijernog broja ponovaka na dužem alelu (2 muškarca i 3 žene).

Svi bolesnici uključeni u ovo istraživanje detaljno su usmeno i pismeno informisani o ciljevima istraživanja i potpisali su informisani pristanak za učešće u ovoj studiji. Studija je odobrena od strane Etičkog odbora UKCS (odluka broj 402/5 od 30.01.2020.).

Dijagnoze su postavljene na osnovu kriterijuma:

- ALS na osnovu kriterijuma El Escorial (Brooks et al., 2000),
- Bolest slična Hantingtonovoj bolesti na osnovu kliničke slike Hantingtonove bolesti i odsustva ekspanzije CAG ponovaka u genu *HTT*,
- MSA na osnovu kriterijuma (Gilman et al., 2008),
- PSP na osnovu kriterijuma (Hoglinger et al., 2017),
- BKP na osnovu kriterijuma (Albert et al., 2011),
- FTD na osnovu kriterijuma (Gorno-Tempini et al., 2011, Rascovsky et al., 2011),
- AB na osnovu kriterijuma (McKhann et al., 2011),
- ALS/FTD na osnovu kriterijuma (Strong et al., 2017).

Za svakog bolesnika dokumentovana je starost na početku bolesti.

Kod bolesnika sa dijagnozom amiotrofična lateralne skleroze prikupljeni su i dodatni podaci da li je početak oboljenja bio spinalni, bulbarni ili respiratorni. Osim toga, kod bolesnika sa spinalnim početkom, dokumentovano je da li je bolest počela na gornjim ili donjim ekstremitetima, kao i da li je počela na levim ili desnim ekstremitetima.

Za svakog bolesnika prikupljeni su dostupni podaci o porodičnoj anamnezi. U grupi bolesnika sa predominantno motornim poremećajima, na osnovu porodične anamneze kategorizacija je vršena u sledeće tri grupe: pozitivna porodična anamneza, negativna porodična anamneza ili nepoznata porodična anamneza.

Kod bolesnika sa dijagnozom amiotrofične lateralne skleroze u slučaju pozitivne porodične anamneze razlikovane su četiri podkategorije:

- pozitivna porodična anamneza na ALS,
- pozitivna porodična anamneza na demencije,
- pozitivna porodična anamneza na PB,
- pozitivna porodična na psihijatrijske tegobe.

U grupi bolesnika sa predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima korišćena je modifikovana skala 1-4 po Goldmanu iz 2005. godine (Goldman et al., 2005) i Beku iz 2008. godine (Beck et al., 2008) gde se razlikuju sledeće kategorije:

- 1 - autozomno-dominantan oblik nasleđivanja ukoliko postoje najmanje tri člana porodice u dve generacije,
- 2 - porodična agregacija ukoliko postoje najmanje tri srodnika pri čemu nisu zadovoljeni kriterijumi za autozomno-dominantan oblik nasleđivanja,
- 3 - ukoliko postoji srodnik sa početkom bolesti pre 65. godine života,
- 3,5 - ukoliko postoji srodnik gde bolest počinje posle 65. godine života,
- 4 - negativna porodična istorija ili ne postoje podaci.

Prisustvo psihijatrijskih tegoba kod članova porodice bolesnika sa predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima uključeno je pozitivnu porodičnu anamnezu.

U grupi bolesnika sa predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima korišćena je mala skala za procenu mentalnog statusa (eng. *Mini-Mental State Examination*, MMSE)(Folstein et al., 1975).

U cilju izvođenja molekularno genetičkih analiza svakom bolesniku je punktirano do 10 ml venske krvi u vakutanere u kojima se nalazio antikoagulans natrijum citrat ili EDTA. Uzorci krvi su čuvani na +4°C do trenutka izolacije molekula DNK nakon čega su skladišteni na -20°C u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti na Klinici za neurologiju, UKCS.

3.1.2 Kontrolna grupa

Kontrolna grupa sastojala se od 96 ispitanika (27 osoba muškog i 69 osoba ženskog pola) koji nisu bili u krvnom srodstvu sa bolesnicima. Ispitanici su pregledani od strane neurologa i utvrđeno je da nemaju neurološke tegobe. Takođe, porodična anamneza je bila kategorije 4 prema modifikovanom Goldman skor. Podaci koji su prikupljeni o ispitanicima su pol i starost u trenutku uzorkovanja krvi za genetičke analize.

Nakon davanja saglasnosti za učestvovanje u ovom istraživanju ispitanicima je uzet uzorak od 10 ml venske krvi na antikoagulansu EDTA ili natrijum-citratu. Krv je skladištena na +4°C do trenutka izolacije molekula DNK nakon čega su uzorci krvi skladišteni na -20°C u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti na Klinici za neurologiju, UKCS.

Molekularno genetičke analize izvođene su u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti na Klinici za neurologiju, UKCS.

3.2 Metode molekularno genetičke analize

Određivanje broja GGGGCC ponovaka kao i prisustva GGGGCC ekspanzija u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* vršeno je prema metodama (DeJesus-Hernandez et al., 2011) u dva koraka:

1. Korišćena je metoda reakcije lančane polimerizacije (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) primenom protokola koji uključuje dva koraka. U prvom koraku analize, PCR metodom umnožen je region koji sadrži ponovke i u tu svrhu korišćen je klasično dizajniran par prajmera pri čemu je jedan od prajmera fluorescentno obeležen (eng. *quantitative fluorescence polymerase chain reaction*, QF-PCR) (Poglavlje 3.2.2.1). Ovim korakom moguće je detektovati samo prisustvo neekspandovanih alela veličine do 30 GGGGCC ponovaka. Kod bolesnika kod kojih je pokazano prisustvo samo jednog alela veličine normalnog opsega do 30 GGGGCC ponovaka, radi utvrđivanja da li je, pored normalnog, prisutan i patološki alel koji ima preko 30 ponovaka ili je reč o normalnom homozigotu, rađen je *repeat-primed* PCR (RP-PCR) (Poglavlje 3.2.2.2).
2. Kod bolesnika kod kojih je *repeat-primed* PCR metodom utvrđeno prisustvo testerastog signala (eng. *saw tooth pattern*) opadajućeg intenziteta rađen je *small-pool* PCR (Poglavlje 3.2.2.3) praćen Southern blot hibridizacijom (Poglavlje 3.2.5) koji je za te svrhe optimizovan u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti na Klinici za neurologiju, UKCS.

Veličina *C9orf72* alela grupisana je u tri kategorije (Renton et al., 2011, Majounie et al., 2012b, Xi et al., 2012, Cannas et al., 2015):

- aleli koji su imali manje od 20 ponovaka smatrani su normalnim,
- aleli koji su imali 20-29 ponovaka smatrani su intermedijernim alelima,
- aleli koji su imali preko 30 ponovaka smatrali su se patogenim.

3.2.1 Izolacija i određivanje koncentracije izolovane genomske DNK

Izolacija genomske DNK iz periferne krvi vršena je upotrebom komercijalnog seta *PureLink™ Genomic DNA Mini kit INVITROGEN (Life Technologies, USA)* i metodom izolovanja. *PureLink™ Genomic DNA Mini kit* namenjen je za brzo izolovanje genomske DNK iz pune krvi i drugih telesnih tečnosti. Na ovaj način izolovana genomska DNK korišćena je za reakciju lančane polimerizacije (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), odnosno, za fluorescentni PCR i za *repeat-primed* PCR metod. Za pripremu koraka koji su prethodili *small-pool* PCR reakciji praćenju Southern blot hibridizacijom korišćena je genomska DNK dobijena modifikovanom metodom izolovanja (eng. *salting out*) prema Miller-u, 1988 (Miller et al., 1988).

U gore navedenim metodama izolacije DNK, u prisustvu proteinaze K, prvo se vrši liziranje limfocita periferne krvi puferom za lizu. Prilikom upotrebe komercijalnog seta *PureLink*, DNK u lizatu se vezuje za silikonsku membranu kolonice, zatim se ispira odgovarajućim puferima, i nakon prečišćavanja eluira sa membrane upotrebom odgovarajućeg pufera ili redestilovane vode. Kod primene metode izolovanja, DNK iz lizata se oslobađa proteina primenom saturisanog rastvora soli, precipitira etanolom i zatim rastvara u redestilovanoj vodi.

Određivanje koncentracije izolovane DNK vršeno je fluorometrijskom metodom pomoću uređaja Qubit® 3.0 Fluorometer (*Invitrogen, SAD*) i komercijalnog seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kits (*Invitrogen, SAD*).

Qubit dsDNA set sadrži fluorescentnu boju koja se selektivno vezuje za dvolančani molekul DNK i fluorescira tek nakon vezivanja za DNK. Pri određenoj koncentraciji boje, intenzitet fluorescence rastvora je direktno proporcionalan koncentraciji DNK u datom rastvoru. Fluorescentni signal merenog uzorka se očitava pomoću Qubit fluorometra i zatim, na osnovu DNK standarda poznatih koncentracija, direktno preračunava u koncentraciju DNK.

3.2.1.1 Protokol za izolaciju genomske DNK iz krvi upotrebom seta *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit INVITROGEN*

Izolacija genomske DNK vršena je prema uputstvu proizvođača. Koraci centrifugiranja su izvođeni na sobnoj temperaturi.

1. U tubicu od 1,5 ml dodato je 20 µl proteinaze K, zatim 200 µl periferne krvi i 20 µl RNaze A;
2. Tubica sa smešom je kratko vorteksovana, a zatim i kratko centrifugirana (Centrifuge 5804 R, rotor FA-45-30-11, *Eppendorf*, Nemačka) i ostavljena da stoji 2 minuta na sobnoj temperaturi;
3. U tubicu sa smešom dodato je 200 µl pufera za lizu nakon čega je tubica vorteksovana i inkubirana 10 minuta na 56°C;
4. Nakon inkubacije tubica sa smešom je kratko centrifugirana i u nju je dodato 200 µl 96% etanola (*Honeywell*, Nemačka), a zatim kratko vorteksovana i kratko centrifugirana;
5. Ceo sadržaj iz tubice prenet je u PureLink spin kolonicu i centrifugiran 1 minut na 9700 obrtaja u minuti (eng. *rotation per minute*, rpm);
6. Nakon završene centrifuge kolektorska tuba u kojoj se nalazio filtrat je odbačena, a spin kolonica je prebačena u novu kolektorsku tubicu od 2 ml;
7. U spin kolonicu dodato je 500 µl pufera 1, a zatim je spin kolonica centrifugirana 1 minut na 9700 rpm nakon čega je spin kolonica prebačena u novu kolektorsku tubicu, a kolektorska tubica sa filtratom je odbačena;
8. Potom je u spin kolonicu dodato 500 µl pufera 2, kolonica je centrifugirana 3 minuta na 13000 rpm, kolektorska tuba sa filtratom je odbačena, a spin kolonica je prenet u tubicu od 1,5 ml;
9. U spin kolonicu je zatim dodato 120 µl dejonizovane vode, potom inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je tubica centrifugirana 2 minuta na 13000 rpm;
10. Spin kolonica je odbačena, a izolovani uzorak DNK koji je eluiran u vodi čuvan je na +4°C ili -20°C do analize.

3.2.1.2 Protokol za izolaciju genomske DNK iz krvi metodom iseljavanja

Korišćena je modifikovana metoda izolacije genomske DNK metodom iseljavanja prema Miller, 1988. Koraci centrifugiranja izvođeni su na sobnoj temperaturi. Metoda uključuje sledeće korake:

1. Uzorak krvi (5-10 ml) presut je u radnu epruvetu u koju je dodata ista zapremina pufera za lizu (0,32 M saharoza; 10 mM TRIS HCl. pH 7,5; 1% TRITONx100; 5 mM MgCl₂);
2. Epruveta sa smešom je kratko vorteksovana i inkubirana 15 minuta na +4°C;
3. Nakon inkubacije epruveta je ponovo vorteksovana i centrifugirana 10 minuta na 2800 rpm;
4. Supernatant je odbačen i u preostali talog je dodato do 5 ml fizio pufera (0,075 M NaCl; 0,025 M EDTA pH8);
5. Smeša je vorteksovana i zatim centrifugirana 10 minuta na 2800 rpm;
6. Supernatant je odbačen i ponavljen je postupak sa dodavanjem fizio pufera;
7. Supernatant je odbačen i u talog je dodato 3 ml pufera A (10 mM Tris-HCL pH 8; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA), 25 µl proteinaze K;
8. Smeša je vorteksovana da se rastvori talog i dodato je 200 µl 10% SDS;
9. Smeša je inkubirana preko noći na 37 °C;
10. Nakon završene inkubacije u smešu je dodato 1 ml 6 M NaCl, vorteksovana je i centrifugirana 10 minuta na 2800 rpm;
11. Supernatant je preliven u drugu epruvetu i centrifugiran 10 minuta na 2800 rpm, a epruveta se talogom je odbačena;
12. Supernatant je ponovo preliven u drugu epruvetu i dodata je ista zapremina izopropanola;

13. Epruveta sa smešom je polako izvrtana dok se ne pojavi beličasti končić DNK;
14. Pipetom je DNK u vidu končića prebačena u 70% hladan etanol na 30 sekundi;
15. Nakon vađenja iz etanola DNK je sušena na sobnoj temperaturi oko 1h;
16. Nakon završenog procesa sušenja DNK je resuspendovana u redestilovanoj vodi i čuvana na +4°C.

3.2.1.3 Određivanje koncentracije izolovane DNK pomoću seta Qubit™ dsDNA BR Assay Kits

Merenje koncentracije DNK vršeno je u odgovarajućim Qubit™ assay tubicama (*Invitrogen, SAD*) zapremine 0,5 ml. Kvantifikacija DNK vršena je prema protokolu proizvođača na sledeći način:

1. Qubit™ radni rastvor ukupne zapremine 200 µl po uzorku napravljen je tako što je Qubit™ dsDNA BR reagens rastvoren u Qubit™ dsDNA BR puferu u odnosu 1:200;
2. U tubice za merenje standarda razliveno je 190 µl Qubit™ radnog rastvora i po 10 µl odgovarajućeg DNK standarda (Standard 1 (0 ng/µl) i Standard 2 (100 ng/µl));
3. U tubice za merenje uzoraka razliveno je po 199 µl Qubit™ radnog rastvora. Potom je u svaku Qubit™ assay tubicu sa Qubit™ radnim rastvorom ispipetirano po 1 µl odgovarajuće DNK. Ukupna zapremina smeše u svakoj Qubit™ assay tubici iznosi 200 µl;
4. Sve tubice su potom kratko vorteksovane i inkubirane 2 minuta na sobnoj temperaturi;
5. Napravljena je standardna kriva merenjem fluorescence, odnosno koncentracije Standarda 1 i Standarda 2 na aparatu Qubit® 3.0 Fluorometer (*Invitrogen, SAD*);
6. Koncentracije uzoraka su izmerene na aparatu Qubit® 3.0 Fluorometer (*Invitrogen, SAD*) i izražene u ng/µl.

3.2.2 Lančana reakcija polimerizacije – PCR

Metoda lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) bazira se na procesu replikacije molekula DNK i predstavlja *in vitro* amplifikaciju određenog regiona DNK, odnosno regiona od interesa (Mullis et al., 1986). Željeni region DNK za amplifikaciju ograničava se upotrebom specifičnih suprotno orjentisanih jednolančanih oligonukleotidnih sekvenci - uzvodni i nizvodni prajmer, koji hibridizuju sa komplementarnim regionom DNK molekula. Pored molekula DNK, za uspešno izvođenje PCR reakcije neophodni su: nukleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), joni magnezijuma, pufer, aditivi i *Taq* polimeraza koja katalizuje ceo proces sinteze DNK. PCR reakcija se odvija u ponovljenim ciklusima koji se sastoje od denaturacije DNK molekula, hibridizacije prajmera sa DNK (eng. *annealing*) i ekstenzije. Broj ponovljenih ciklusa je 25-40 pri čemu u svakom ciklusu dolazi do povećanja broja kopija amplifikovanog fragmenta od interesa. Po završetku poslednjeg ciklusa sledi korak finalne elongacije u kome dolazi do kompletiranja delimično sintetisanih produkata.

Od otkrića PCR-a pa do danas razvijene su i brojne modifikacije ove metode koje omogućavaju da se PCR upotrebi u specifične svrhe. U ovom istraživanju korišćene su tri varijante PCR-a: fluorescentni PCR, *repeat-primed* PCR i *small-pool* PCR.

3.2.2.1 Fluorescentni PCR

Fluorescentni PCR je adaptacija klasične PCR metode gde se u cilju dobijanja fluorescentno obeleženih PCR produkata koristi jedan prajmer koji je na svom 5' kraju obeležen odgovarajućom fluorescentnom bojom. Ovom modifikacijom se omogućava analiza dužina PCR produkata kapilarnom elektroforezom kojom se vrši razdvajanje fragmenata sa rezolucijom od 1 bp.

Fluorescentni PCR je korišćen za umnožavanje segmenta gena *C9orf72* koji sadrži GGGGCC ponovke. Određivanjem dužine ovog fragmenta, koje se u sledećem koraku vrši

kapilarnom elektroforezom (Poglavlje 3.2.3), određuje se broj GGGGCC ponovaka u genu *C9orf72*. Ovim pristupom moguće je detektovati samo prisustvo neekspandovanih alela veličine do oko 30 GGGGCC ponovaka.

Prajmeri su dizajnirani uz pomoć slobodno dostupnog softvera Primer3 web verzija 4.0.0, <https://primer3.ut.ee> (Koressaar and Remm, 2007, Untergasser et al., 2012). Sekvence prajmera date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Sekvenca oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju nekodirajućeg segmenta gena *C9orf72* koji sadrži GGGGCC ponovke.

| Oznaka prajmera | Sekvenca prajmera |
|-----------------|---------------------------------------|
| C9 F | FAM-5'-GAAACAACCGCAGCCTGTAG-3' |
| C9 R | 5'-GCCTCCTCACTCACCCACT-3' |

F - uzvodni prajmer; R - nizvodni prajmer; FAM - fluorescentna boja

Pripremanje PCR reakcije smeše vršeno je u mikrotubama zapremine 0,2 ml ili u PCR plejtovima sa 96 mesta (*96 PCR Plate without skirt*, Sarstedt, Velika Britanija). PCR reakciona smeša pripremana je na ledu i komponente koje ulaze u njen sastav, osim polimeraze, pre upotrebe su kratko vorteksovane i centrifugirane. Pošto je u toku izvođenja eksperimentalnog dela ove disertacije došlo do prestanka proizvodnje polimeraze koja je korišćena za pripremu reakcione smeše, umesto prvobitnog protokola (Protokol 1), optimizovan je novi protokol (Protokol 2) gde su korišćeni pufer i polimeraza drugog proizvođača. Sastav reakcione smeše sa finalnim koncentracijama komponenti za Protokol 1 dat je u Tabeli 2, dok je sastav reakcione smeše sa finalnim koncentracijama komponenti za Protokol 2 dat u Tabeli 3.

Tabela 2. Sastav PCR reakcione smeše za Protokol 1 i finalna koncentracija komponenti

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|--|------------------------|
| 10x Long PCR buffer sa 15 mM MgCl ₂ * | 1x |
| 10 mM dNTPs | 0,2 mM svaki nukleotid |
| C9 F | 0,4 pmol/μl |
| C9 R | 0,4 pmol/μl |
| DMSO** | 10% (v/v) |
| Long PCR Enzyme Mix (5U/μl) | 0,5 U |
| DNK | 1-3 ng |
| Dejonizovana voda | Do 10 μl |
| Ukupna zapremina | 10 μl |

*10x Long PCR buffer sa 15 mM MgCl₂ (*Thermo Scientific, SAD*)

**DMSO (eng. *Dimethylsulfoxide (Thermo Scientific, SAD)*)

Tabela 3. Sastav PCR reakcione smeše za Protokol 2 i finalna koncentracija komponenti

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|--|------------------------|
| 2x Xtreme Buffer | 1x |
| 2 mM dNTPs | 0,4 mM svaki nukleotid |
| C9 F | 0,1 pmol/μl |
| C9 R | 0,1 pmol/μl |
| 5 mM 7-deaza dGTP* | 0,4 mM |
| KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase** | 0,2 U |
| DNK | 20-30 ng |
| Dejonizovana voda | Do 10 μl |
| Ukupna zapremina | 10 μl |

* 7-deaza dGTP (eng. *7-Deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (Sigma-Aldrich, SAD)*)

**KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (1 U/μl in 50 mM Tris-HCl, 1mM DTT,

0,1 mM EDTA, 50% glycerol, 0,001% Nonidet P-40, 0,001%, Tween® 20, pH 8.0)(*Toyobo, Japan*)

PCR amplifikacija izvođena je u Veriti® Thermal Cyler (*Applied Biosystems, SAD*) ili ProFlex PCR system (*Applied Biosystems, SAD*) aparatima. Za oba protokola korišćen je *Touchdown* PCR program (TD PCR). Specifičnost TD PCR programa ogleđa se u višoj inicijalnoj temperaturi hibridizacije nego što je temperatura topljenja (T_m) korišćenih prajmera, čime se povećava specifičnost reakcije. Zatim se u narednim ciklusima (10-15 ciklusa) temperatura reakcije u svakom narednom ciklusu snižava i na taj način se dostiže optimalna temperatura hibridizacije (Korbie and Mattick, 2008). Temperaturni profil PCR amplifikacije za Protokol 1 i Protokol 2 prikazani su u Tabeli 4 i 5, redom.

Tabela 4. Temperaturni profil PCR amplifikacije za Protokol 1

| | | |
|-------------------------|------------------|-------------------------------|
| Inicijalna denaturacija | 94°C 5 minuta | 1 ciklus |
| Denaturacija | 94°C 30 sekundi | 10 ciklusa |
| Hibridizacija | 60°C 30 sekundi | |
| Elongacija | 72°C 45 sekundi | |
| Denaturacija | 94°C 30 sekundi | 20 ciklusa |
| Hibridizacija | 60°C 30 sekundi* | |
| Elongacija | 72°C 1 minut | |
| Denaturacija | 94°C 30 sekundi | 10 ciklusa |
| Hibridizacija | 50°C 30 sekundi | |
| Elongacija | 72°C 45 sekundi | |
| Finalna elongacija | 60°C 60 minuta | 1 ciklus |
| Hlađenje | +4°C | Do vađenja uzoraka iz aparata |

* temperatura hibridizacije se snižava za 0,5°C u svakom narednom ciklusu do postizanja 50 °C

Tabela 5. Temperaturni profil PCR reakcije za Protokol 2

| | | |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Inicijalna denaturacija | 94°C 2 minuta | 1 ciklus |
| Denaturacija | 98°C 30 sekundi | 10 ciklusa |
| Hibridizacija | 60°C 30 sekundi ** | |
| Elongacija | 72°C 45 sekundi | |
| Denaturacija | 98°C 15 sekundi | 20 ciklusa |
| Hibridizacija | 60°C 30 sekundi*** | |
| Elongacija | 72°C 45 sekundi | |
| Denaturacija | 98°C 15 sekundi | 10 ciklusa |
| Hibridizacija | 50°C 30 sekundi** | |
| Elongacija | 72°C 45 sekundi | |
| Finalna elongacija | 72°C 5 minuta | 1 ciklus |
| Hlađenje | +4°C | Do vađenja uzoraka iz aparata |

* temperatura hibridizacije se snižava za 0,5°C u svakom narednom ciklusu do postizanja 50 °C

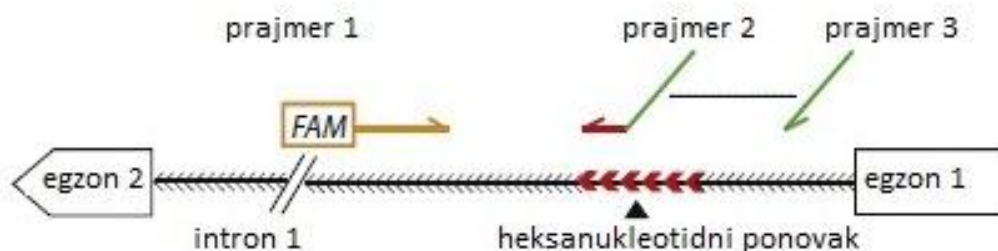
** Ramp Rate aparata je podešen na 50%

Nakon završene PCR reakcije uzorci su čuvani na +4°C do dalje analize.

3.2.2.2 Repeat-primed PCR

Repeat-primed PCR metoda (RP-PCR) bazirana je na upotrebi tri prajmera od kojih je jedan fluorescentno obeležen i specifičan za dati lokus. Drugi prajmer sadrži sekvencu komplementarnu samim ponovcima od interesa i dodatnu sekvencu koja nije homologa sa sekvencom u humanom genomu i za koju će se vezati treći prajmer. Uloga drugog prajmera je da hibridizuje na više mesta u samom nizu ponovaka, dok je uloga trećeg prajmera da, u kombinaciji sa prvim prajmerom,

omogućiti specifičnu amplifikaciju produkata prva dva prajmera. Treći prajmer se često označava kao sidro (eng. *anchor*) ili repić (eng. *tail*), (Slika 3).



Slika 3. Grafički prikaz vezivanja prajmera prilikom *repeat-primed* PCR analize. Prilagođeno prema Renton et. al, 2011.

Ovaj metod je inicijalno razvijen od strane Warnera i saradnika za detekciju ekspanovanih alela u miotoničnoj distrofiji tip1 i nazvan je *triplet repeat-primed* PCR (Warner et al., 1996). Primena ove metode je kasnije proširena i na druge bolesti nestabilnih ponovaka, pa metoda dobija naziv *repeat-primed* PCR. Primenom *repeat-primed* PCR-a dobijeni fragmenti razdvojeni kapilarnom elektroforezom, u slučaju prisustva ekspanzije ponovaka, daju karakterističan dugačak testerast signal sastavljen od niza signala opadajućeg intenziteta sa međusobnom razlikom od onoliko baznih parova kolika je veličina samog ponovka. Na ovaj način je omogućena brza detekcija velikih ekspanovanih alela koji inače ne bi mogli biti amplifikovani standardnom PCR metodom.

RP-PCR je korišćen za umnožavanje segmenta gena *C9orf72* koji sadrži GGGGCC ponovke kod bolesnika kod kojih je fluorescentnim PCR-om pokazano prisustvo samo jednog alela normalne veličine (aleli do 30 GGGGCC ponovaka). Ovim se utvrđuje da li alel detektovan fluorescentnim PCR-om predstavlja dva alela iste veličine (bolesnik je homozigot za normalne alele), ili je kod datog bolesnika prisutan i ekspanovani alel koji ima preko 30 ponovaka i nije mogao biti amplifikovan standardnim PCR-om. RP-PCR metodom je moguće utvrditi prisustvo ekspanzije, ali ne i utvrditi njenu veličinu.

RP-PCR metoda za određivanje broja GGGGCC ponovaka rađena je na dva načina, odnosno upotrebom dva različita seta prajmera da bi se izbegla mogućnost dobijanja lažno negativnih rezultata po preporuci Rolinsona i saradnika (Rollinson et al., 2015). Shodno tome, RP-PCR analiza je rađena prema dva protokola: Protokol 3 koji je uključivao upotrebu prajmera objavljenih u Renton i saradnici, 2011 i Protokol 4 koji je uključivao upotrebu prajmera objavljenih u DeJesus-Hernandez i saradnici, 2011. Kako je i za Protokol 3 korišćena polimeraza kojoj je u međuvremenu obustavljena proizvodnja, deo uzoraka analiziran je prema Protokolu 3a gde su korišćeni pufer i polimeraza drugog proizvođača. Sekvenca prajmera korišćenih u Protokolu 3 i 3a prikazana je u Tabeli 6, dok je sekvenca prajmera korišćenih u Protokolu 4 prikazana u Tabeli 7.

Tabela 6. Sekvenca oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju GGGGCC ponovaka u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* metodom RP-PCR korišćenih u Protokolu 3 i 3a. Sekvence prajmera su preuzete iz Renton i saradnici, 2011

| Oznaka prajmera | Sekvenca prajmera |
|---------------------|---|
| C9orf72exp F | 6-FAM-AGTCGCTAGAGGCGAAAGC |
| C9orf72 R | 5'- TACGCATCCCAGTTTGAGACGGGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGG-3' |
| C9orf72 A | 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG -3' |

F - uzvodni prajmer; R - nizvodni prajmer; A - anchor prajmer; 6-FAM – fluorescentna boja

Tabela 7. Sekvenca oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju GGGGCC ponovaka u nekodirajućem regionu gena *C9orf72* metodom RP-PCR korišćenih u Protokolu 4. Sekvence prajmera su preuzete iz DeJesus-Hernandez i saradnici, 2011

| Oznaka prajmera | Sekvenca prajmera |
|-----------------|--|
| MRX-F | NED-TGTAACAACGACGGCCAGTCAAGGA GGGAAACAACCGCAGCC |
| MRX-M13R | CAGGAAACAGCTATGACC |
| MRX-R1 | CAGGAAACAGCTATGACCGGGCCCGCCC CGACCACGCCCCGGCCCCGGCCCCGG |

F - uzvodni prajmer; R1 - nizvodni prajmer; R - anchor prajmer; NED – fluorescentna boja

Priprema reakcione smeše za RP-PCR vršena je na ledu u odgovarajućim mikrotubama zapremine 0,2 ml ili u PCR plejtovima sa 96 mesta (*96 PCR Plate without skirt*, Sarstedt, Velika Britanija). Sve komponente koje ulaze u sastav RP-PCR reakcione smeše, osim polimeraze, pre upotrebe su kratko vorteksovane i centrifugirane. PCR amplifikacija izvođena je u Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD) ili ProFlex PCR system (*Applied Biosystems*, SAD) aparatima prema odgovarajućim temperaturnim profilima. Sastavi RP-PCR reakcionih smeša sa finalnim koncentracijama komponenti za Protokol 3, 3a i 4 prikazan su u Tabeli 8, 9 i 10, redom, a njihovi odgovarajući temperaturni profili u Tabeli 11, 12 i 13, redom.

Tabela 8. Sastav RP-PCR reakcione smeše za Protokol 3 i finalna koncentracija komponenti

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|--|------------------------|
| 10x Long PCR buffer sa 15 mM MgCl ₂ * | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 0,75 mM |
| 10 mM dNTPs | 0,2 mM svaki nukleotid |
| C9orf72exp F | 1,4 pmol/μl |
| C9orf72 R | 0,7 pmol/μl |
| C9orf72 A | 0,7 pmol/μl |
| DMSO** | 10% (v/v) |
| 5M Betain*** | 0,5 M |
| Long PCR Enzyme Mix (5U/μl) | 2,5 U |
| DNK | 1-3 ng |
| Dejonizovana voda | Do 10 μl |
| Ukupna zapremina | 10 μl |

*10x Long PCR buffer sa 15 mM MgCl₂ (*Thermo Scientific*, SAD)

**DMSO (eng. *Dimethylsulfoxide* (*Thermo Scientific*, SAD))

*** Betain (*Serva*, Nemačka)

Tabela 9. Sastav RP-PCR reakcione smeše za Protokol 3a i finalna koncentracija komponenti

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|--|-----------------------------|
| 2x Xtreme Buffer | 1x |
| 2 mM dNTPs | 0,4 mM svaki nukleotid |
| C9orf72exp F | 0,3 pmol/ μ l |
| C9orf72 R | 0,15 pmol/ μ l |
| C9orf72 A | 0,3 pmol/ μ l |
| 5 mM 7-deaza dGTP* | 0,4 mM |
| KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase** | 0,2 U |
| DNK | 20-30 ng |
| Dejonizovana voda | Do 10 μ l |
| Ukupna zapremina | 10 μl |

* 7-deaza dGTP (eng. *7-Deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (Sigma-Aldrich, SAD)*)

**KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (1 U/ μ l in 50 mM Tris-HCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% glycerol, 0,001% Nonidet P-40, 0,001%, Tween® 20, pH 8.0)(*Toyobo, Japan*)

Tabela 10. Sastav RP-PCR reakcione smeše za Protokol 4 i finalna koncentracija komponenti

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|--|-----------------------------|
| 2x Xtreme Buffer | 1x |
| 2 mM dNTPs | 0,4 mM svaki nukleotid |
| MRX-F | 0,3 pmol/ μ l |
| MRX-R1 | 0,15 pmol/ μ l |
| MRX-M13R | 0,3 pmol/ μ l |
| DMSO* | 10% (v/v) |
| KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase** | 0,2 U |
| DNK | 20-30 ng |
| Dejonizovana voda | Do 10 μ l |
| Ukupna zapremina | 10 μl |

*DMSO (eng. *Dimethylsulfoxide(Thermo Scientific, SAD)*)

**KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase (1 U/ μ l in 50 mM Tris-HCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% glycerol, 0,001% Nonidet P-40, 0,001%, Tween® 20, pH 8.0) (*Toyobo, Japan*)

Tabela 11. Temperaturni profil RP-PCR reakcije za Protokol 3

| | | |
|-------------------------|-------------------|------------------------------|
| Inicijalna denaturacija | 95°C 5 minuta | 1 ciklus |
| Denaturacija | 95°C 1 minut | 14 ciklusa |
| Hibridizacija | 70°C 30 sekundi * | |
| Elongacija | 72°C 4 minuta | |
| Denaturacija | 95°C 1 minut | 22 ciklusa |
| Hibridizacija | 56°C 30 sekundi | |
| Elongacija | 72°C 4 minuta | |
| Finalna elongacija | 60°C 15 minuta | 1 ciklus |
| Hlađenje | +4°C | Do vađenja uzorka iz aparata |

* temperatura hibridizacije se snižava za 1°C u svakom narednom ciklusu

Tabela 12. Temperaturni profil RP-PCR reakcije za Protokol 3a

| | | |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Inicijalna denaturacija | 94°C 2 minuta | 1 ciklus |
| Denaturacija | 98°C 30 sekundi | 5 ciklusa |
| Hibridizacija | 70°C 15 sekundi* ** | |
| Elongacija | 72°C 3 minuta | |
| Denaturacija | 98°C 15 sekundi | 40 ciklusa |
| Hibridizacija | 61°C 15 sekundi** | |
| Elongacija | 72°C 3 minuta | |
| Finalna elongacija | 72°C 1 minut | 1 ciklus |
| Hlađenje | +4°C | Do vađenja uzoraka iz aparata |

* Temperatura hibridizacije se snižava za 1°C u svakom narednom ciklusu

** Ramp Rate je 5%

Tabela 13. Temperaturni profil RP-PCR reakcije za Protokol 4

| | | |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Inicijalna denaturacija | 94°C 2 minuta | 1 ciklus |
| Denaturacija | 98°C 30 sekundi | 14 ciklusa |
| Hibridizacija | 67°C 1 minut* | |
| Elongacija | 72°C 3 minuta | |
| Denaturacija | 98°C 15 sekundi | 22 ciklusa |
| Hibridizacija | 53°C 1 minut | |
| Elongacija | 72°C 3 minuta** | |
| Finalna elongacija | 72°C 1 minut | 1 ciklus |
| Hlađenje | +4°C | Do vađenja uzoraka iz aparata |

* Temperatura hibridizacije se snižava za 1°C u svakom narednom ciklusu

** Dužina elongacije se produžava za po 10 sekundi u svakom narednom ciklusu

Nakon završene PCR reakcije uzorci su čuvani na +4°C do dalje analize.

3.2.2.3 Small-pool PCR

Small-pool PCR metoda (SP-PCR) podrazumeva korišćenje vrlo malih količina (pool-ova) DNK za amplifikaciju (Jeffreys et al., 1994, Gomes-Pereira et al., 2004). U tu svrhu koristi se genomska DNK koja je prethodno tretirana odgovarajućim restrikcionim enzimom. Od digerirane DNK koriste se razblaženja tj. mali pool-ovi DNK čija je koncentracija 3-600 pg odnosno 1-200 haploidnih genomskih ekvivalenata (Gomes-Pereira et al., 2004). Kako se za amplifikaciju koristi mala količina DNK, prilikom umnožavanja neće doći do favorizovanja ampilfikacije kratkih „*wild-type*“ alela u odnosu na dugačke mutirane alele. U cilju vizuelizacije i određivanja veličine, SP-PCR produkti se zatim razdvajaju elektroforezom na agaroznom gelu i detektuju *Southern blot* hibridizacijom pod odgovarajućim uslovima. Metod *Southern blot* hibridizacije opisan je u Poglavlju 3.2.5.

SP-PCR metoda rađena je kod bolesnika kod kojih je metodom RP-PCR pokazano prisustvo patološkog alela sa ekspanzijom od preko 30 GGGGCC ponovaka u cilju potvrde prisustva ekspanzije i određivanja opsega dobijenih veličina. Pre pripreme SP-PCR reakcije, svi uzorci DNK su digerirani prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4. Prajmeri korišćeni za SP-PCR reakciju

su dati u Tabeli 1. Komponente koje ulaze u sastav SP-PCR reakcione smeše, osim polimeraze, pre upotrebe su vorteksovane i kratko centrifugirane a njihov sastav i finalne koncentracije prikazane su u Tabeli 14. Priprema SP-PCR reakcione smeše vršena je na ledu u mikrotubama zapremine 0,2 ml. PCR amplifikacija vršena je u ProFlex PCR system (Applied Biosystems, SAD) aparatu prema odgovarajućem temperaturnom profilu (Tabela 15).

Tabela 14. Sastav SP-PCR reakcione smeše i finalna koncentracija komponenti

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije komponenti |
|--|----------------------------------|
| 10x Long PCR buffer sa 15 mM MgCl ₂ * | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 1 mM |
| 10 mM dNTPs | 0,2 mM svaki nukleotid |
| C9 F | 0,4 pmol/μl |
| C9 R | 0,4 pmol/μl |
| DMSO ** | 10% (v/v) |
| Q Solution *** | 1x |
| Long PCR Enzyme Mix | 0,6 U |
| DNK | 100 pg – 1,8 ng |
| Dejonizovana voda | Do 10 μl |
| Ukupna zapremina | 10 μl |

*10x Long PCR buffer sa 15 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, SAD)

**DMSO (eng. Dimethylsulfoxide(Thermo Scientific, SAD))

*** 5x Q Solution (QIAGEN, Nemačka)

Tabela 15. Temperturni profil SP-PCR reakcije

| | | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Inicijalna denaturacija | 94°C 12 minuta | 1 ciklus |
| Denaturacija | 95°C 1 minut 20 sekundi | 10 ciklusa |
| Hibridizacija | 60°C 45 sekundi * | |
| Elongacija | 68°C 4 minuta | |
| Denaturacija | 95°C 1 minut 20 sekundi | 22 ciklusa |
| Hibridizacija | 50°C 45 sekundi | |
| Elongacija | 68°C 4 minuta** | |
| Finalna elongacija | 68°C 10 minuta | 1 ciklus |
| Hlađenje | +4°C | Do vađenja uzoraka iz aparata |

* Temperatura hibridizacije se snižava za 1°C u svakom narednom ciklusu

** Dužina elongacije se produžava za po 15 sekundi u svakom narednom ciklusu

Po završenju SP-PCR amplifikaciji SP-PCR produkti su čuvani na +4°C do dalje analize Southern blot metodom.

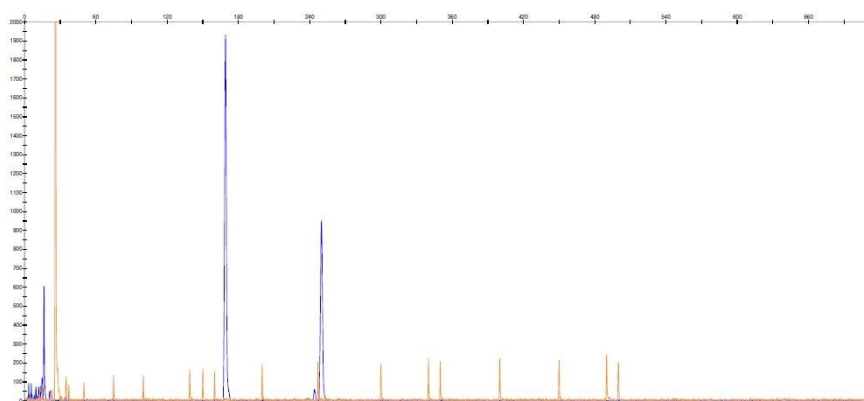
3.2.3 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je metoda koja se zasniva na principu klasičnih gel elektroforeza gde se proces elektroforeze vrši kroz veoma tanke kapilare ispunjene polimerom koji obavlja ulogu gela i na ovaj način se mogu razdvojiti fragmenti sa razlikom u dužini za samo jedan bazni par. Čitav proces kapilarne elektroforeze je automatizovan i vrši se na aparatu koji se naziva automatski DNK sekvenator. Procesom elektroforeze fragmenti se razdvajaju po dužini pri čemu kraći fragmenti putuju brže kroz kapilaru. Kako su fragmenti koji putuju obeleženi fluorescentnim bojama, u delu kapilare koji je predviđen za detekciju, boja biva ekscitovana pod dejstvom laserskog zraka i emituje svetlost određene talasne dužine specifične za tu boju. Svetlost koja se emituje biva detektovana CCD kamerom (eng. charge-coupled device - CCD), i dobijeni podaci se automatski obrađuju uz pomoć softvera.

Ova metoda se koristi za određivanje tačnog redosleda nukleotida neke sekvence (DNK sekvenciranje) kao i za fragmentnu analizu prilikom koje se određuje tačna dužina analiziranog fragmenta.

3.2.3.1 Fragmentna analiza

Za izvođenje fragmentne analize neophodni su PCR produkti koji su na jednom kraju obeleženi fluorescentnom bojom. Fluorescentno obeleženi PCR produkti se zatim mešaju sa standardom za veličine fragmenata, markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina, takođe obeležene odgovarajućom fluorescentnom bojom (različitom od one kojim je obeležen fragment čija se dužina određuje). Nakon toga, celokupna smeša se razdvaja kapilarnom elektroforezom, pri čemu instrument detektuje redosled pojavljivanja fluorescentnih signala. Nakon obrade podataka dobija se elektroferogram (Slika 4) na osnovu koga se dodatnom softverskom analizom, odnosno poređenjem analiziranih fragmenata sa standardom, određuje veličina analiziranog fragmenta.



Slika 4. Primer elektroferograma dobijenog nakon fragmentne analize. Narandžastom bojom su prikazane veličine markera dok plava boja označava veličine analiziranog fragmenta.

Fragmentna analiza je vršena za PCR produkte fluorescentnog i *repeat-primed* PCR-a. U prvom slučaju utvrđivane su veličine normalnih *C9orf72* alela, a u drugom je detektovano prisustvo ekspanzija. Fragmentna analiza svih uzoraka vršena je na aparatu ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (*Life Technologies*, SAD). Dužina kapilare korišćene za kapilarnu elektroforezu je 50 cm, a tip polimera je POP7 (Performance Optimized Polymer-POP-7™, Applied Biosystems, SAD). Proces elektroforeze kontrolisan je uz pomoć 3500 Data Collection softvera (*Applied Biosystems*, SAD).

PCR produkti su pripremani za fragmentnu analizu prema sledećoj proceduri:

1. U plejt sa 96 bunarića (*96 PCR Plate half skirt*, Sarstedt, Velika Britanija) naliveno je po 10 µl Hi-Di formamida (*Applied Biosystems*, SAD) i 0,4 µl standarda za dužinu GeneScan™-500 LIZ (*Applied Biosystems*, SAD);
2. U odgovarajući bunarić naliveno je 1 µl PCR produkta dobijenog fluorescentnim PCR-om, koji je prethodno razblažen 2x u dejonizovanoj vodi, odnosno 2 µl koncentrovanog produkta dobijenog RP-PCR-om;
3. Plejt je potom denaturisan 3 minuta na 95°C u Veriti® Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD), a zatim čuvan na +4°C do analize na automatskom sekvenatoru.

Parametri pod kojima je vršena kapilarna elektroforeza dati su u Tabeli 16.

Tabela 16. Uslovi elektroforeze za fragmentnu analizu fluorescentnog i *repeat-primed* PCR-a

| Parametar | Fluorescentni PCR | RP-PCR |
|-----------------------------|-------------------|---------|
| Temperatura rene | 60 °C | 60 °C |
| Trajanje elektroforeze | 1330 s | 1330 s |
| Voltaža elektroforeze | 19,5 kV | 19,5 kV |
| Vreme injektiranja uzorka | 2 s | 8 s |
| Voltaža injektiranja uzorka | 1 kV | 1,6 kV |

Dobijeni rezultati obrađeni su upotrebom softvera GeneMapper™ verzija 4.1 (*Applied Biosystems*, SAD).

3.2.4 Digestija genomske DNK restrikcionim enzimom

Genomska DNK korišćena za digestiju dobijena je modifikovanom metodom izolovanja opisanom u Poglavlju 3.2.1.2. Koncentracija dobijene DNK određena je fluorometrijskom metodom (Poglavlje 3.2.1.3) a zatim je urađena digestija restrikcionim enzimom *EcoRI* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD). *EcoRI* restrikcioni enzim genomsku DNK seče na pozicijama 5'G[^]AATTC 3' i na taj način ne utiče na sekvencu GGGGCC ponovaka. Proces digestije vršen je na ledu u mikrotubama zapremine 1,5 ml a sastav smeše za digestiju sa finalnim koncentracijama prikazan je u Tabeli 17. Restrikciona digestija vršena je za sve uzorke za koje je bilo neophodno analizirati *small-pool* PCR-om, odnosno Southern Blot-om.

Tabela 17. Sastav reakcione smeše za digestiju sa finalnim koncentracijama

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|----------------------------|-----------------------|
| 10X Buffer <i>EcoRI</i> * | 1x |
| <i>EcoRI</i> (10U/ul)** | 80 U |
| DNK | Ukupno 200 ng |
| Dejonizovana voda | Do 40 µl |
| Ukupna zapremina | 40 µl |

*1X Buffer *EcoRI* (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA)

** *EcoRI* (10 mM potassium phosphate (pH 7.4 at 25°C), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, 0.15% Triton X-100 and 50% glycerol)

Digestija i priprema uzoraka za *small-pool* PCR vršena je prema sledećem protokolu:

1. Dobijena smeša prikazana u Tabeli 17. inkubirana je u vodenom kupatilu 16h na 37 °C;
2. Nakon inkubacije enzim je inaktivisan stavljanjem mikrotube sa smešom na 65 °C u trajanju od 20 minuta;
3. Po završetku inaktivacije enzima uzorci su kvantifikovani fluorometrijskom metodom (Poglavlje 3.2.1.3);
4. Na osnovu određenih koncentracija digestija napravljena su odgovarajuća razblaženja DNK 100-1000 pg/µl. Za uzorke kojima nije bilo moguće odrediti koncentraciju jer je bila ispod vrednosti koju je moguće kvantifikovati Qubit™ dsDNA BR Assay-om (Invitrogen, SAD) DNK je 5x razblažena;
5. Digestije DNK i odgovarajuća razblaženja su čuvani na -20 °C do dalje analize.

3.2.5 Southern blot hibridizacija za detekciju produkata SP-PCR-a

Southern blot hibridizacija je metod koji podrazumeva prenošenje DNK fragmenata sa (agaroznog) gela na membranu, njihovu hibridizaciju sa obeleženom probom i vizuelizaciju hibridizovanih fragmenata. U konkretnom slučaju neophodna je za vizuelizaciju jako male količine SP-PCR produkata.

3.2.5.1 Agarozna gel elektroforeza

SP-PCR produkti razdvojeni su po veličini primenom gel elektroforeze na 1,2% agaroznom gelu. Priprema agaroznog gela i gel elektroforeza uključivala je sledeće korake:

1. U odgovarajućem erlenmajeru naliveno je 180 ml 1xTBE pufera (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.0) i u njega je dodato 2,16 g agaroze (*Serva*, Nemačka) i zagrejano do ključanja;
2. U zagrejani gel dodato je 9 µl Midori green boje (*Nippon Genetics*, Nemačka) i smeša je blago ohlađena pod mlazom vode na ~50 °C;
3. Tako prohladeni gel izliven je u kadicu za elektroforezu dužine 20 cm i ostavljen da polimerizuje u mraku na sobnoj temperaturi;
4. Nakon završene polimerizacije kadica sa gelom je prebačena u sistem za elektroforezu HE 99X MAX Horizontal Submarine (*GE Healthcare Bio-Sciences Corp.*, SAD) u kojoj se nalazio 1xTBE pufer;
5. U odgovarajuće bunariće na gelu naliveno je po 10 µl SP-PCR produkta koji je pomešan sa bojom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenolplavo (w/v); 50% glicerol (v/v); 1 mM EDTA) radi lakšeg praćenja procesa elektroforeze;
6. Na gel je takođe naliveno 7 µl neobeležnog 1 kilobaznog DNK standarda za veličinu (1 kb DNA Ladder, *Fermentas*, SAD) kao i 1,5 µl DNK standarda za veličinu (DNA Molecular Weight Marker X, *Roche*, Nemačka) koji je na 3' kraju obeležen sa DIG-11-ddUTP-om (*Roche*, Nemačka);
7. Proces elektroforeze odvijao se na konstantnom naponu od 32 V u trajanju od 19h.

3.2.5.2 Prebacivanje PCR produkata sa agaroznog gela na membranu (reverzni kapilarni transfer)

Nakon završenog procesa elektroforeze gel je prebačen na odgovarajuću foliju sa bunarićima okrenutim ka gore i njegova dalja obrada uključivala je sledeće korake:

1. Gel postavljen na foliji isečen je na dimenzije 19,5 x 14,4 cm pri čemu je gornji levi ugao koso zasečen radi lakše orijentacije gornje i donje strane gela;
2. Gornjom stranom okrenutom ka gore gel je prebačen u kadicu u kojoj se nalazio rastvor za denaturaciju (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), kadica je prebačena na roker STUART™ SSL4 (*Cole-Palmer™ STUART™*, UK) i blago ljuljana 2 puta po 25 minuta;
3. Nakon završene denaturacije vršeno je ispiranje gela 3 puta po 1 minut u dejonizovanoj vodi;
4. U kadicu sa gelom naliven je rastvor za neutralizaciju (1,5 M NaCl; 1 M Tris-HCl pH 7,4) i gel je blago ljuljan 2 puta po 25 minuta na rokeru;
5. Gel je prebačen u novu kadicu u kojoj se nalazio 10xSSC pufer (1,5 M NaCl; 0,3 M Na-citrat pH 7) i vršeno je ekvilibrisanje gela u trajanju od 10 minuta;
6. Aparatura za reverzni kapilarni transfer je pripremljena tako što je na staklenu ploču odozdo na gore postavljen deblji sloj celuloznog Whatman™ papira (*Whatman™ 3MM CHR Sheets*) (*GE Healthcare*, UK), preko njega deblji sloj filter papira tip 751/75/20 (*MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG*, Nemačka). Preko papira postavljena je pozitivno naelektrisana najlonska membrana Amersham™ Hybond™ -N+ (*GE Healthcare*, UK) isečena 19,6 x 14,5 cm zasečena koso u gornjem levom uglu. Na membranu je postavljen gel a preko njega jedan Whatman™ 3MM CHR Sheets (*GE Healthcare*, UK) papir za kapilarni transfer koji je na oba kraja uronjen u kadice u kojima se nalazio 10xSSC pufer za transfer (1,5 M NaCl; 0,3 M Na-citrat pH 7).
7. Pomoću staklenog štapića istisnuti su mehurići vazduha između papira za kapilarni transfer i gela, a na površinu papira za kapilarni transfer stavljena je folija veličine gela;

8. Transfer je ostavljen preko noći na sobnoj temperaturi da bi se kapilarnim silama SP-PCR produkti prebacili sa agaroznog gela na pozitivno naelektrisanu najlonsku membranu;
9. Nakon završenog kapilarnog transfera predačeni fragmenti DNK su kovalentno vezani za membranu izlaganjem UV svetlu 2 puta po 5 minuta sa obe strane u transiluminatoru E-BOX VX5 (*Vilber Lourmat*, Francuska) pri talasnoj dužini od 312 nm nakon čega je membrana isprana od viška soli u dejonizovanoj vodi.
10. Aparatura za kapilarni transfer je rastavljena a papiri su isprani više puta u dejonizovanoj vodi i ostavljeni da se suše na vazduhu radi ponovne upotrebe;
11. Nakon kroslinkovanja membrana je odmah korišćena za hibridizaciju.

3.2.5.3 Hibridizacija

1. Membrana je prebačena u tubu za hibridizaciju nakon čega je prelivena puferom za prehibridizaciju (5xSSC; 0,1 (v/v) N-Lauroylsarcosine-Na so; 0,02% SDS; 1% (w/v) bloking reagensa) koji je prethodno čuvan na + 4 °C. Proces prehibridizacije odvijao se 2h na 65 stepeni okretanjem tube u aparatu za hibridizaciju *Techne Hybridiser HB-1D (Techne, SAD)*;
2. Rastvor za hibridizaciju (5xSSC; 0,1 (v/v) N-Lauroylsarcosine-Na so; 0,02% SDS; 1% (w/v) bloking reagensa; 3-5 pmola probe (CCCCGG)₄-3' DIG-11-ddUTP) pre upotrebe je inkubiran 10 minuta na 100 °C nakon čega je prebačen u posudu sa ledom;
3. Nakon završene prehibridizacije rastvor je vraćen u odgovarajuću tubu i ostavljen na +4 °C radi ponovne upotrebe, a tuba sa membranom prelivena je rastvorom za hibridizaciju;
4. Proces hibridizacije membrane sa (CCCCGG)₄-3' DIG-11-ddUTP probom vršen je na 65 °C u trajanju od 2h okretanjem tube u aparatu za hibridizaciju;
5. Po završetku hibridizacije rastvor je vraćen u odgovarajuću tubu i ostavljen na -20 °C radi ponovne upotrebe;
6. Membrana je prebačena u kadicu, prelivena sa 2x puferom za ispiranje (eng. *2x Washing buffer*) (2x SSC; 0,1% (w/v) SDS) i postavljena na roker na blago ljuljanje 2 puta po 10 minuta;
7. Nakon ispiranja sa 2x puferom za ispiranje membrana je prebačena u tubu za ispiranje i prelivena sa 0,1x puferom za ispiranje (eng. *0,1x Washing buffer*) (0,1xSSC; 0,1% (w/v) SDS)) koji je prethodno zagrejan u aparatu za hibridizaciju na 65 °C i ispirana je 2 puta po 20 minuta na 65 °C.

3.2.5.4 Hemiluminiscentna detekcija

1. Membrana je prebačena u kadicu u kojoj se nalazio pufer maleinske kiseline (eng. *Maleic acid buffer*, 0,1 M Maleic acid; 0,15 M NaCl pH 7,5) i postavljena 1 minut na roker;
2. Zatim je membrana ljuljana na rokeru 45 minuta u reagensu za blokiranje (eng. *Blocking reagent*; 2% (w/v) nemasno mleko u prahu u maleinskoj kiselini);
3. U reagensu za blokiranje rastvoreno je Anti-digoksinogenin-AP (Anti-DIG-AP) (*Roche*, Nemačka) u razmeri 20000:1. Membrana je prebačena u rastvor i ljuljana na rokeru 30 minuta;
4. Membrana je prebačena u novu kadicu u kojoj se nalazio pufer za ispiranje sa TWEEN-om (eng. *Washing buffer + TWEEN 20*; 0,3% (v/v) TWEEN 20; 0,1 Maleic acid; 0,15 M NaCl pH 7,5). Ispiranje od viška nevezanog antitela vršeno je na rokeru 2 puta po 20 minuta.
5. Membrana je prebačena u novu kadicu u pufer za detekciju (eng. *Detection buffer*; 0,1M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 9,5) i ljuljana na rokeru u trajanju od 5 minuta;
6. U puferu za detekciju rastvoren je CDP-star (*Roche*, Nemačka) u razmeri 100:1;
7. Membrana je prebačena na foliju i po donjoj ivici prelivena rastvorom CDP-stara. Na membranu je postavljena druga folija polako razvlačeći rastvor CDP-stara preko cele

- površine membrane. Pažljivim pokretima od donje ka gornjoj ivici membrane papirom je istisnut višak vazduha i hemiluminiscentnog supstrata;
8. Membrana je ostavljena 5 minuta u mraku na sobnoj temperaturi;
 9. Nakon inkubacije skinuta je gornja folija sa površine membrane i višak CDP-stara otklonjen je blagim tapkanjem sa WhatmanTM 3MM CHR Sheets papirom;
 10. Na membranu je postavljena nova folija i papirom je istisnut višak vazduha. Ovako pripremljena membrana prebačena je u mračnu komoru gde su se odvijali dalji koraci;
 11. U mračnoj komori membrana je postavljena u kasetu i na foliju koja se nalazi na površini membrane postavljen je rentgenski film Amersham Hyperfilm TM ECL (*GE Healthcare*, UK). Film je eksponiran preko noći;
 12. Nakon ekspozicije rentgenski film je prebačen u rastvor koji je sadržao TETENAL ULTRAFIN T-PLUS razvijajući (Tetenal, Nemačka) rastvoren u dejonizovanoj vodi u razmeri 1:4. Film je potopljen u razvijajući do potpune pojave signala;
 13. Nakon pojave signala rentgenski film (blot) je kratko ispran u dejonizovanoj vodi;
 14. Blot je zatim postavljen u fiksir TETENAL SUPERFIX PLUS (Tetenal, Nemačka) u trajanju od 10 minuta koji je rastvoren u vodi u razmeri 1:4;
 15. Po završenoj fiksaciji blot je ispran 5 minuta pod mlazom vode i okačen da se suši na vazduhu.

3.2.5.5 Određivanje veličine *C9orf72* alela detektovanih *Southern blot* metodom

Digerirani DNK uzorci su analizirani 1-4 puta (neki od njih u više od jednog razblaženja) na blotu zavisno od kvaliteta blota i dobijenih traka, dok je pozitivna kontrola uključena u studiju (po jedna ALS i FTD) analizirana više puta. Veličina SP-PCR produkata određivana je upotrebom VisionCapt softvera (*Vilber Lourmat*, Francuska). S obzirom da su za amplifikaciju regiona koji sadrži GGGGCC ponovke korišćeni prajmeri kao za fluorescentni PCR gde veličina PCR produkta iznosi 180 bp u okviru kojeg se nalaze 3 ponovka, broj ponovaka dobijen *Southern blotom* metodom određivan je prema sledećoj formuli (veličina baznih parova-162)/6. Dobijene vrednosti su zaokružljene na cele brojeve.

3.2.6 3' obeležavanje DNK standarda za veličinu sa digoksinin-11-ddUTP

Kao DNK standard za veličinu korišćen je DNA Molecular Weight Marker X (*Roche*, Nemačka) koji je na 3' kraju obeležen sa digoksinin-11-ddUTP-om (DIG-11-ddUTP) (*Roche*, Nemačka). Komponente reakcione smeše sa finalnim koncentracijama prikazane su u Tabeli 18.

Obeležavanje DNK standarda za veličinu vršeno je prema sledećem protokolu:

1. U mikrotubu zapremine 0,2 ml dodata je odgovarajuća količina komponenti za obeležavanje 3' kraja prikazanih u Tabeli 18;
2. Reakciona smeša je inkubirana na 37 °C u PCR aparatu u trajanju od 1h i 15 minuta;
3. Nakon završene inkubacije smeša je prebačena na led i reakcija obeležavanja je prekinuta dodavanjem 2 µl 0.2 M EDTA pH8 (*Serva*, Nemačka);
4. Ovako obeležen DNK standard za veličinu čuvan je na -20 °C.

Tabela 18. Komponente reakcione smeše za 3' obeležavanje sa DIG-11-ddUTP-om

| Komponente reakcione smeše | Finalne koncentracije |
|------------------------------------|-----------------------|
| 5x Reaction buffer* | 1x |
| CoCl ₂ 25mM | 5 mM |
| DIG-11-ddUTP solution 1 mM | 0,05 mM |
| Terminal Transferase 400U/μl** | 400U |
| DNK standard za veličinu 250 μg/ml | 2,5 μg |
| Ukupna zapremina | 20 μl |

*5x Reaction buffer (1M Na-cacodylate, 0.125 M Tris-HCl, 1.25mg/ml bovine serum albumine, pH 6.6 (+25 °C))

** Terminal Transferase 400U/μl (60 mM K-phosphate (pH 7.2 at +4 °C), 150 mM KCl, 1mM 2-Mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100, 50% glycerol)

3.2.7 3' obeležavanje (CCCCGG)₄ probe sa digoksinin-11-ddUTP

Za *Southern blot* hibridizaciju korišćena je proba sa 4 uzastopna ponovka, (CCCCGG)₄, koja je na 3' kraju obeležena sa digoksinin-11-ddUTP-om (DIG-11-ddUTP) (*Roche*, Nemačka). Komponente reakcione smeše za obeležavanje probe (reakcioni pufer, CoCl₂, DIG-11-ddUTP i terminalna transferaza) i njihove zapremine prikazani su u Tabeli 18. Obeležavanje (CCCCGG)₄ vršeno je prema sledećem protokolu:

1. U mikrotubu zapremine 0,2 ml dodata je smeša (reakcioni pufer, CoCl₂, DIG-11-ddUTP i terminalna transferaza) i 10 μl (CCCCGG)₄ probe čija je koncentracija bila 100 pmol;
2. Dobijena smeša je inkubirana u PCR aparatu u trajanju od 1h i 15 minuta;
3. Nakon završene inkubacije smeša je prebačena na led i reakcija obeležavanja je prekinuta dodavanjem jednog volumena 0.2 M EDTA pH8 (*Serva*, Nemačka);
4. Obeležena proba je rastvorena u 50 ml pufera za hibridizaciju i čuvana na -20 °C.

3.2.8 Alkalno stripovanje probe sa najlonske membrane

Ukoliko se nakon detekcije desi da izostane signal na blotu pristupa se metodi stripovanja probe sa membrane. Na ovaj način uklanja se proba vezana za DNK fragmente na membrani, bez da se DNK fragmenti oštete i proces hibridizacije i detekcije može da se ponovi. Alkalno stripovanje vršeno je prema sledećem protokolu:

1. Membrana je isprana u destilovanoj vodi, a zatim prebačena u kadicu u kojoj se nalazio rastvor za alkalno stripovanje (0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS) koji je prethodno zagrejan u aparatu za hibridizaciju na 45 °C;
2. Membrana je potom inkubirana 2 puta po 15 minuta u aparatu za hibridizaciju na 37 °C;
3. Nakon završene inkubacije membrana je dobro isprana 2 minuta u rastvoru 2xSSC;
4. Membrana je prebačena u novu kadicu i 3 puta isprana dejonizovanom vodom;
5. Membrana je ostavljena da se suši na vazduhu nakon čega je umotana u aluminijumsku foliju i ostavljena na sobnoj temperaturi do sledeće hibridizacije.

3.2.9 Statistička analiza rezultata

Za statističku analizu podataka korišćene su metode deskriptivne statistike, kao i parametrijski i neparametrijski statistički testovi zavisno od vrste podataka. Podaci dobijeni deskriptivnim metodama statistike prikazane su kao distribucija frekvencija, maksimum, minimum, srednja vrednost sa standardnom devijacijom i intervalom poverenja srednje vrednosti (eng. *confidence interval* (CI)).

Analiza varijanse korišćena je za poređenje kontinuiranih varijabli. Za analizu kategorijskih varijabli (pol, porodična anamneza, prisustvo FTD ili BMN, spinalni i bulbarni početak bolesti) među bolesnicima sa i bez prisustva ekspanzije u genu *C9orf72* korišćen Hi kvadrat test. Statistički značajna vrednost iznosila je $p < 0,05$.

Za analize korelacije članovi parova ponovaka za svakog bolesnika su označeni kao manji i veći. Dve dodatne posmatrane varijable bile su razlika i zbir ponovaka na oba alela. Ukupno 4 varijable (manji alel, veći alel, razlika u veličini alela i zbir ponovaka na alelima) posmatrane su kao numerički normalno distribuirani podaci i poređeni su među grupama uporebom t-testa i sa drugim numeričkim varijablama korišćenjem Pirsonovog koeficijenta korelacije kod bolesnika kod kojih nije registrovano prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72*. Vrednost između 20-29 ponovaka za varijablu „veći“ smatrana je kao nedostajuća za potrebe ove analize.

Za analizu korelacije veličine ekspanzovanih ponovaka dobijenih *Southern blotom* za statističku analizu podataka korišćena je vrednost Blot max, koja predstavlja najveću vrednost od svih dobijenih traka. Vrednosti su bile nagnute ka višim vrednostima i analizirane neparametrijskim alternativama u poređenju sa negativnom grupom. Analiza korelacije ekspanzovanih ponovaka vršena je Spirmanovim koeficijentom korelacije. Analiza kategorijskih varijabli i broja ponovaka rađena je upotrebom Median testa i Mann-Whitney testa. Kod ALS bolesnika zbog disbalansa grupa i kompleksnog kodiranja porodične istorije, usled različite manifestacije oboljenja, kodiranje porodične istorije je započeto različito za svako oboljenje sa više nivoa (između 3 i 6). Vizuelnim pregledom, više nivoa su spojeni ka nekoliko kombinacija binarnog kodiranja koji su imali biološkog smisla da bi se izbegla upotreba Kruskal-Wallis testa slabije snage. Isti princip vizuelnog pregleda korišćen je i u okviru grupe kognitivno-bihejvioralnih poremećaja.

Poređenje između više grupa je rađeno uporebom testa ANOVA.

Statistička analiza rađena je u statističkom softveru Statistica v12 i SPSS v21 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. IBM Corp., Armonk, NY, USA).

4. REZULTATI

4.1 Bolesti sa predominantno motornim poremećajima

U okviru ove grupe ispitanika testirano je 580 bolesnika sa potvrđenim kliničkim dijagnozama. Na osnovu postavljene kliničke dijagnoze raspodela bolesnika je bila sledeća:

- grupu sa postavljenom dijagnozom ALS činilo je 383 bolesnika,
- grupu sa postavljenom dijagnozom bolesti slične Huntingtonovoj bolesti činilo je 80 bolesnika,
- grupu sa postavljenom dijagnozom MSA činilo je 44 bolesnika,
- grupu sa postavljenom dijagnozom PSP činilo je 73 bolesnika.

Ukupno je registrovan 31/580 (5,34%) bolesnik sa heterozigotnom heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72*. Svi bolesnici sa utvrđenom ekspanzijom bili su u grupi bolesnika sa dijagnozom ALS-a. Registrovana su 4 bolesnika koji su bili nosioci intermedijerne veličine *C9orf72* alela (1 bolesnik sa dijagnozom ALS, 2 bolesnika sa bolešću sličnoj Huntingtonovoj bolesti i 1 bolesnik sa dijagnozom PSP). U okviru grupe bolesnika kod kojih je registrovano prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72* kod jednog bolesnika na kraćem alelu registrovana je intermedijerna veličina ponovaka. Takođe, jedan bolesnik nosilac ekspanzije je bio nosilac i dve nesinonimne varijante, obe u heterozigotnom statusu, jedna u genu *ANG* (c.122A>T, p.K17I), druga u genu *FUS* (c.1550A>C, p.H517P).

4.1.1 Amiotrofična lateralna skleroza

4.1.1.1 Kliničko-demografske karakteristike ALS bolesnika

Ova studija je obuhvatila 383 bolesnika sa postavljenom dijagnozom ALS koju je činilo 210 bolesnika muškog pola (54,83%) i 173 bolesnika ženskog pola (45,17%). Od njih, registrovan je 31 bolesnik (8,09%) sa heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72* koji će biti kasnije prikazani (Poglavlje 4.1.1.2). U okviru grupe bolesnika nosilaca GGGGCC ekspanzije jedan bolesnik (3,23%) je na kraćem alelu nosio intermedijerni broj ponovaka (bolesnik 28, Poglavlje 4.1.1.2), dok su preostali bolesnici nosioci ekspanzije imali manje od 20 ponovaka na kraćem alelu. Takođe, detektovan je jedan bolesnik (0,26%) koji je nosio intermedijerni broj ponovaka samo na dužem alelu (bolesnik 32, Poglavlje 4.1.1.2). Uporedni prikaz kliničko-demografskih karakteristika ALS bolesnika sa i bez ekspanzije u genu *C9orf72* dat je u Tabeli 19.

Prosečna starost ALS bolesnika na početku bolesti u našoj kohorti iznosila je $58,33 \pm 10,94$ (95% CI: 57,23-59,43) opsega 15,0-81,0 godina. Prosečna starost muškaraca na početku bolesti iznosila je $58,06 \pm 11,42$ (95% CI: 56,50-59,62), dok je za žene bila $58,66 \pm 10,35$ (95% CI: 57,10-60,22) godina, bez značajne statističke razlike ($p=0,599$). Poređenjem grupe bolesnika sa i bez prisustva GGGGCC ekspanzije pokazano je da ne postoji razlika u zastupljenosti između muškog i ženskog pola ($p=0,707$) (Tabela 19).

Takođe, ni između bolesnika sa GGGGCC ekspanzijom i bez nje nije pokazana značajna razlika u starosti na početku bolesti ($p=0,611$) (Tabela 19). Treba napomenuti da u grupi bolesnika bez GGGGCC ekspanzije za 3 bolesnika nisu postojali podaci o starosti na početku bolesti.

Tabela 19. Prikaz kliničko-demografskih karakteristika ALS bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije

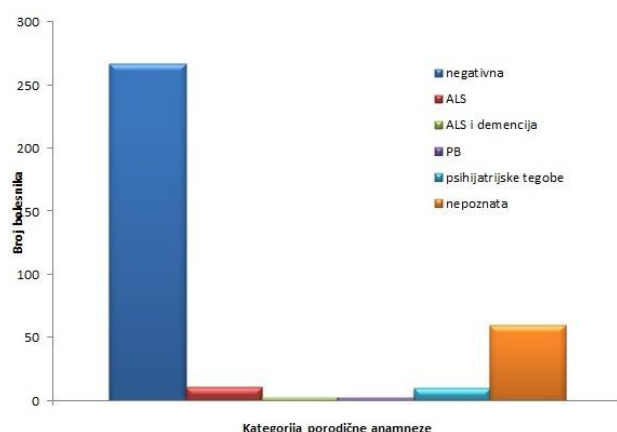
| | Pozitivni na GGGGCC ekspanziju | Negativni na GGGGCC ekspanziju | p vrednost |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Pol | | | |
| muški | 51,61% | 55,16% | p=0,707 |
| ženski | 48,39% | 44,88% | |
| ALS/FTD | 16,13% | 3,41% | p=0,001 |
| Početak | | | |
| spinalni | 77,42% | 79,94% | p=0,738 |
| bulbarni | 22,58% | 20,66% | |
| Pozitivna porodična anamneza | 34,48% | 15,65% | p=0,011 |
| Starost na početku bolesti: | | | p=0,611 |
| SV±SD | 59,29±8,39 | 58,25±11,14 | |
| (95% CI) | (56,21-62,37) | (57,07-59,42) | |
| Opseg: min-max | 34,0-73,0 | 15,0-81,0 | |

SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti

Pozitivna porodična anamneza registrovana je kod 56/383 (14,62%) bolesnika, negativna porodična kod 267/383 (69,71%), dok su za 60/383 (15,67%) bolesnika podaci o porodičnoj anamnezi bili nepoznati. U okviru pozitivne porodične anamneze 29 (51,78%) bolesnika imalo je srodnika sa ALS, 11 (19,64%) bolesnika imalo je pozitivnu porodičnu anamnezu na demencije, 3 (5,36%) bolesnika imalo je ALS i demenciju u porodičnoj anamnezi, 3 (5,36%) bolesnika imala su pozitivnu porodičnu anamnezu na PB, a 10 (17,86%) bolesnika pozitivnu porodičnu anamnezu na psihijatrijske tegobe uključujući suicid (Grafikon 1). Ako se posmatra sa stanovišta pozitivne porodične anamneze kod 10/56 (17,86%) bolesnika zabeleženo je prisustvo GGGGCC ekspanzije. Sa druge strane, u okviru grupe sa negativnom porodičnom anamnezom GGGGCC ekspanzija registrovana je kod 19/267 (7,12%) bolesnika, dok je u okviru grupe bolesnika kod kojih nisu bili dostupni podaci o porodičnoj anamnezi 2/60 (3,33%) bolesnika imalo GGGGCC ekspanziju. Kod nosilaca ekspanzije zabeleženo je statistički značajno češće prisustvo pozitivne porodične anamneze sa proširenim fenotipom u odnosu na bolesnike bez ekspanzije (p=0,011), (Tabela 19).

U okviru cele ALS kohorte pojava familijarnog prisustva ALS-a registrovana je kod ukupno 32/383 (8,36%) bolesnika od kojih su 5 (15,62%) bolesnika bili nosioci ekspanzije.

U celoj grupi ALS bolesnika preklapajući fenotip sa frontotemporalnom demencijom registrovan je kod 17/383 (4,44%) bolesnika od kojih je 5 (29,41%) bolesnika bilo nosilac ekspanzije GGGGCC ponovaka. U okviru grupe bolesnika bez prisustva GGGGCC ekspanzije kod 12/352 (3,41%) bolesnika registrovan je ALS/FTD. Prisustvo FTD je bilo značajno češće kod bolesnika koji su bili nosioci ekspanzije (5/31) u odnosu na one bez (16,13% vs 3,41%, p=0,001), (Tabela 19). Kliničko-demografske karakteristike ALS/FTD bolesnika prikazane su u Poglavlju 4.3.1.



Grafikon 1. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze kod ALS bolesnika.

Spinalni početak bolesti registrovan je kod 303 bolesnika (182 muškarca i 121 žena, 79,11%), a bulbarni kod 77 bolesnika (25 muškaraca i 52 žene, 20,10%). Za 3 bolesnika (0,78%) podaci o obliku početka bolesti nisu bili dostupni. Detaljan prikaz oblika početka bolesti kod ALS bolesnika prikazan je u Tabeli 20. Poređenjem bolesnika sa i bez prisustva GGGGCC ekspanzije nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti spinalnog i bulbarnog početka bolesti ($p=0,738$), (Tabela 19).

Bolesnici sa spinalnim početkom imali su u proseku 6 godina raniji početak bolesti ($p<0,0001$) u odnosu na bolesnike sa bulbarnim početkom ($57,17\pm 10,76$ (95% CI: 55,95-58,38) za spinalni i $63,54\pm 8,97$ (95% CI: 61,49-65,59) za bulbarni oblik). Za jednog bolesnika sa bulbarnim početkom podaci o starosti na početku bolesti nisu bili dostupni.

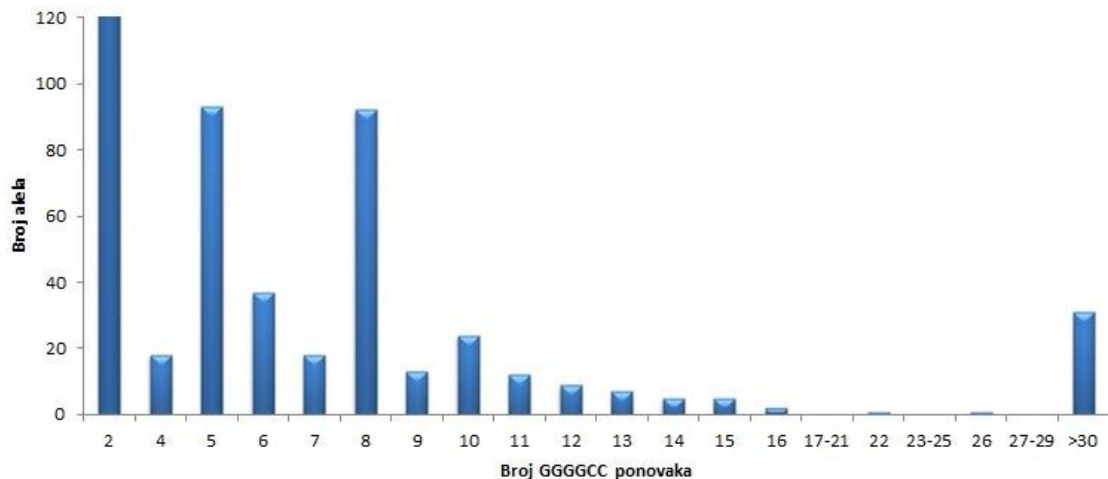
Tabela 20. Prikaz oblika početka bolesti u ALS kohorti, bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije (bez 3 bolesnika za koje nisu bili poznati podaci)

| | Cela ALS kohorta (380) | Pozitivni na GGGGCC ekspanziju (31) | Negativni na GGGGCC ekspanziju (349) |
|-------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Spinalni početak | 303 (79,11%) | 24 (77,42%) | 279 (79,26%) |
| Pol (muški %) | 60,07% | 54,17% | 60,57% |
| GGGGCC ekspanzija | 24 (7,92%) | / | / |
| ALS/FTD | 9 (2,97%) | 2 (8,33%) | 7 (2,51%) |
| GE | 141 (46,53%) | 15 (62,50%) | 126 (45,16%) |
| GE-levo | 47 (33,33%) | 5 (33,33%) | 42 (33,33%) |
| GE-desno | 55 (39,01%) | 5 (33,33%) | 50 (39,68%) |
| GE-oba | 39 (27,66%) | 5 (33,33%) | 34 (26,98%) |
| DE | 160 (52,81%) | 9 (37,50%) | 151 (54,12%) |
| DE-levo | 70 (43,75%) | 4 (44,44%) | 66 (43,71%) |
| DE-desno | 46 (28,75%) | 2 (22,22%) | 44 (29,14%) |
| DE-oba | 44 (27,50%) | 3 (33,33%) | 41 (27,15%) |
| GE+DE | 2 (0,67%) | / | 2 (0,72%) |
| GE+DE-levo | / | / | / |
| GE+DE-desno | 1 (50%) | / | 1 (50%) |
| GE+DE-oba | 1 (50%) | / | 1 (50%) |
| Bulbarni početak | 77 (20,10%) | 7 (22,58%) | 70 (19,89%) |
| Pol (muški %) | 32,47% | 42,86% | 31,43% |
| GGGGCC ekspanzija | 7 (9,09%) | / | / |

| | | | |
|---------|------------|------------|-----------|
| ALS/FTD | 8 (10,39%) | 3 (42,86%) | 5 (7,14%) |
|---------|------------|------------|-----------|

GE-gornji ekstremiteti; DE-donji ekstremiteti

U grupi ALS bolesnika u okviru normalnih alela najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka (51,96%), dok su aleli sa 5 i 8 ponovaka imali gotovo istu učestalost, 12,14% i 12,01% redom. Najveći broj detektovanih ponovaka bio je 16 (0,26%). U kohorti je detektovano 120/383 (31,33%) bolesnika koji su bili homozigoti za veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela kod ALS bolesnika prikazana je na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom ALS.

Kod bolesnika koji nisu bili nosioci GGGGCC ekspanzije nije uočena statistički značajna korelacija veličine normalnih ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti. Takođe, nije pokazana značajna asocijacija veličine ponovaka ni sa spinalnim i bulbarnim početkom bolesti, kao ni prisustvom FTD-a. Veća vrednost medijane manjeg alela uočena je u grupi bolesnika koji su imali pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS, demencije i ALS i demenciju (Median test, $p=0,033$), (Tabela 21). Rezultati Pirsonove korelacije i t testa prikazani su u Tabeli 21.

Tabela 21. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara kod ALS bolesnika bez GGGGCC ekspanzije

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|-----------|--------------|---------|--------|
| Starost na početku bolesti | r | -0,024 | -0,018 | -0,014 | -0,026 |
| | p | 0,659 | 0,741 | 0,788 | 0,623 |
| Spinalni/bulbarni | t | 0,325 | 0,490 | 0,042 | 0,476 |
| | p | 0,745 | 0,624 | 0,967 | 0,634 |
| ALS/FTD | t | 0,111 | 0,185 | 0,022 | 0,157 |
| | p | 0,911 | 0,853 | 0,982 | 0,875 |
| Porodična anamneza* | p | 0,831 | 0,033 | 0,901 | 0,314 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t-vrednost t testa; * - Median test za pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS, demencije i ALS i demenciju

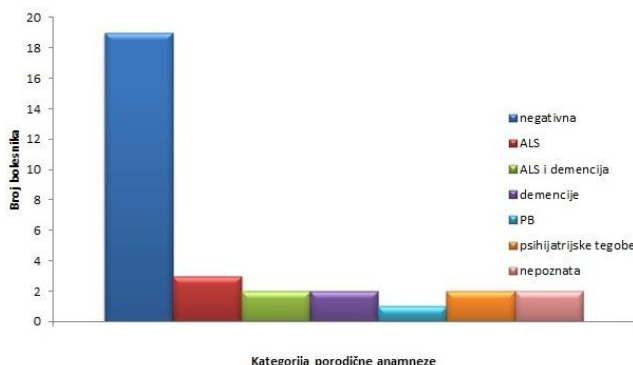
4.1.1.2 Kliničke karakteristike bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama i intermedijernim brojem GGGGCC ponovaka u genu *C9orf72*

U ovom istraživanju od ukupno 383 bolesnika sa dijagnozom ALS, ukupno je detektovan 31 bolesnik (8,09%) sa heksanukleotidnom ekspanzijom u heterozigotnom obliku u genu *C9orf72*, od kojih je 16 bolesnika bilo muškog (51,61%), dok je 15 bolesnika bilo ženskog pola (48,39%).

Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa heksanukleotidnom ekspanzijom prikazane su u Tabelama 19 i 20.

Prosečna starost na početku bolesti kod muškog pola iznosila je $61,44 \pm 6,80$ (95% CI: 57,81-65,06), dok je za žene bila $57,0 \pm 9,51$ (95% CI: 51,73-62,27) godina bez statistički značajne razlike ($p=0,144$).

Pozitivna porodična anamneza registrovana je kod 10/31 (32,26%) bolesnika, negativna porodična anamneza kod 19/31 (61,29%), dok su za 2/31 (6,45%) bolesnika podaci o porodičnoj anamnezi bili nepoznati. U okviru pozitivne porodične anamneze 3 (30%) bolesnika imala su pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS, 2 (20%) bolesnika na demencije, 2 (20%) bolesnika na ALS i demenciju, 1 (10%) bolesnik na PB. Kod 2 (20%) bolesnika porodična anamneza bila je pozitivna na psihijatrijske tegobe (Grafikon 3).



Grafikon 3. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze kod ALS bolesnika nosilaca GGGGCC ekspanzije.

Spinalni početak bolesti registrovan je kod 24 bolesnika (13 muškaraca i 11 žena, 77,42%), a bulbarni kod 7 bolesnika (3 muškarca i 4 žene, 22,58%). Detaljan prikaz oblika početka bolesti kod ALS bolesnika nosilaca GGGGCC ekspanzije prikazan je u Tabeli 20.

Kod nosilaca ekspanzije nije uočena statistički značajna razlika za starost na početku bolesti ($p=0,514$) između bolesnika sa spinalnim i bulbarnim početkom bolesti ($59,83 \pm 7,29$ (95% CI: 56,76-62,91) za spinalni početak i $57,43 \pm 11,97$ (95% CI: 46,36-68,50) za bulbarni početak).

Egzekutivna disfunkcija bila je prisutna kod 14/31 (45,16%) bolesnika, a prisustvo FTD-a je registrovano kod ukupno 5/31 (16,13%) bolesnika. Kod 6/31 (19,35%) bolesnika kognitivna funkcija je bila očuvana. Takođe, za 6 bolesnika podaci o proceni kognitivne funkcije nisu bili dostupni. Kliničko-demografske karakteristike ALS/FTD bolesnika opisane su u Poglavlju 4.3.1.

Veličina ponovaka registrovanih *Southern blot* metodom kod ALS bolesnika bila je u opsegu 32-706 ponovaka.

Kod bolesnika nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* nije uočena značajna korelacija veličine ponovaka sa starošću bolesnika na početku bolesti. Takođe, nije pokazana značajna asocijacija veličine ponovaka (Blot Max) sa spinalnim ili bulbarnim početkom, kao ni sa prisustvom FTD-a. Kod bolesnika sa pozitivnom porodičnom anamnezom na ALS uočena je značajno veća vrednost Blot max parametra (Mann-Whitney test, $p=0,037$), (Tabela 22). Rezultati Spirmanove korelacije i t testa prikazani su u Tabeli 22.

Tabela 22. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara kod bolesnika nosilaca GGGGCC ekspanzije

| | | Manji alel | Blot max |
|----------------------------|-------|------------|--------------|
| Starost na početku bolesti | r_s | -0,030 | 0,197 |
| | p | 0,875 | 0,289 |
| Spinalni/bulbarni | t | 1,550 | -1,057 |
| | p | 0,132 | 0,299 |
| ALS/FTD | t | 0,596 | 0,597 |
| | p | 0,556 | 0,555 |
| Porodična anamneza ** | p | 0,122 | 0,037 |

r_s - Spirmanov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t-vrednost t testa; ** - Mann-Whitney test za pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS

Prikaz kliničke slike bolesnika nosilaca ekspanzije i intermedijernog broja ponovaka

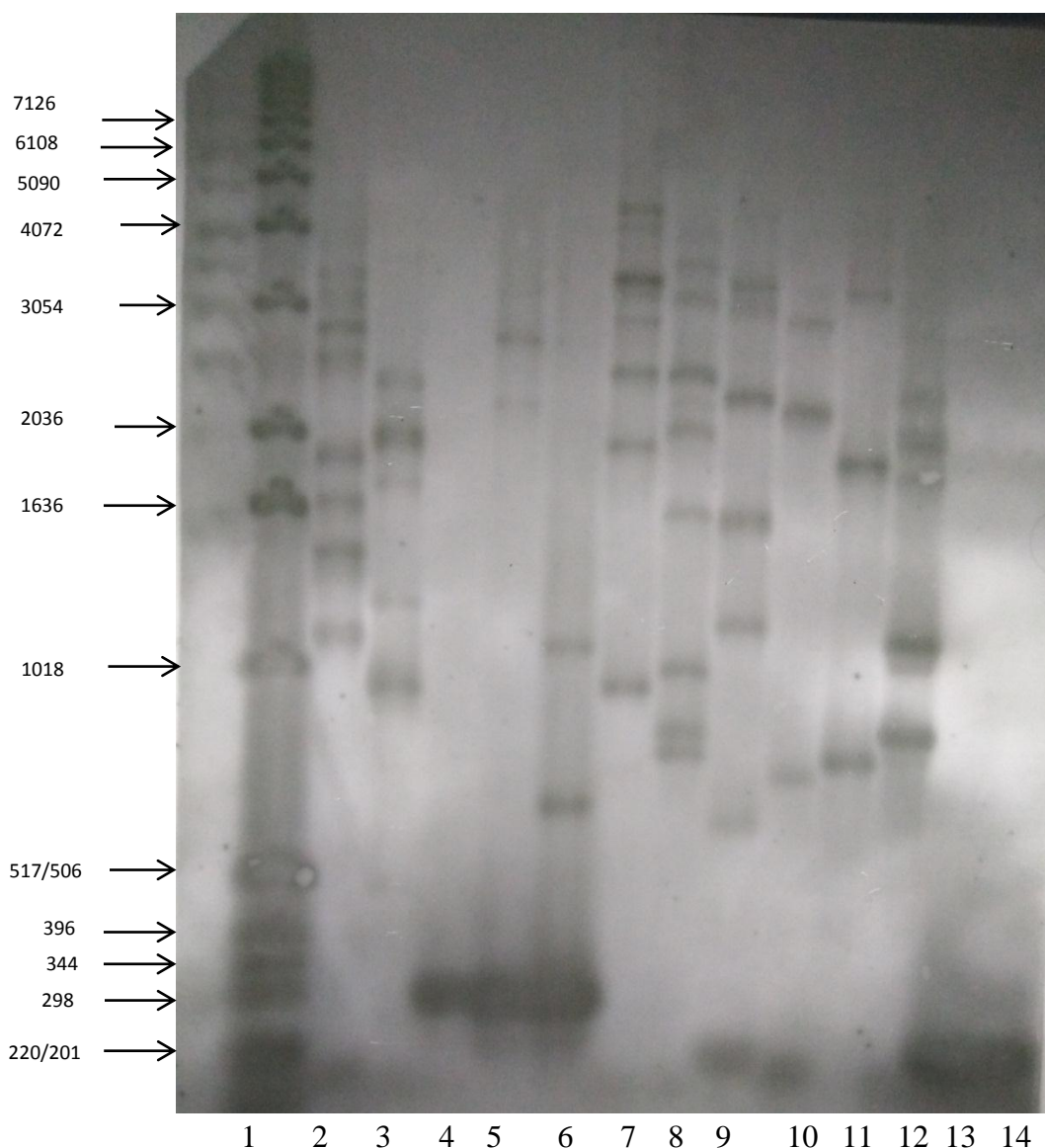
1. Bolesnik 1 (ženskog pola): početak bolesti: 51. godina, spinalna forma. Neuropsihološko testiranje: blagi frontalni disekzekutivni sindrom. Porodična anamneza: pozitivna na demencije (otac bio dementan). Normalni alel imao je 2 ponovka, dok je registrovani broj ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bio u opsegu 112-317 ponovaka.
2. Bolesnik 2 (muškog pola): početak bolesti: 60. godina, spinalna forma. Porodična anamneza: pozitivna (majka je imala psihijatrijske tegobe). Normalni alel nosio je 10 ponovaka, dok je registrovani broj ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bio oko 238 ponovaka.
3. Bolesnik 3 (muškog pola): početak bolesti 54. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: nedostupni podaci. Normalni alel nosio je 4 ponovka, dok je registrovani broj ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bio oko 201 ponovak.
4. Bolesnik 4 (ženskog pola): početak bolesti: 42. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: očuvan. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 6 ponovaka, dok je registrovani broj ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bio opsega 82-357 ponovaka.
5. Bolesnik 5 (ženskog pola): početak bolesti: 59. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: ALS/FTD. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovani broj ponovaka na dužem alelu bio opsega 54-86 ponovaka.
6. Bolesnik 6 (ženskog pola): početak bolesti: 34. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: očuvan. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 5 ponovaka, dok je registrovani broj ponovaka dužem alelu bio opsega 241-454 ponovka.
7. Bolesnik 7 (muškog pola): početak bolesti: 73. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: pozitivna (kod brata, majke, tetke i bake po majci). Analiza gena *ANG* i *FUS* kod ovog bolesnika pokazala je prisustvo dve nesinonimne varijante: *ANG*:c.122A>T, p.K17I i *FUS*:c.1550A>C, p.H517P. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 52-635 ponovaka.
8. Bolesnik 8 (muškog pola): početak bolesti: 51. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: pozitivna na ALS (otac bolesnika imao ALS). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 168-579 ponovaka.
9. Bolesnik 9 (ženskog pola): početak bolesti: 54. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 8 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu opsega 124-142 ponovka.

10. Bolesnik 10 (ženskog pola): početak bolesti: 69. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: očuvan. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 8 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 81-471 ponovak.
11. Bolesnik 11 (muškog pola): početak bolesti: 65. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: očuvan. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 5 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 92-142 ponovka.
12. Bolesnik 12 (muškog pola): početak bolesti: 50. godina, spinalna forma. Porodična anameza: negativna. Normalni alel nosio je 6 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 222-441 ponovak.
13. Bolesnik 13 (muškog pola): početak bolesti: 67. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: ALS/FTD. Porodična anamneza: negativna. Normalan alel nosio je 12 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 104-236 ponovaka.
14. Bolesnik 14 (muškog pola): početak bolesti: 64. godina, spinalna forma. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 5 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 102-172 ponovka.
15. Bolesnik 15 (muškog pola): početak bolesti: 63. godina, spinalna forma. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 32-445 ponovaka.
16. Bolesnik 16 (ženskog pola): početak bolesti: 57. godina, spinalna forma. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila oko 108 ponovaka.
17. Bolesnik 17 (ženskog pola): početak bolesti: 61. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: pozitivna (majka je imala psihijatrijske tegobe). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 65-153 ponovka.
18. Bolesnik 18 (ženskog pola): početak bolesti: 64. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 13 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 83-511 ponovaka.
19. Bolesnik 19 (muškog pola): početak bolesti: 61. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 53-173 ponovka.
20. Bolesnik 20 (muškog pola): početak bolesti: 66. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: očuvan. Porodična anamneza: nedostupni podaci. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 79-105 ponovaka.
21. Bolesnik 21 (muškog pola): početak bolesti: 50. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: ALS/FTD. Porodična anamneza: pozitivna na demencije i ALS (otac bolesnika je imao ALS i demenciju). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 103-294 ponovka.
22. Bolesnik 22 (ženskog pola): početak bolesti: 54. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 6 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 112-382 ponovka.
23. Bolesnik 23 (ženskog pola): početak bolesti: 58. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 5 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 122-430 ponovaka.
24. Bolesnik 24 (muškog pola): početak bolesti: 64. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 5

- ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 103-313 ponovaka.
25. Bolesnik 25 (muškog pola): početak bolesti: 64. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: ALS/FTD. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 110-482 ponovka.
 26. Bolesnik 26 (ženskog pola): početak bolesti: 62. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: ALS/FTD. Porodična anamneza: pozitivna (otac bolesnice imao ALS). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 208-480 ponovaka.
 27. Bolesnik 27 (ženskog pola): početak bolesti: 64. godina, spinalna forma. Porodična anamneza: pozitivna (majka bolesnice imala demenciju i bila nepokretna). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 74-362 ponovka.
 28. Bolesnik 28 (ženskog pola): početak bolesti: 56. godina, spinalne forme. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: pozitivna (otac bolesnice je bolovao od demencije, brat od ujaka ima FTDbv/ALS i genetički dokazano prisustvo GGGGCC ekspanzije (bolesnik 6 Poglavlje 4.2.2.2)). Prikaz elektroferograma RP-PCR analizom detektovane GGGGCC ekspanzije prikazan je na Slici 5. Kod bolesnice je detektovan alel koji je nosio 22 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 87-427 ponovaka. Reprezentativni prikaz somatske nestabilnosti ekspanzije u genu *C9orf72* dobijene *Southern blot* metodom dat je na Slici 6 (ALS444).



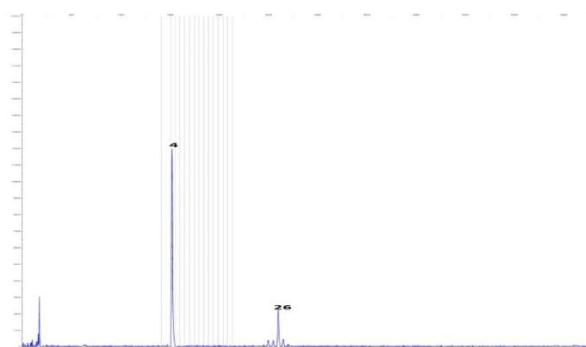
Slika 5. Prikaz elektroferograma RP-PCR analizom detektovane GGGGCC ekspanzije



Slika 6. Reprezentativni prikaz somatske nestabilnosti ekspanzije u genu *C9orf72*: 1-MX-DNK standard za veličinu (Molecular Weight Marker X (Roche, Nemačka); 2-FTD9-PC (PC-pozitivna kontrola); 3-ALS89-PC; 4-NC (NC-negativna kontrola); 5-ALS444; 6-ALS444; 7-ALS536; 8-ALS542; 9-ALS551; 10-AD445; 11-AD478; 12-AD478; 13,14-/

29. Bolesnik 29 (muškog pola): početak bolesti: 63. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 133-706 ponovaka.
30. Bolesnik 30 (ženskog pola): početak bolesti: 70. godina, bulbarna forma. Neuropsihološki nalaz: očuvan. Porodična anamneza: negativna. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 107-643 ponovka.
31. Bolesnik 31 (muškog pola): početak bolesti: 68. godina, spinalna forma. Neuropsihološki nalaz: egzekutivna disfunkcija. Porodična anamneza: pozitivna (sestra imala PB). Normalni alel nosio je 8 ponovaka, dok je registrovana veličina ekspanzovanih ponovaka na dužem alelu bila opsega 78-693 ponovka.
32. Bolesnik 32 (ženskog pola): početak bolesti: 72. godina, bulbarna forma. Porodična anamneza: negativna. Celokupan ENMG nalaz ukazuje na postojanje bolesti motoneurona sa afekcijom sva 4 regiona tela. Utvrđeno je da bolesnica na jednom alelu ima 4, a na

drugom alelu 26 ponovaka. Alel sa 26 ponovaka je klasifikovan kao intermedijerni. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela dat je na Slici 7.

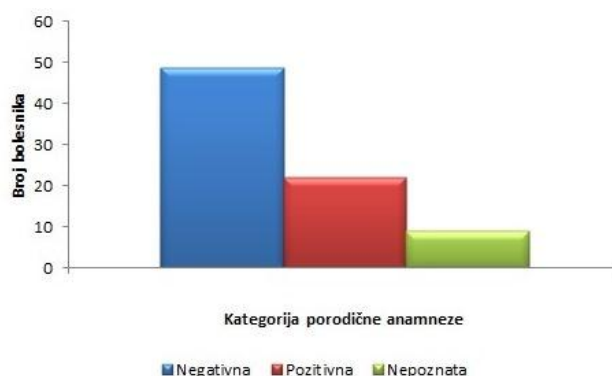


Slika 7. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela

4.1.2 Bolest slična Huntingtonovoj bolesti

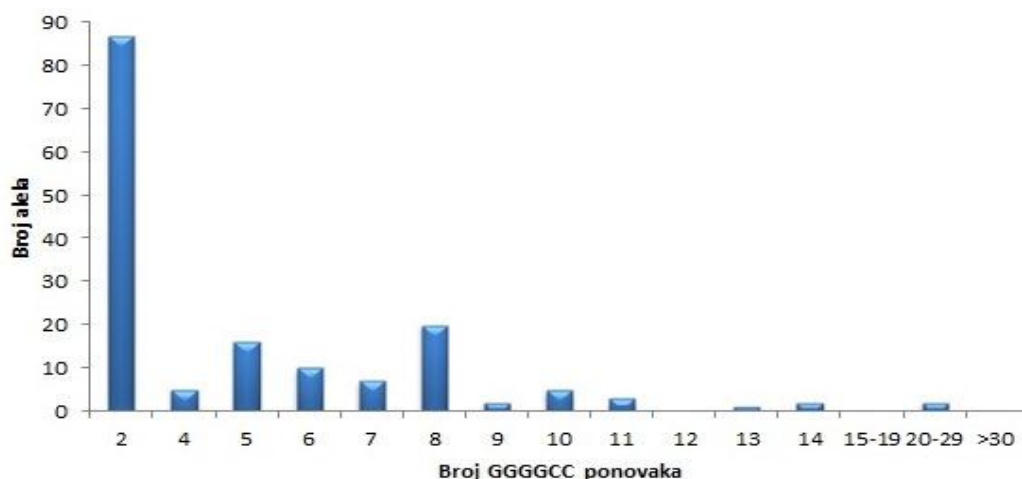
U ovoj grupi bolesnika ukupno je testirano 80 bolesnika kojima je postavljena dijagnoza bolesti slične Huntingtonovoj bolesti. Grupu je činilo 30 bolesnika muškog pola (37,5%) i 50 bolesnika ženskog pola (62,5%). Prosečna starost na početku bolesti u analiziranoj kohorti iznosila je $44,31 \pm 20,15$ (95% CI: 39,83-48,80) opsega 2,0-80,0 godina. Kod 49/80 (61,25%) bolesnika nije uočeno prisustvo porodične istorije, 22/80 (27,50%) bolesnika imalo je pozitivnu porodičnu anamnezu, dok kod 9/80 (11,25%) bolesnika podaci o porodičnoj anamnezi nisu bili dostupni (Grafikon 4).

Ni kod jednog bolesnika nije detektovano prisustvo GGGGCC ekspanzija. Samo dva (2,5%) bolesnika bili su nosioci intermedijerne veličine ponovaka na dužem alelu (Poglavlje 4.1.2.1).



Grafikon 4. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze kod bolesnika sa bolešću sličnoj Huntingtonovoj bolesti.

Najveću zastupljenost *C9orf72* alela imao je alel sa 2 ponovka (54,37%), a zatim alel sa 8 ponovaka (12,50%). Najveći broj detektovanih ponovaka u okviru grupe normalnih alela bio je 14 (1,25%). U grupi su registrovana 22 (27,50%) bolesnika koji su bili homozigoti za veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela prikazana je na Grafikonu 5.



Grafikon 5. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom bolesti slične Huntingtonovoj bolesti.

U grupi bolesnika sa bolešću sličnoj Huntingtonovoj bolesti nisu utvrđene značajne korelacije godina bolesnika na početku bolesti sa brojem ponovaka. Takođe, nije postojala značajna razlika u veličini ponovaka kod bolesnika u odnosu na porodičnu anamnezu. Rezultati Pirsonove korelacije i t testa prikazani su u Tabeli 23.

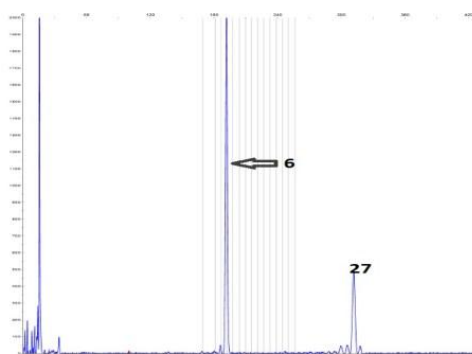
Tabela 23. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|-----------|------------|---------|-------|
| Starost na početku bolesti | r | 0,064 | 0,026 | 0,039 | 0,068 |
| | p | 0,579 | 0,821 | 0,734 | 0,554 |
| Porodična anamneza | t | 0,712 | 1,712 | -0,312 | 1,221 |
| | p | 0,479 | 0,091 | 0,756 | 0,226 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t- vrednost t testa

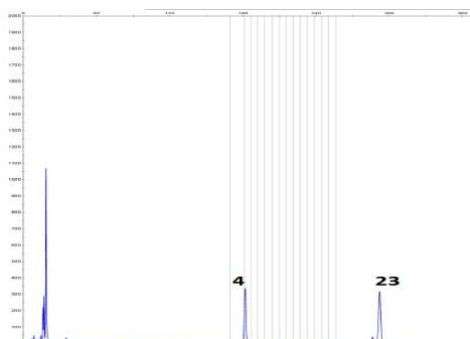
4.1.2.1 Klinička slika bolesnika sa intermedijarnim brojem ponovaka u genu *C9orf72*

1. Bolesnik 1 (muškog pola): početak bolesti: 15. godina života kao laterokolis. Neurološki nalaz: fokalna cervikalna distonija. Psihološki nalaz: impulsivnost i fizička agresivnost prema predmetima, napetost, nizak prag tolerancije, povišena osetljivost na stres. Porodična anamneza: otac (depresija), majka (oromandibularna distonija). Utvrđeno je da kod bolesnika na kraćem alelu postoji 6 GGGGCC ponovaka, a na dužem 27 ponovaka. Alel sa 27 ponovaka je klasifikovan kao intermedijerni. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela dat je na Slici 8.



Slika 8. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela

2. Bolesnik 2 (ženskog pola): početak bolesti: 63. godina, nevoljni pokreti u obliku zabacivanja glave i ruku koji se javljaju u večernjim satima Neurološki nalaz: oromandibularne diskinezije. Psihološki nalaz: razdražljivost, nervoza i nesanica. Porodična anamneza: negativna. Bolesnica je na kraćem alelu imala 4, a na dužem alelu 23 GGGGCC ponovka. Alel sa 23 ponovka je klasifikovan kao intermedijerni. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela dat je na Slici 9.



Slika 9. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela

4.1.3 Multipla sistemska atrofija

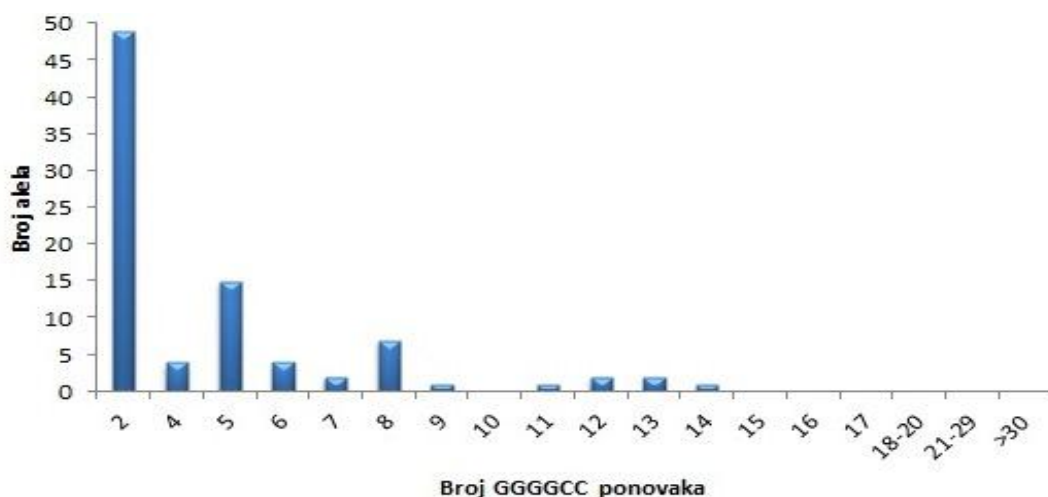
Grupu sa dijagnozom MSA činilo je 44 bolesnika od kojih je 21 bolesnik bio muškog (47,73%) pola, dok je 23 bilo ženskog pola (52,27%). Prosečna starost na početku bolesti u ovoj grupi bolesnika iznosila je $55,64 \pm 6,22$ (95% CI: 53,75-57,53) opsega 37,0-69,0 godina. Negativna porodična anamneza registrovana je kod 39/44 (88,64%) bolesnika, pozitivna porodična anamneza kod 2/44 (4,55%) bolesnika, dok je kod 3/44 (6,82%) bolesnika porodična anamneza bila nepoznata. U okviru pozitivne porodične anamneze, jedan bolesnik imao je pozitivnu porodičnu anamnezu na PB, a kod drugog je u porodici zabeleženo prisutvo parkinsonizma (Grafikon 6).

U čitavoj grupi nije registrovano prisutvo GGGGCC ekspanzija.



Grafikon 6. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze kod MSA bolesnika.

U okviru normalnih alela najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka (55,68%), a zatim alel sa 5 ponovaka (17,05%). Maksimalan broj detektovanih ponovaka u grupi MSA bolesnika bio je 14 (1,14%). Trinaest bolesnika (29,55%) je bilo homozigotno za veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela prikazana je na Grafikonu 7.



Grafikon 7. Distribucija učestalosti C9orf72 alela kod bolesnika sa dijagnozom MSA

U grupi MSA bolesnika nisu utvrđene značajne korelacije godina bolesnika na početku bolesti sa brojem ponovaka. Takođe, nije postojala ni značajna razlika u veličini ponovaka kod bolesnika u odnosu na porodičnu anamnezu. Rezultati Pirsonove korelacije i t testa prikazani su u Tabeli 24.

Tabela 24. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara

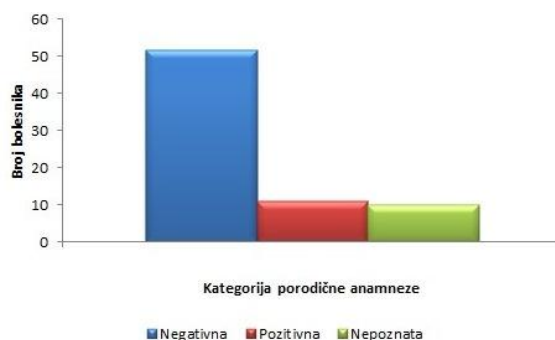
| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|-----------|------------|---------|--------|
| Starost na početku bolesti | r | 0,093 | -0,157 | 0,151 | 0,038 |
| | p | 0,550 | 0,308 | 0,329 | 0,809 |
| Porodična anamneza | t | -0,921 | -0,792 | -0,288 | -1,372 |
| | p | 0,363 | 0,572 | 0,775 | 0,178 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t- vrednost t testa

4.1.4 Progresivna supranuklearna paraliza

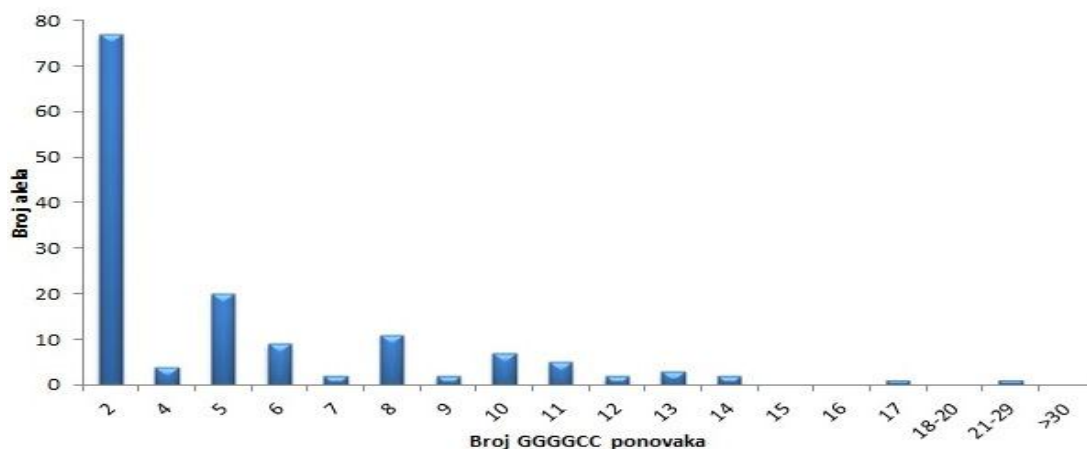
Grupu sa dijagnozom PSP činilo je 73 bolesnika od kojih je 41 bolesnik bio muškog pola (56,16%), dok je 32 bolesnika bilo ženskog pola (43,84%). Prosečna starost na početku bolesti u analiziranoj kohorti PSP bolesnika bila je $63,05 \pm 6,69$ (95% CI: 61,50-64,61) opsega 49,0-79,0 godina. Negativna porodična anamneza registrovana je kod 52/73 (71,23%) bolesnika, pozitivna porodična anamneza koja je takođe uključivala parkinsonizam, demenciju ili prisustvo suicida kod 11/73 (15,07%) bolesnika, dok je kod 10/73 (13,70%) bolesnika porodična anamneza bila nepoznata (Grafikon 8).

Nije detektovano prisustvo GGGGCC ekspanzija. Registrovan je jedan (1,37%) bolesnik sa 25 GGGGCC ponovaka na dužem alelu koji je klasifikovan kao intermedijerni broj ponovaka (Poglavlje 4.1.4.1).



Grafikon 8. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze kod PSP bolesnika.

Kod PSP bolesnika u okviru normalnih alela najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka (52,74%), a zatim alel sa 5 ponovaka (13,70%). Maksimalan broj detektovanih ponovaka u okviru grupe normalnih alela bio je 17 (0,68%). Trideset bolesnika (41,10%) bilo je homozigotno za veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela prikazana je na Grafikonu 9.



Grafikon 9. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom PSP

U PSP grupi nisu uočene značajne korelacije starosti bolesnika na početku bolesti sa veličinom ponovaka. Primenom t testa uočeno je da je zbir ponovaka na oba alela veći u grupi bolesnika sa pozitivnom porodičnom istorijom ($t=-2,231$; $p=0,029$), kada su bolesnici sa nepoznatom porodičnom anamnezom zajedno sa alelom sa 25 ponovaka isključeni iz analize. Rezultati Pirsonove korelacije i t testa prikazani su u Tabeli 25.

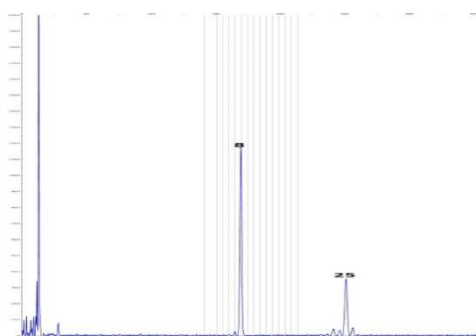
Tabela 25. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|-----------|------------|---------|---------------|
| Starost na početku bolesti | r | 0,209 | 0,100 | 0,195 | 0,186 |
| | p | 0,078 | 0,399 | 0,100 | 0,118 |
| Porodična anamneza | t | -1,855 | -1,932 | -0,805 | -2,231 |
| | p | 0,068 | 0,058 | 0,424 | 0,029 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t- vrednost t testa

4.1.4.1 Klinička slika bolesnika sa intermedijarnim brojem GGGGCC ponovaka u genu *C9orf72*

1. Bolesnik 1 (muškog pola): početak bolesti: 69. godina, usporenost i otežan hod više izražen na desnoj strani tela sa tremorom u miru desne ruke i sa ograničenim odgovorom na uvedenu terapiju levo dopom. Javlja se nestabilnost u hodu i prisustvo padova, otežano gutanje i pareza vertikalnog pogleda. CT endokranijuma pokazao je izrazite kortikoreduktivne promene lokalizovane frontotemporalno. Neurološki nalaz: minimalno povišen tonus po ekstrapiramidalnom tipu više desno, hipokineza i bradikineza. Porodična anamneza: negativna. Utvrđeno je da na kraćem alelu ima 8, a na dužem 25 GGGGCC ponovaka. Alel sa 25 ponovaka je okarakterisan kao intermedijarni. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela dat je na Slici 10.



Slika 10. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela.

4.2 Bolesti sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima

Kod bolesnika sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima uvedena je kategorizacija bolesnika na bolesnike kod kojih je bolest počela pre ili u 65. godini života - bolest ranog početka (eng. *early onset*) i na bolesnike kod kojih je bolest počela posle 65. godine života - bolest kasnog početka (eng. *late onset*) (Jarmolowicz et al., 2015, Smits et al., 2015). Nakon pilot studije zastupljenosti ekspanzija GGGGCC ponovaka u našoj populaciji kod bolesnika sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima, čiji su rezultati obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom, za dalje uključivanje u ovo istraživanje pretežno su selektovani bolesnici sa ranim početkom bolesti.

U okviru ove grupe ukupno je testirano 477 osoba od kojih je 5 osoba testirano u okviru presimptomatske analize kao članovi porodice bolesnice sa postavljenom dijagnozom frontotemporalne demencije.

Preostalih 472 bolesnika na osnovu klinički potvrđene dijagnoze raspoređeno je u 4 grupe:

- u grupi sa BKP bilo je 118 bolesnika,
- grupu sa postavljenom dijagnozom FTD činilo je 129 bolesnika,
- grupu sa postavljenom dijagnozom AB činilo je 176 bolesnika,
- u grupi sa dijagnozom atipične demencije bilo je 49 bolesnika.

Registровано je ukupno 11/472 (2,33%) bolesnika (9 bolesnika sa dijagnozom FTD i 2 bolesnika sa dijagnozom atipične demencije) sa heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72*.

Za dalju statističku analizu korišćeni su podaci 472 bolesnika kojima je postavljena dijagnoza BKP, FTD, AD ili atipična demencija.

4.2.1 Blagi kognitivni poremećaj

Grupu sa postavljenom dijagnozom blagog kognitivnog poremećaja činilo je 118 bolesnika od kojih je 34 bolesnika bilo muškog pola (28,81%), dok je 84 bolesnika bilo ženskog pola (71,19%). Kognitivne smetnje ranog početka zabeležene su kod 87 (73,73%) bolesnika, a kognitivne smetnje kasnog početka kod 31 (26,27%) bolesnika. Kliničko-demografske karakteristike bolesnika prikazane su u Tabeli 26. Prema modifikovanoj Goldman skor kategorizaciji porodične anamneze zastupljenost pozitivne porodične anamneze i kategorije 4 bila je ista, po 59/118 bolesnika (50%). U okviru pozitivne porodične anamneze kategorija 1 registrovana je kod 4 (6,78%), kategorija 2 kod 8 (13,56%), kategorija 3 kod 11 (18,64%) i kategorija 3,5 kod 36 (61,02%) bolesnika (Grafikon 10).

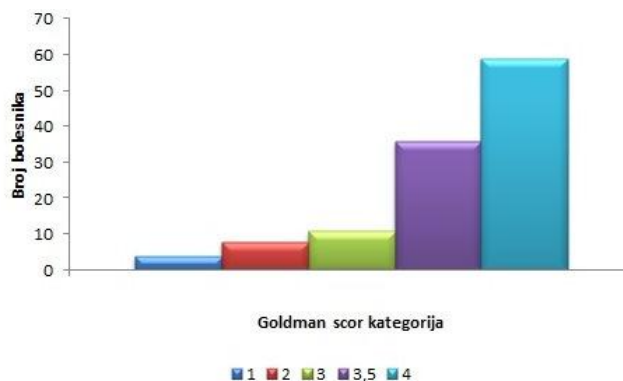
Parkinsonizam je zabeležen kod 4/118 (3,39%) bolesnika. Isti broj bolesnika (3,39%) pored BKP imao je i epilepsiju.

Tabela 26. Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa dijagnozom BKP

| | SV±SD | CI | Opseg (min-max) |
|-------------------------------------|------------|---------------------|-----------------|
| Starost na početku bolesti (godine) | 59,33±9,64 | 95% CI: 57,57-61,09 | 36,0-82,0 |
| MMSE | 26,69±2,96 | 95% CI: 26,15-27,23 | 17-30 |
| Obrazovanje (godine) | 13,21±2,47 | 95% CI: 12,76-13,66 | 4-20 |

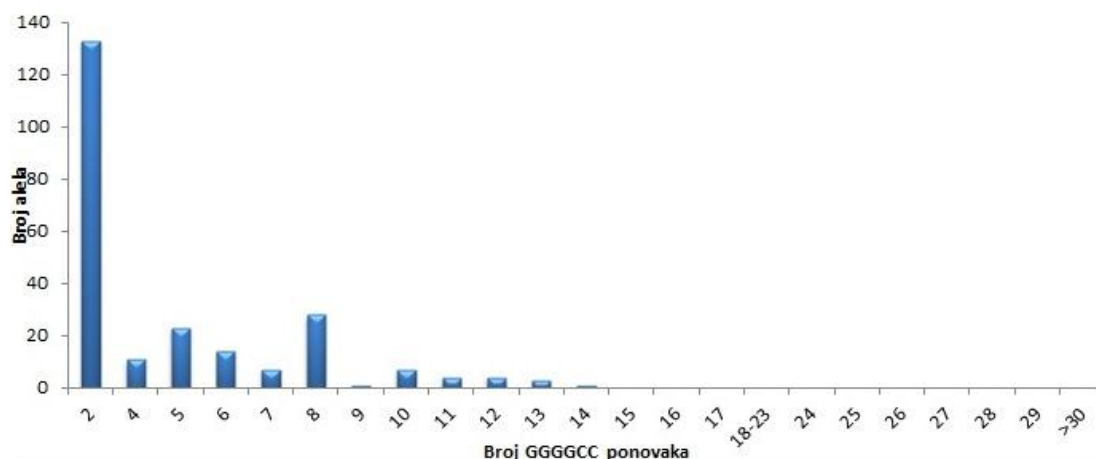
SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti

Kod bolesnika sa postavljenom dijagnozom BKP nije detektovano prisustvo heksanukleotidnih ekspanzija u nekodirajućem regionu gena *C9orf72*.



Grafikon 10. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze prema modifikovanom Goldman skoru kod bolesnika sa dijagnozom BKP.

Od ukupnog broja alela najveću zastupljenost imao je alel sa 2 GGGGCC ponovka (56,36%), zatim alel sa 8 GGGGCC ponovaka (11,86%), dok je maksimalni broj GGGGCC ponovaka bio 14 (0,42%). Ukupno je detektovano 45/118 (38,14%) bolesnika koji su bili homozigoti za veličine *C9orf72* alela. Prikaz raspodele učestalosti veličina *C9orf72* alela dat je na Grafikonu 11.



Grafikon 11. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom BKP.

Kod bolesnika sa BKP dijagnozom nisu utvrđene značajne korelacije godina bolesnika na početku bolesti sa brojem ponovaka. Takođe, nije postojala asocijacija sa porodičnom anamnezom. Rezultati Pirsonove korelacije prikazani su u Tabeli 27.

Tabela 27. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|------------------|-------------------|----------------|-------------|
| Starost na početku bolesti | r | 0,061 | 0,022 | 0,056 | 0,053 |
| | p | 0,511 | 0,817 | 0,547 | 0,572 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost

4.2.2 Frontotemporalna demencija

4.2.2.1 Kliničko-demografske karakteristike FTD bolesnika

Dijagnoza frontotemporalne demencije postavljena je kod 129 bolesnika od kojih je 74 bolesnika bilo muškog (57,36%), a 55 bolesnika ženskog pola (42,64%). Demencija ranog početka registrovana je kod 111 (86,05%), a demencija kasnog početka kod 18 bolesnika (13,95%). Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa dijagnozom FTD prikazane su u Tabelama 28 i 29. Prosečna starost na početku bolesti kod muškaraca iznosila je 56,82±7,59 (95% CI: 55,07-58,58) godina, dok su žene imale 57,55±7,91 (95% CI: 55,41-59,68) godina na početku bolesti. U FTD kohorti nije pokazana statistički značajna razlika između muškog i ženskog pola u starosti na početku bolesti (p=0,601).

Tabela 28. Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa dijagnozom FTD

| | SV±SD | CI | Opseg (min-max) |
|-------------------------------------|--------------|---------------------|------------------------|
| Starost na početku bolesti (godine) | 57,13±7,71 | 95% CI: 55,79-58,47 | 36,0-78,0 |
| MMSE | 17,38±7,53 | 95% CI: 16,07-18,69 | 2-30 |
| Obrazovanje (godine) | 12,26±2,98 | 95% CI: 11,74-12,78 | 4-18 |

SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti

Registrovano je 9 (6,98%) bolesnika sa heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72* kao i jedan (0,78%) bolesnik koji je nosio intermedijerni broj ponovaka na dužem alelu, a čije će karakteristike biti kasnije opisane (Poglavlje 4.2.2.2). Uporedni prikaz kliničko-demografskih karakteristika FTD bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije dat je u Tabeli 29.

Kod bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije nije uočena značajna razlika u učestalosti polova (p=0,416), (Tabela 29).

Međutim, bolesnici nosioci GGGGCC ekspanzije imali su u proseku 7 godina raniji početak bolesti u odnosu na bolesnike koji nisu bili nosioci ekspanzije (p=0,007), (Tabela 29).

Tabela 29. Prikaz kliničko-demografskih karakteristika FTD bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije

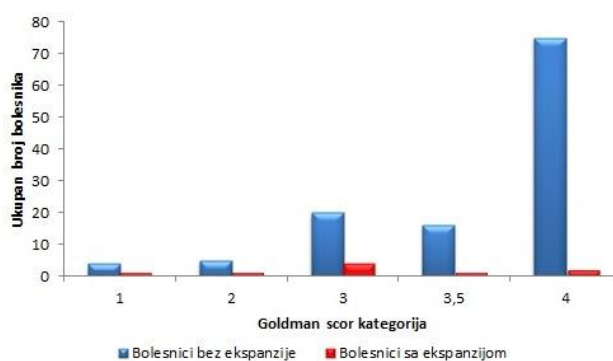
| | Positivni na GGGGCC ekspanziju | Negativni na GGGGCC ekspanziju | p vrednost |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Pol | | | |
| muški | 44,44% | 58,33% | p=0,416 |
| ženski | 55,55% | 41,66% | |
| ALS/FTD | 22,22% | 2,5% | p=0,003 |
| Pozitivna porodična anamneza | 77,78% | 37,5% | p=0,018 |
| Starost na početku bolesti: | | | p=0,007 |
| SV±SD; | 50,56±8,25; | 57,63±7,47; | |
| (95% CI) | (44,22-56,90) | (56,27-58,98) | |
| Opseg: min-max | 36,0-64,0 | 38,0-78,0 | |

SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti

Pozitivna porodična anamneza registrovana je kod 52/129 (40,31%) bolesnika u okviru koje je kategorija 1 registrovana kod 5 (9,62%), kategorija 2 kod 6 (11,54%), kategorija 3 kod 24 (46,15%) i kategorija 3,5 kod 17 (32,69%) bolesnika. Sedam bolesnika sa GGGGCC ekspanzijom (13,46%) pripadalo je grupi sa pozitivnom porodičnom anamnezom. Kategorija 4 registrovana je kod 77/129 (59,69%) bolesnika u okviru koje su 2 (2,60%) bolesnika bila nosioci GGGGCC ekspanzije. Zastupljenost porodične anamneze prema modifikovanom Goldman skoru prikazana je na Grafikonu 12. Poređenjem pozitivne porodične anamneze kod bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije, uočeno je da je kod nosilaca ekspanzije značajnije zastupljenija pozitivna porodična anamneza ($p=0,018$), (Tabela 29).

U okviru FTD grupe 5/129 (3,88%) bolesnika imalo je preklapajući fenotip FTD/ALS, dok je u okviru samog FTD/ALS fenotipa 2 (40%) bolesnika bilo nosilac GGGGCC ekspanzije. Prisustvo ALS-a bilo je znatno češće kod bolesnika koji su nosioci ekspanzije u odnosu na bolesnike kod kojih GGGGCC ekspanzija nije registrovana (22,22% vs 2,5%, redom, $p=0,003$), (Tabela 29). Kliničko-demografske karakteristike FTD/ALS bolesnika prikazane su u Poglavlju 4.3.1.

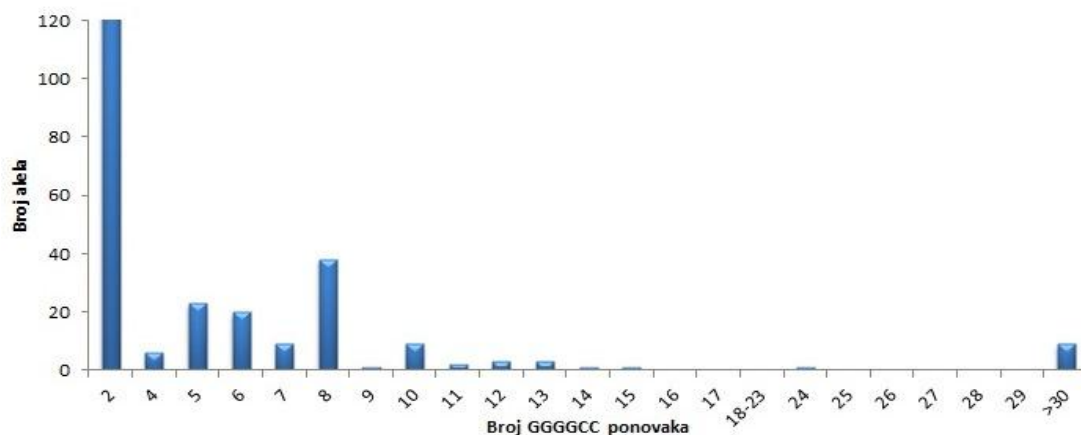
Parkinsonizam je registrovan kod 6/129 (4,65%), PSP kod 8/129 (6,20%), epilepsija kod 3/129 (2,33%), mioklonus kod 1/129 (0,78%) i horea kod 2/129 (1,55%) bolesnika.



Grafikon 12. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze prema modifikovanom Goldman skoru kod bolesnika sa dijagnozom FTD.

U našoj grupi FTD bolesnika u okviru normalnih alela najveću zastupljenost imao je alel sa 2 ponovka (51,16%), a zatim alel sa 8 ponovaka (14,73%). Najveći registrovan broj ponovaka u okviru normalnih alela bio je 15 (0,39%). Kod jedne bolesnice registrovana su 24 ponovka na dužem alelu koji je klasifikovan kao intermedijerni broj ponovaka. Kod 35/129 (27,13%) bolesnika detektovane su homozigotne veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela kod FTD bolesnika prikazana je na Grafikonu 13.

U okviru presimptomatskog testiranja analizirano je 5 članova porodice bolesnice sa 24 ponovka sa dijagnozom FTD, pri čemu su 2 člana bila muškog, a 3 člana ženskog pola sa Goldman skor kategorijom 2. Kod 2/5 (40%) ispitanika registrovano je prisustvo alela sa 24 ponovka, dok je kod 1/5 (25%) ispitanika registrovano prisustvo 27 ponovaka na dužem alelu. Svi ispitanici su pregledani od strane neurologa i nisu imali neuroloških tegoba. Ovi rezultati nisu grafički prikazani na Grafikonu 13.



Grafikon 13. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom FTD.

Analiza korelacije veličine normalnih ponovaka kod bolesnika bez GGGGCC ekspanzije pokazala je prisustvo negativne korelacije većeg i razlike broja ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti. Sa druge strane, nije pokazana značajna asocijacija veličine ponovaka sa prisustvom ALS-a, kao ni sa porodičnom anamnezom. Rezultati Pirsonove korelacije i t testa dati su u Tabeli 30.

Tabela 30. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara kod bolesnika bez GGGGCC ekspanzije

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|---------------|------------|---------------|--------|
| Starost na početku bolesti | r | -0,197 | 0,116 | -0,267 | -0,109 |
| | p | 0,032 | 0,208 | 0,003 | 0,238 |
| FTD/ALS | t | 0,717 | -0,653 | 1,099 | 0,305 |
| | p | 0,475 | 0,515 | 0,274 | 0,761 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t- vrednost t testa

4.2.2.2 Kliničke karakteristike bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama i intermedijernim brojem ponovaka u genu *C9orf72*

U grupi bolesnika sa dijagnozom FTD kod kojih je registrovana GGGGCC ekspanzija u heterozigotnom obliku (9/129), 4 bolesnika (44,44%) bila su muškog pola, dok je 5 bolesnika (55,56%) bilo ženskog pola. Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa registrovanom ekspanzijom prikazane su u Tabeli 29.

Kod nosilaca GGGGCC ekspanzije muškog i ženskog pola nije utvrđena značajna razlika u starosti na početku bolesti ($p=0,756$), ($49,50 \pm 9,68$ (95% CI: 34,10-64,90) kod muškaraca i $51,40 \pm 7,99$ (95% CI: 41,48-61,32) kod žena).

Pozitivna porodična anamneza bila je zastupljena kod 7/9 (77,78%) bolesnika, a kategorija 4 modifikovanog Goldman skora kod 2/9 (22,22%) bolesnika. U okviru pozitivne porodične anamneze kategorija 1 zabeležena je kod jednog (14,29%), kategorija 2 kod jednog (14,29%), kategorija 3 kod 4 (57,14%) i kategorija 3,5 kod jednog (14,29%) bolesnika (Grafikon 12).

Dva bolesnika (22,22%) imala su preklapajući FTD/ALS fenotip, dok je bihejvioralna varijanta FTD registrovana je kod 7 (77,78%) bolesnika.

Veličina ekspanzovanih ponovaka registrovana *Southern blot* metodom kod FTD bolesnika bila je u opsegu 40-742 ponovaka.

Kod nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* nije pokazana značajna korelacija veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti. Nije pokazana asocijacija sa porodičnom anamnezom, niti je postojala razlika u veličini ponovaka u odnosu na prisustvo ALS-a. Rezultati Spirmanove korelacije i t testa prikazani su u Tabeli 31.

Tabela 31. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara kod nosilaca GGGGCC ekspanzije

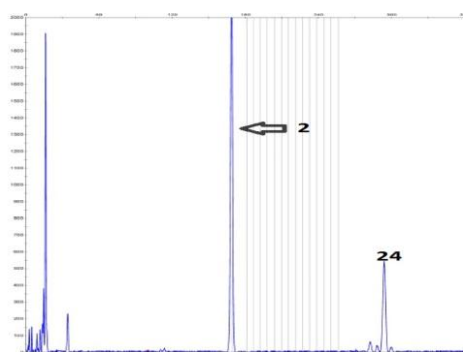
| | | Manji alel | Blot max |
|----------------------------|-------|------------|----------|
| Starost na početku bolesti | r_s | 0,590 | 0,351 |
| | p | 0,095 | 0,354 |
| FTD/BMN | t | -0,596 | -0,229 |
| | p | 0,652 | 0,826 |

r_s - Spirmanov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t-vrednost t testa

Prikaz kliničke slike bolesnika nosilaca ekspanzije i intermedijernog broja ponovaka

1. Bolesnik 1 (ženskog pola): početak bolesti: 64. godina, bihevioralne izmene u vidu nezainteresovanosti, promena u svakodnevnim aktivnostima (prestala da čisti po kući i kuva kao i da održava ličnu higijenu). Imala je potrebu da izlazi iz kuće kroz prozor i besciljno šeta. MMSE: 7/30. Postavljena je dijagnoza FTDbv. Porodična anamneza: pozitivna (rođeni brat u 68. godini života imao je psihijatrijske tegobe u vidu halucinacija i iluzija, izvršio je suicid). Normalni alel nosio je 5 ponovaka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 50-725 ponovaka.
2. Bolesnik 2 (ženskog pola): početak bolesti: 50. godina, zaboravnost i promena na planu ponašanja (sitne krađe, preturanje po kontejneru, dovlačenje stvari u kuću). Postala je inertna, zanemarivala je ličnu higijenu i prestala da obavlja svakodnevne radnje po kući (ne kuva, ne čisti). Pokazivala je poremećaj pažnje u vidu odsutnosti i imala je problem sa imenovanjem. MMSE: 20/30. Postavljena je dijagnoza FTDbv. Porodična anamneza: pozitivna (majka bolesnice imala je psihijatrijsku dijagnozu, pred smrt je bila zaboravna i imala probleme sa prepoznavanjem poznatih lica). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 98-729 ponovaka.
3. Bolesnik 3 (ženskog pola): početak bolesti: 42. godina, problemi sa izgovaranjem reči i gutanjem. Bile su prisutne izmene ličnosti, socijalno povlačenje, poremećaj pamćenja kao i epizode agitacije i halucinacija. Pored dizatrije i disfagije bolesnica je imala slabost ekstremiteta. MMSE: 8/30. Postavljena je dijagnoza preklapajućeg FTD/BMN fenotipa. Porodična anamneza: kategorija 4. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 122-424 ponovaka.
4. Bolesnik 4 (ženskog pola): početak bolesti: 49. godina, zaboravnost. Izgubila je interesovanje, postala lenja i prestala da vodi računa o ličnoj higijeni. Vremenom tegobe su progredirale i nije više bila samostalno funkcionalna. Pokazivala je ravnodušnost prema članovima porodice i povremeno je imala probleme sa prepoznavanjem osoba iz okoline. Nije pokazivala agitiranost, pasivno je slušala sve što joj se kaže. Često se zaplače bez potrebe ili kada joj neko postavi pitanje. Duže vreme bio je primetan intenzivan apetit. Psihomotorna usporenost i prisustvo afektivne inkontinencije. MMSE: 6/30. Postavljena je dijagnoza FTDbv. Porodična anamneza: pozitivna (majka i ujak su bili dementni u 65 godina). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 87-486 ponovaka.
5. Bolesnik 5 (muškog pola): početak bolesti: 52. godina, problemi sa orijentacijom u prostoru (počeo je da ulazi u pogrešan autobus). Prisutno je socijalno povlačenje kao i nezainteresovanost. Tok bolesti je išao u pravcu da sve manje govori, umeo je da se rastuži i rasplače kada sretne ljude koje je poznao. MMSE: 5/30. U neurološkom nalazu narušena posturalnost i ataksičnost. Porodična anamneza: pozitivna (stariji brat ima slične tegobe na planu ponašanja, sakuplja stare stvari i ima strah od siromaštva, majka bolesnika je imala psihijatrijske tegobe (halucinacije i čudne ideje)). Normalni alel nosio je 7 ponovaka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 49-714 ponovaka.

6. Bolesnik 6 (muškog pola): početak bolesti: 51. godina, otežan hod na petama što se progresivno pogoršavalo i dovelo do pada levog i desnog stopala. Bolesnik se žalio na otežano ustajanje iz čučnja i brzo zamaranje. Prisutna je depresija umerenog stepena, oslabljena pažnja i problemi u pamćenju skorašnjih događaja. Halucinacije se javljaju u obliku prepričavanja razgovora koji se nisu dogodili. MMSE: 28/30. Bolesniku je postavljena dijagnoza preklapajućeg fenotipa FTDbv/ALS. Porodična anamneza: pozitivna na ALS (sestra od tetke ima ekspanziju GGGCC ponovaka: Poglavlje 4.1.1.2 bolesnik 28). Normalni alel nosio je 10 ponovaka, dok je prosečna registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 183-742 ponovka.
7. Bolesnik 7 (muškog pola): početak bolesti: 36. godina, problemi na egzekutivnom planu (imao je probleme u vožnji, napravio je nekoliko saobraćajnih akcidenata). Imao je probleme na poslu i pad funkcionalnosti. Javili su se problemi sa govorom u vidu smanjene govorne produkcije i ponavljanja neke reči više puta. Prisutna je izmena u ishrani sa konzumiranjem velike količine slatkiša i suve hrane. Slabije se snalazio u svakodnevnim aktivnostima i nekontrolisano je kupovao bespotrebne stvari. Bio je nemaran oko plaćanja komunalija, kao i oko brige o detetu. Povremeno je zapažena urinarna inkontinencija. Neurološki nalaz: hipomimija i posturalni tremor na levim gornjim ekstremitetima. MMSE: 26/30. Bolesniku je postavljena dijagnoza FTDbv. Porodična anamneza: kategorija 4. Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 122-355 ponovaka.
8. Bolesnik 8 (muškog pola): početak bolesti: 59. godina, etilizam. Bolesnik postaje sve manje funkcionalan i nesposoban da brine o sebi. Prisutan je oskudan govor i ponavljanje istih reči (na svako pitanje odgovara sa „dobro“). Bolesnik je imao stalnu potrebu da šeta, a javili su se i problemi spavanja. Neurološki nalaz: oromandibularne diskinezije i motorne stereotipije. MMSE: 5/30. Postavljena dijagnoza FTDbv. Porodična anamneza: pozitivna na demenciju (majka bolesnika je imala demenciju sa 47 godina). Normalni alel nosio je 5 ponovaka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 97-454 ponovka.
9. Bolesnik 9 (ženskog pola): početak bolesti: 52. godina, otežan govor i nevoljni pokreti jezika i donje vilice. Prisutan je bezrazložni strah i zaboravnost, kao i izmene na planu ponašanja u vidu kleptomanije, socijalnog zanemarivanja, apatija i gubitak empatije. Nije bila funkcionalna da vodi brigu o sebi i ličnoj higijeni. Neurološki nalaz: apraksija, poremećaj govora, oromandibularne diskinezije, dezorijentacija u prostoru i stereotipno ponašanje. MMSE: 10/30. Postavljena dijagnoza FTDbv. Porodična anamneza: pozitivna (majka je bolovala od demencije). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 40-408 ponovaka.
10. Bolesnik 10 (ženskog pola): početak bolesti: 54. godina, usporenost, odsutnost, povremena zbunjenost i nerazumevanje postavljenih pitanja. Dugoročna memorija je očuvana ali je prisutna dezorijentacija u vremenu. Bolest progredira u vidu redukcije govora koji je sveden na nivo pojedinačnih reči sa elementima eholalije, a zatim do pojave mutističnosti. Prilikom hoda prisutna slabost, nestabilnost i povlačenje leve noge koje je vremenom bilo sve teže i dovelo do nepokretnosti. MMSE: 13/30. Porodična anamneza: pozitivna (oba brata oko 50. odnosno 40. godine života imali su probleme sa govorom i hodom, preminuli su nepokretni). Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a dat je na Slici 11. Utvrđeno je da bolesnica na kraćem alelu ima 2, a na dužem alelu 24 ponovka. Alel sa 24 ponovka je klasifikovan kao intermedijerni.



Slika 11. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela.

4.2.3 Alchajmerova bolest

Grupu sa postavljenom dijagnozom Alchajmerove bolesti činilo je 176 bolesnika. 79 bolesnika je bilo muškog pola (44,89%), dok je 97 bolesnika bilo ženskog pola (55,11%). Bolest ranog početka registrovana je kod 162 bolesnika (92,05%), a kasnog početka kod 14 bolesnika (7,95%). Kliničko-demografske karakteristike bolesnika prikazane su u Tabeli 32. Kod 65/176 (36,93%) bolesnika dobijeni su podaci o postojanju pozitivne porodične anamneze, dok je 111/176 (63,07%) bolesnika imalo kategoriju 4 prema modifikovanom Goldman skoru. U okviru pozitivne porodične anamneze 7 (10,77%) bolesnika imalo je kategoriju 1, 3 (4,61%) bolesnika kategoriju 2, 15 (23,08%) bolesnika kategoriju 3 i 40 (61,54%) bolesnika kategoriju 3,5 (Grafikon 14).

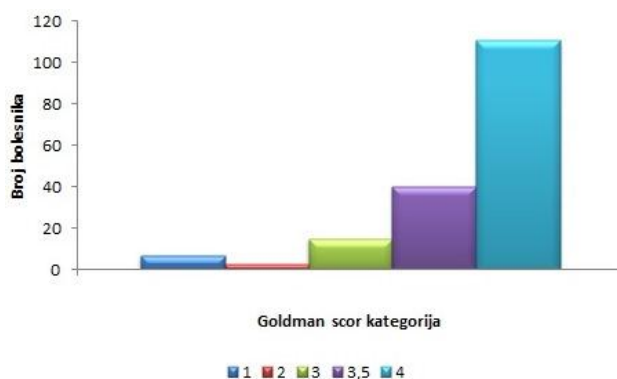
Mioklonus je registrovan kod 5/176 (2,84%) bolesnika, epilepsija kod 2/176 (1,14%) a parkinsonizam kod 1/176 (0,57%) bolesnika.

Tabela 32. Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa postavljenom dijagnozom AB.

| | SV±SD | CI | Opseg (min-max) |
|-------------------------------------|------------|---------------------|-----------------|
| Starost na početku bolesti (godine) | 57,74±6,61 | 95% CI: 56,76-58,73 | 35,0-83,0 |
| MMSE | 15,48±6,67 | 95% CI: 14,49-16,47 | 3-28 |
| Obrazovanje (godine) | 11,31±3,0 | 95% CI: 10,86-11,75 | 4-22 |

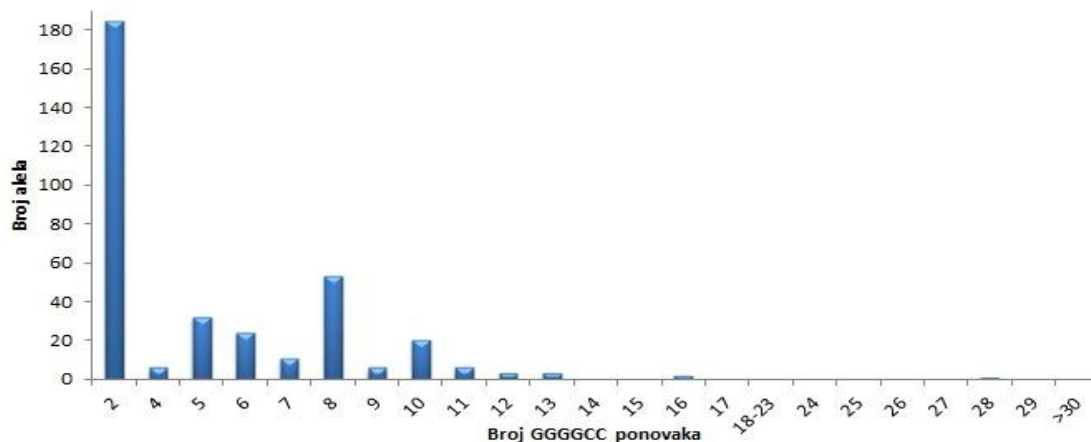
SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti

U grupi bolesnika sa dijagnozom AB nije detektovano prisustvo GGGGCC ekspanzija. Registrovan je jedan bolesnik (0,57%) nosilac 28 GGGGCC ponovaka na dužem alelu koji je okarakterisan kao intermedijerni broj ponovaka. Opis bolesnika sa intermedijernim brojem ponovaka prikazan je u Poglavlju 4.2.3.1.



Grafikon 14. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze prema modifikovanom Goldman skoru kod bolesnika sa dijagnozom AB.

U ovoj grupi najveću učestalost imao je alel sa 2 (52,56%) GGGGCC ponovka, a zatim sa 8 ponovaka (15,06%). Maksimalan broj ponovaka u okviru normalnih alela bio je 16 (0,57%). Kod 53/176 (30,11%) bolesnika zabeleženo je homozigotno prisustvo veličina *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela kod AB bolesnika prikazana je na Grafikonu 15.



Grafikon 15. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom AB

U grupi bolesnika sa dijagnozom AB nije pokazano postojanje korelacije veličine normalnih ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti, kao ni asocijacija sa porodičnom anamnezom. Rezultati statističke analize prikazani su u Tabeli 33.

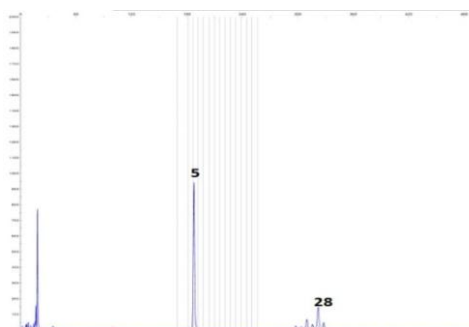
Tabela 33. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|-----------|------------|---------|--------|
| Starost na početku bolesti | r | -0,039 | 0,000 | -0,042 | -0,028 |
| | p | 0,609 | 0,997 | 0,578 | 0,709 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost

4.2.3.1 Klinička slika bolesnika sa intermedijernim brojem ponovaka

- Bolesnik 1 (ženskog pola): početak bolesti: 58. godina, zaboravnost i problemi u svakodnevnim životnim aktivnostima (zaboravljala da isključi ringlu, zaboravljala gde je krenula ili zbog čega je došla). Tegobe postaju sve izraženije i javlja se povremena dezorijentisanost. Događaje koje vidi na televiziji predstavlja kao da su iz realnog života i često konstruiše događaje koji se nisu desili. Prisutan je gubitak telesne mase sa razvojem bolesti. MMSE: 17/30. Neuropsihološki nalaz: pad u multiplim kognitivnim domenima (epizodičko pamćenje, egzekutivni deficit, vizuospcijalni ispad kao i pad na jezičkom planu imenovanja). Porodična anamneza: kategorija 4. Utvrđeno je da na kraćem alelu poseduje 5, a na dužem 28 GGGGCC ponovaka. Alel sa 28 ponovaka je okarakterisan kao intermedijerni. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a dat je na Slici 12.



Slika 12. Prikaz elektroferograma fluorescentnog PCR-a veličine *C9orf72* alela.

4.2.4 Atipična demencija

4.2.4.1 Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa atipičnom demencijom

Dijagnoza atipične demencije postavljena je kod 49 bolesnika od kojih je 22 bolesnika bilo muškog pola (44,90%), dok je 27 bolesnika bilo ženskog pola (55,10%). Bolest ranog početka registrovana je kod 40 bolesnika (81,63%), dok je bolest kasnog početka registrovana kod 9 bolesnika (18,37%). Kliničko-demografske karakteristike bolesnika prikazane su u Tabeli 34. Pozitivna porodična anamneza zabeležena je kod 25/49 (51,02%) bolesnika. U okviru pozitivne porodične anamneze nije bilo bolesnika koji su imali kategoriju 1 modifikovanog Goldman skora. Kategorija 2 bila je prisutna kod 5 (20%), kategorija 3 kod 11 (44%) i kategorija 3,5 kod 9 (36%) bolesnika. Kategorija 4 bila je prisutna kod 24/49 (48,98%) bolesnika (Grafikon 16).

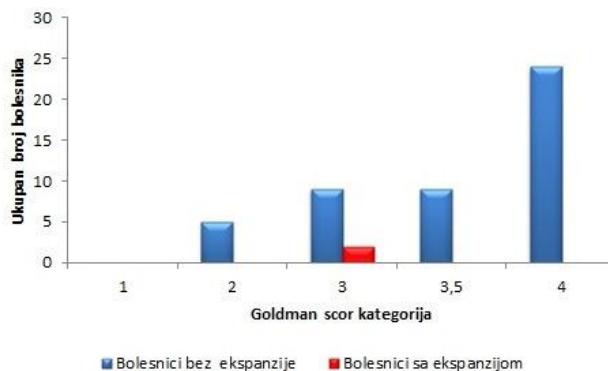
Kod 11/49 (22,45%) bolesnika registrovano je prisustvo parkinsonizma, kod po 3/49 (6,12%) PSP i kortikobazalni sindrom, mioklonus kod 2/49 (4,08%) i kod po 1/49 (2,04%) bolesnika epilepsija, horea i rapidno progresivna demencija.

Tabela 34. Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa dijagnozom atipične demencije.

| | SV±SD | CI | Opseg (min-max) |
|-------------------------------------|------------|---------------------|-----------------|
| Starost na početku bolesti (godine) | 57,55±9,64 | 95% CI: 54,78-60,32 | 30,0-76,0 |
| MMSE | 16,10±8,03 | 95% CI: 13,80-18,41 | 3-29 |
| Obrazovanje (godine) | 11,55±2,84 | 95% CI: 10,74-12,37 | 5-18 |

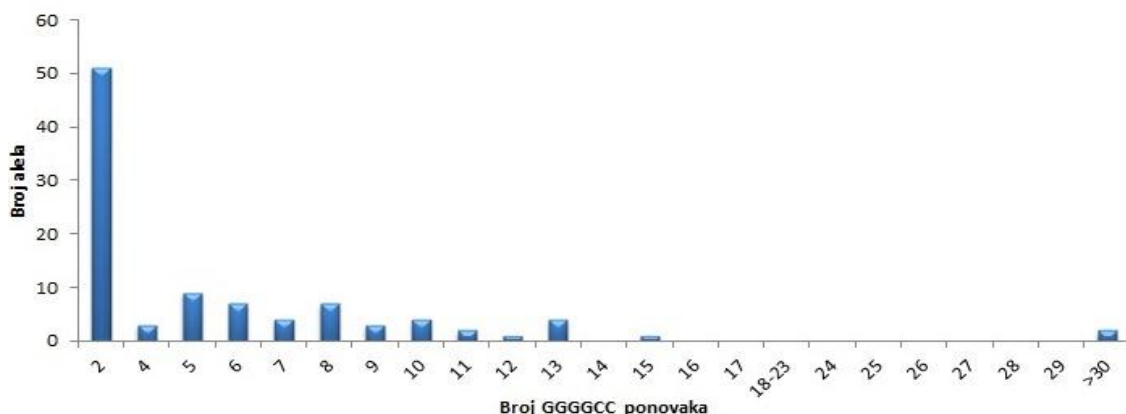
SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti

U ovoj grupi bolesnika registrovana su 2 (4,08%) bolesnika sa heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72* koji će biti kasnije opisani (Poglavlje 4.2.4.2). Kod oba bolesnika (8%) sa detektovanom heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72* zabeležena je pozitivna porodična anamneza.



Grafikon 16. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze prema modifikovanom Goldman skoru kod bolesnika sa dijagnozom atipične demencije.

Kod bolesnika sa dijagnozom atipične demencije najveću zastupljenost imao je alel sa 2 GGGGCC ponovka (52,04%), a zatim alel sa 5 ponovaka (9,18%). Maksimalan registrovan broj ponovaka u okviru normalnih alela bio je 15 (1,02%). Kod 12/49 (24,49%) bolesnika registrovane su homozigotne veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela prikazan je na Grafikonu 17.



Grafikon 17. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom atipične demencije.

Kod bolesnika bez GGGGCC ekspanzije sa dijagnozom atipične demencije nije utvrđena korelacija veličine normalnih alela sa godinama bolesnika na početku bolesti, kao ni asocijacija sa porodičnom anamnezom. Rezultati statističke analize prikazani su u Tabeli 35.

Tabela 35. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara

| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|------------------|-------------------|----------------|-------------|
| Starost na početku bolesti | r | 0,116 | 0,192 | 0,013 | 0,169 |
| | p | 0,436 | 0,196 | 0,930 | 0,256 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost

4.2.4.2 Klinička slika bolesnika sa detektovanim GGGGCC ekspanzijama u genu *C9orf72*

U grupi atipičnih demencija registrovana su 2 bolesnika (4,08%) ženskog pola sa heterozigotnom heksanukleotidnom ekspanzijom u genu *C9orf72*. Oba bolesnika su imala kategoriju 3 modifikovanog Goldman skora (Grafikon 16). Veličina ekspanzovanih ponovaka registrovana *Southern blot* metodom u ovoj grupi bolesnika bila je opsega 102-590 ponovaka.

1. Bolesnik 1 (ženskog pola): početak bolesti: 30. godina, zaboravnost u svakodnevnim životnim aktivnostima (zaboravlja stvari po kući, zaboravlja da isključi ringlu) i problemi sa govorom. MMSE: 5/30. Neurološki nalaz: prisutan „zureći pogled“, agramatizam sa elementima logopeničke afazije, apraksija. Porodična anamneza: pozitivna na ALS (tetka po ocu imala ALS). Normalni alel nosio je 2 ponovka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 102-498 ponovaka.
2. Bolesnik 2 (ženskog pola): početak bolesti: 59. godina, problemi sa govorom (govor kao da je „seckan“) i problemi u računanju. Samostalno je funkcionalna, a u međuvremenu su se pojavili padovi usled slabosti leve noge i nestabilnog hoda koje je progrediralo do nemogućnosti samostalnog hoda. Bolest je progredirala ka disfagiji i dizatriji težeg stepena. MMSE: 21/30. Neuropsihološki nalaz: blaga deteorijacija globalnog kognitivnog funkcionisanja sa diskretnim specifičnim deficitima u sferi podeljene pažnje, govora, obima neposrednog upamćivanja, evokacije ranije usvojenih informacija i izvođenja matematičkih operacija. Porodična anamneza: pozitivna. Normalni alel nosio je 6 ponovaka, dok je registrovana veličina ponovaka na dužem alelu bila opsega 304-590 ponovaka.

4.3 Preklapajući fenotip ALS/FTD i FTD/ALS

4.3.1 Kliničko-demografske karakteristike bolesnika sa preklapajućim fenotipom

U ovom istraživanju, među bolesnicima sa ALS i FTD dijagnozom ukupno je registrovano 22 bolesnika kojima je postavljena dijagnoza ALS/FTD i FTD/ALS preklapajućeg fenotipa koji su ranije spomenuti u prethodnim Poglavljima 4.1.1.1 i 4.2.2.1, vezano za ALS ili FTD zavisno od oblika kliničke prezentacije. Grupu je činilo 12 bolesnika muškog pola (54,55%) i 10 bolesnika ženskog pola (45,45%). Pozitivna porodična anamneza registrovana je kod 6/22 (27,27%), negativna porodična anamneza kod 10/22 (45,45%), dok za 6/22 (27,27%) bolesnika podaci o porodičnoj anamnezi nisu bili dostupni.

Prosečna starost na početku bolesti bolesnika sa preklapajućim fenotipom iznosila je $59,59 \pm 8,89$ (95% CI: 55,65-63,53) opsega 42,0-74,0 godina. U kohorti sa preklapajućim fenotipom između muškog i ženskog pola nije uočena značajna razlika u starosti na početku bolesti ($p=0,777$), ($59,08 \pm 8,50$ (95% CI: 53,68-64,48) godina za muškarce i $60,20 \pm 9,76$ (95% CI: 53,22-67,18) godina za žene). Uporedni prikaz kliničko-demografskih karakteristika bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije dat je u Tabeli 37.

Takođe, nije uočena značajna razlika ($p=0,906$) u starosti na početku bolesti za spinalni oblik bolesti (10 bolesnika, ($60,20 \pm 8,35$ (95% CI: 54,23-66,17)) i bulbarni oblik (11 bolesnika, $60,64 \pm 8,41$ (95% CI: 54,99-66,28)).

U ovoj grupi bolesnika je registrovano 7 (31,82%) heterozigotnih nosilaca GGGGCC ekspanzije. Grupu je činilo 4 bolesnika muškog (57,14%) i 3 bolesnika ženskog pola (42,86%). Između muškaraca i žena nije uočena značajna razlika u starosti na početku bolesti ($p=0,639$), ($58,0 \pm 8,76$ (95% CI: 44,07-71,93) godina za muškarce i $54,33 \pm 10,79$ (95% CI: 27,54-81,13) godina za žene). Kliničko-demografske karakteristike bolesnika prikazane su u Tabelama 37 i 38.

Veličina ekspanzovanih ponovaka registrovana *Southern blot* metodom u ovoj grupi bolesnika bila je opsega 54-742 ponovaka.

Kod nosilaca ekspanzije nije uočena korelacija veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti. Takođe, nije registrovana asocijacija veličine ponovaka sa spinalnim i bulbarnim početkom bolesti, kao ni sa porodičnom anamnezom. Rezultati statističke analize prikazani su u Tabeli 36.

Tabela 36. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara kod nosilaca GGGGCC ekspanzije

| | | Manji alel | Blot max |
|----------------------------|-------|------------|----------|
| Starost na početku bolesti | r_s | 0,401 | -0,071 |
| | p | 0,373 | 0,879 |
| Spinalni/bulbarni | t | 1,964 | 1,080 |
| | p | 0,188 | 0,341 |

r_s - Spirmanov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t -vrednost t testa

Poređenjem bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije nije uočena značajna razlika u zastupljenosti muškog i ženskog pola ($p=0,867$), (Tabela 37).

Kod bolesnika bez i sa GGGGCC ekspanzijom ponovaka u genu *C9orf72* nije uočena značajna razlika u starosti na početku bolesti ($p=0,264$), (Tabela 37).

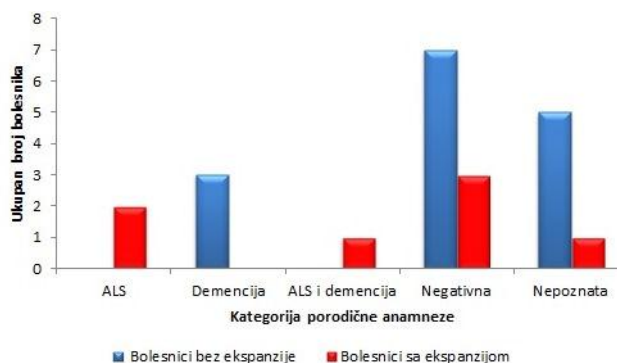
U okviru grupe bolesnika sa pozitivnom porodičnom anamnezom 2/6 (33,33%) bolesnika je imalo pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS i registrovanu GGGGCC ekspanziju. Kod 3/6 (50%) bolesnika bez detektovane ekspanzije uočavala se porodična anamneza u vidu srodnika sa demencijom, dok je 1/6 (16,67%) bolesnik imao pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS i demenciju istovremeno sa GGGGCC ekspanzijom. U okviru negativne porodične anamneze, 3/10 (30%) bolesnika imalo je GGGGCC ekspanziju, dok za jednog bolesnika (16,67%) sa GGGGCC

ekspanzijom podaci o porodičnoj anamnezi nisu bili dostupni. Zastupljenost porodične anamneze prikazana je na Grafikonu 18. Poređenjem bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije nije uočeno da postoji značajna razlika u zastupljenosti porodične anamneze ($p=0,424$), (Tabela 37).

Tabela 37. Prikaz kliničko-demografskih karakteristika ALS/FTD i FTD/ALS bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije

| | Pozitivni na GGGGCC ekspanziju | Negativni na GGGGCC ekspanziju | p vrednost |
|---|---|---|-------------------|
| Pol | | | |
| muški | 57,14% | 53,33% | 0,867 |
| ženski | 42,86% | 46,67% | |
| Početak | | | |
| spinalni | 50% | 46,67% | 0,890 |
| bulbarni | 50% | 53,33% | |
| Pozitivna porodična anamneza | 50% | 30% | $p=0,424$ |
| Starost na početku bolesti: SV \pm SD; (95% CI) Opseg: min-max | 56,43 \pm 9,00; (48,11-64,75) 42,0-67,0 | 61,07 \pm 8,75; (56,22-65,91) 46,0-74,0 | $p=0,264$ |

SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija; CI-interval poverenja srednje vrednosti



Grafikon 18. Prikaz zastupljenosti porodične anamneze kod bolesnika sa dijagnozom ALS/FTD i FTD/ALS.

U okviru spinalne forme ALS-a koja je registrovana kod 10 bolesnika (9 muškaraca i 1 žena, 45,45%) uočena su i 3 (30%) bolesnika sa GGGGCC ekspanzijom, dok su u grupi sa bulbarnom formom ALS-a (11 bolesnika (3 muškarca i 8 žena, 50%)) takođe 3 (27,27%) bolesnika bili nosioci GGGGCC ekspanzije. Podaci o obliku ALS-a nisu bili dostupni za 1/22 (4,55%) bolesnika koji je istovremeno bio i nosilac GGGGCC ekspanzije. Detaljan prikaz forme ALS-a kod ALS/FTD i FTD/ALS bolesnika dat je u Tabeli 38. Kod bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije nije uočena značajna razlika u zastupljenosti spinalnog i bulbarnog početka bolesti ($p=0,890$), (Tabela 37).

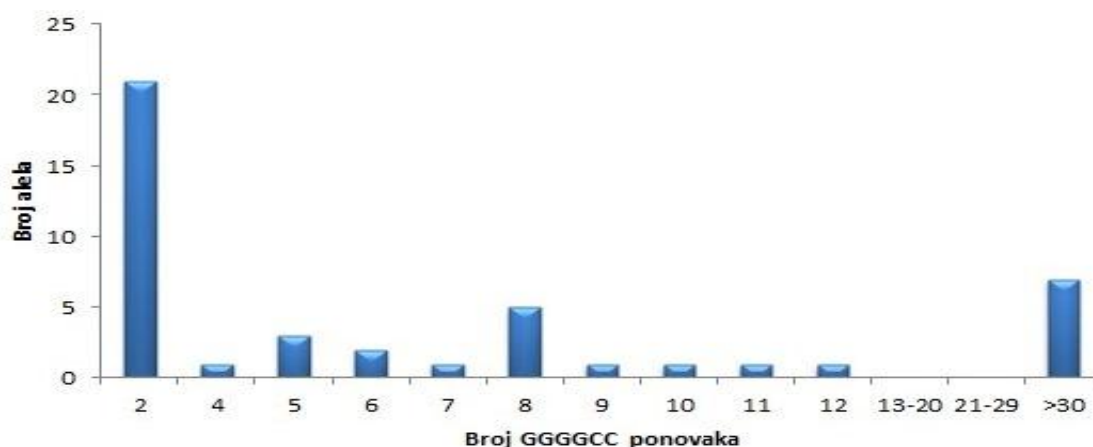
Kod bolesnika sa ekspanzijom i spinalnim i bulbarnim početkom bolesti nije uočena značajna razlika u starosti na početku bolesti ($p=0,580$), (60,67 \pm 8,50 (95% CI: 39,54-81,79) godina za spinalni oblik i 57,0 \pm 6,24 (95% CI: 41,48-72,51) godina za bulbarni oblik).

Tabela 38. Prikaz oblika početka bolesti kod ALS/FTD i FTD/ALS bolesnika

| | Cela kohorta (22) | Pozitivni na GGGGCC ekspanziju (6) | Negativni na GGGGCC ekspanziju (15) |
|-------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Spinalni početak | 10 (45,45%) | 3 (42,86%) | 7 (46,67%) |
| Pol (muški %) | 90% | 100% | 85,71% |
| GGGGCC ekspanzija | 3 (30%) | / | / |
| GE | 9 (90%) | 2 (66,67%) | 7 (100%) |
| GE-levo | 1 (11,11%) | 1 (50%) | / |
| GE-desno | 3 (33,33%) | 1 (50%%) | 2 (28,57%) |
| GE-oba | 5 (55,56%) | / | 5 (71,43%) |
| DE | 1 (10%) | 1 (33,33%) | / |
| DE-levo | 1 (100%) | 1 (100%) | / |
| DE-desno | / | / | / |
| DE-oba | / | / | / |
| GE+DE | / | / | / |
| GE+DE-levo | / | / | / |
| GE+DE-desno | / | / | / |
| GE+DE-oba | / | / | / |
| Bulbarni početak | 11 (50%) | 3 (42,86%) | 8 (53,33%) |
| Pol (muški %) | 27,27% | 33,33% | 25% |
| GGGGCC ekspanzija | 3 (27,27%) | / | / |

GE-gornji ekstremiteti; DE-donji ekstremiteti

U grupi sa preklapajućim fenotipom najveću zastupljenost imao je alel sa 2 GGGGCC ponovka (47,73%), a zatim alel sa 8 GGGGCC ponovaka (11,36%). Najveći broj registrovanih ponovaka u okviru grupe normalnih alela bio je 12 (2,27%). Četiri bolesnika (18,18%) su bili homozigoti za veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela prikazan je na Grafikonu 19.



Grafikon 19. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod bolesnika sa dijagnozom ALS/FTD.

U kohorti bolesnika sa preklapajućim fenotipom bez registrovane GGGGCC ekspanzije nije uočena korelacija veličine normalnih alela sa godinama bolesnika na početku bolesti. Ne postoji značajna razlika u veličini ponovaka u odnosu na spinalni i bulbarni početak bolesti, kao ni asocijacija sa porodičnom anamnezom. Rezultati statističke analize prikazani su u Tabeli 39.

Tabela 39. Prikaz rezultata statistike povezanosti veličine ponovaka i posmatranih parametara kod bolesnika bez GGGGCC ekspanzije

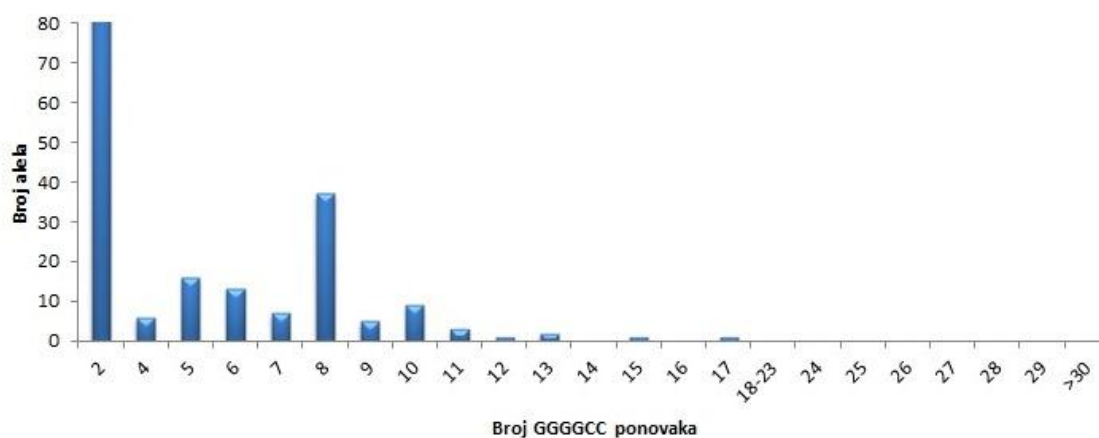
| | | Veći alel | Manji alel | Razlika | Zbir |
|----------------------------|---|-----------|------------|---------|--------|
| Starost na početku bolesti | r | 0,126 | 0,451 | -0,198 | 0,284 |
| | p | 0,655 | 0,091 | 0,480 | 0,304 |
| Spinalni/bulbarni | t | -0,102 | -1,926 | 1,178 | -0,836 |
| | p | 0,920 | 0,096 | 0,260 | 0,424 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost; t-vrednost t testa;

4.4 Kontrole

Kontrolna grupa se sastojala od 96 zdravih ispitanika u okviru koje je 27 ispitanika bilo muškog pola (28,12%), dok je 69 ispitanika bilo ženskog pola (71,87%). Nije detektovano prisustvo GGGGCC ekspanzija. Prosečna starost u trenutku uzorkovanja krvi u kontrolnoj grupi iznosila je $56,37 \pm 12,67$ (95% CI: 53,81-58,94) opsega 36,0-88,0 godina.

U okviru normalnih alela najveću učestalost je imao alel sa 2 ponovka (47,40%), a zatim alel sa 8 ponovaka (19,30%). Maksimalan registrovan broj ponovaka u okviru normalnih alela bio je 17 (0,50%). Kod 24/96 (25%) ispitanika zabeležene su homozigotne veličine *C9orf72* alela. Raspodela učestalosti veličina *C9orf72* alela prikazan je na Grafikonu 20.



Grafikon 20. Distribucija učestalosti *C9orf72* alela kod zdravih kontrola.

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji, na uzorku od 1052 bolesnika iz Srbije sa različitim neurodegenerativnim oboljenjima, urađena je procena veličina *C9orf72* alela i identifikovani su bolesnici nosioci GGGGCC ekspanzije. Ukupno je registrovano 42 bolesnika (3,99%) sa ekspanzijom GGGGCC ponovaka i to 31 bolesnik sa dijagnozom ALS, 9 bolesnika sa FTD i 2 bolesnika sa atipičnom demencijom, dok je kod 6 bolesnika uočeno prisustvo intermedijerne veličine ponovaka na dužem alelu (1 bolesnik sa dijagnozom ALS, 2 sa fenokopijom HB, 1 sa PSP, 1 sa FTD i 1 bolesnik sa AB). Takođe, registrovana su i 3 asimptomatska nosioca, srodnika bolesnice sa prisustvom intermedijernog alela, takođe sa intermedijernom veličinom ponovaka na dužem alelu u genu *C9orf72*, dok su u kontrolnoj grupi registrovane samo veličine normalnih alela.

Kod ALS bolesnika nosilaca ekspanzije uočeno je češće prisustvo pozitivne porodične anamneze kao i prisustvo FTD-a u odnosu na bolesnike koji nisu bili nosioci. Nosioci ekspanzije sa dijagnozom FTD imali su u proseku raniji početak bolesti, značajno češće prisustvo pozitivne porodične anamneze kao i prisustvo ALS-a, u poređenju sa bolesnicima bez ekspanzije. Pokazana je povezanost veličine ponovaka sa porodičnom anamnezom kod bolesnika sa dijagnozom PSP kao i kod ALS bolesnika. Kod FTD bolesnika bez ekspanzije uočena je negativna korelacija veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti. Klinička slika nosilaca ekspanzije sa dijagnozom FTD obuhvatala je prisustvo bihevijoralnih izmena kao i preklapajućih sindroma. Kod nosilaca ekspanzije sa dijagnozom atipične demencije zabeleženo je prisustvo agramatizma, apraksije, problemi sa govorom, znaci spinocerebelarne ataksije, dizartrijske i disfagije. Nosioci intermedijerne veličine alela ispoljavali su kliničku sliku: amiotrofične lateralne skleroze, bolesti slične Huntingtonovoj bolesti, kliničku sliku progresivne supranuklearne paralize, frontotemporalne demencije ranog početka kao i kliničku sliku Alchajmerove bolesti ranog početka.

5.1 Bolesti sa predominantno motornim poremećajima

5.1.1 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom

U našem istraživanju na teritoriji Srbije, od ukupnog broja testiranih bolesnika sa ALS dijagnozom, učestalost nosilaca GGGGCC ekspanzije je iznosila 8,09%, što je slično dobijenim podacima u nekim evropskim studijama: 8,97% u Irskoj (Byrne et al., 2012), 7,56% u Nemačkoj (Majounie et al., 2012b), 9,55% u Italiji (Majounie et al., 2012b) i 8,06% u Ujedinjenom Kraljevstvu (Beck et al., 2013). Dosadašnja istraživanja pokazala su da učestalost GGGGCC ekspanzija pokazuje različitu geografsku distribuciju sa najvećom učestalošću u Evropi, a najmanjom u Aziji (Majounie et al., 2012b, Zou et al., 2017). U evropskim populacijama postoji visoka prevalencija haplotipa rizika uz pretpostavku da se velika patogena ekspanzija dogodila samo jednom po tipu efekta osnivača pre oko 6300 godina (Smith et al., 2013). Međutim, kasnija analiza u populaciji Švedske je pokazala da kod nosilaca ekspanzije postoje najmanje dva haplotipa rizika (Chiang et al., 2016).

Kod ALS bolesnika iz Srbije, učestalost od 15,62% nosilaca GGGGCC ekspanzije kod FALS slučajeva manja je nego prethodno prijavljena učestalost u evropskim populacijama od 33,7% (Zou et al., 2017). Ovakav rezultat može se objasniti nedostatkom potpunih podataka i medicinske dokumentacije za članove porodice koji nam nisu bili dostupni. Kada su prvi put otkrivene, ekspanzije GGGGCC ponovaka bile su opisane kod 46,4% familijarnih i 21% sporadičnih ALS slučajeva u Finskoj, dok je u populacijama van Finske registrovano prisustvo kod 38,1% FALS slučajeva (Renton et al., 2011). U populaciji Srbije, mutacije u genu *SOD1* su detektovane su kod 27 ALS bolesnika, odnosno kod 14 FALS, što čini 73% svih genetički potvrđenih slučajeva ALS-a (Marjanovic et al., 2017).

U ovoj studiji kod članova porodice registrovano je prisustvo psihijatrijskih tegoba, suicida i demencije koji su takođe uključeni u pozitivnu porodičnu anamnezu. Skorija istraživanja pokazuju

da prisustvo navedenih poremećaja među članovima porodice ALS bolesnika nije neuobičajeno (O'Brien et al., 2017, Ryan et al., 2018, Laaksovirta et al., 2022) i da ove proširene fenotipove treba uzeti u razmatranje kada se određuje stopa FALS-a (Ryan et al., 2018). Takođe, u literaturi je prijavljeno prisustvo PB među srodnicima ALS bolesnika i nosilaca ekspanzije (Fallis and Hardiman, 2009, Cooper-Knock et al., 2012, Laaksovirta et al., 2022) kao i u ovom istraživanju. Ako uzmemo u obzir psihijatrijske tegobe zajedno sa demencijom i PB, u našem istraživanju stopa pacijenata sa pozitivnom porodičnom anamnezom (uključujući ALS) povećava se na 14,62% ALS bolesnika od kojih su 17,86% nosioci GGGGCC ekspanzije. Oba načina određivanja stope FALS slučajeva daju sličnu učestalost GGGGCC ekspanzije kao što je prijavljena sveukupna stopa od 16% (Marogianni et al., 2019). Učestalost ekspanzije u genu *C9orf72* kod sporadičnih slučajeva ALS-a u populaciji Srbije iznosi 7,12% i u saglasnosti je sa dobijenim podacima iz literature od 6-8% (Marogianni et al., 2019). Najveća učestalost mutacija u analiziranoj ALS kohorti u ovoj studiji zabeležena je kod bolesnika sa preklapajućim ALS/FTD fenotipom (29,41%). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom na prethodno objavljenu učestalost mutacije kod ovih bolesnika od skoro 30% (Marogianni et al., 2019).

U studiji koja je obuhvatila učesnike iz Evrope i Severne Amerike, Xi et al. su registrovali značajno veće prisustvo familijarnih slučajeva kod nosilaca ekspanzije (50% vs. 8,2%) (Xi et al., 2012). U poređenju sa bolesnicima bez GGGGCC ekspanzije, nosioci ekspanzije u našoj studiji imali su znatno češće prisustvo pozitivne porodične anamneze sa proširenim fenotipovima (15,65% vs. 34,48%).

Na osnovu epidemiološke studije na globalnom nivou, prosečna starost na početku bolesti ALS bolesnika iznosi 62 godine (Chio et al., 2013) i razlikuje se među populacijama (Chio et al., 2009). U ovoj studiji na teritoriji Srbije, prosečna starost na početku bolesti je nešto niža i iznosila je 58,33 godine (58,06 kod muškaraca i 58,66 kod žena). Nije uočena značajna razlika u starosti bolesnika na početku bolesti u odnosu na pol ($p=0,599$) kao što je pokazano u italijanskoj studiji u ukupnom posmatranom periodu od 45 godina (Govoni et al., 2017). Sličan podatak za starost na početku bolesti (57,7 godina) kao i nepostojanje razlike u godinama početka bolesti kod muškaraca i žena, dobijen je u prethodnoj studiji iz naše populacije (Stevic et al., 2016).

Prema literaturi, opseg starosti na početku bolesti kod ALS GGGGCC nosilaca ekspanzije je veoma širok i kreće se od 25-83 godine (Cooper-Knock et al., 2012, Majounie et al., 2012b, Mok et al., 2012b, Stewart et al., 2012). U nekoliko studija do sada registrovano je da ALS nosioci ekspanzije imaju raniji početak bolesti u odnosu na bolesnike koji nisu nosioci (Byrne et al., 2012, van Rheenen et al., 2012, Garcia-Redondo et al., 2013). Ipak, druge studije nisu dobile ovakve rezultate (Umoh et al., 2016, Ratti et al., 2012, Xi et al., 2012) kao što je slučaj i sa našim ALS bolesnicima. Prosečna starost na početku bolesti kod ALS nosilaca ekspanzije u našoj populaciji iznosila je 59,29 godina dok kod bolesnika koji nisu nosioci ekspanzije bila 58,25 godina ($p=0,611$). Potrebno je pomenuti da je naša grupa bolesnika bez GGGGCC ekspanzije takođe obuhvatala bolesnike sa poznatim mutacijama u genima *SOD1*, *ANG* i *FUS* za koje se zna da imaju raniji početak bolesti (Connolly et al., 2020) što je moglo imati uticaja na dobijeni rezultat.

Meta analiza (Curtis et al., 2017) koja se bavila ispitivanjem razlika u prevalenciji mutacija kod ALS i FTD bolesnika kod bolesnika različitog pola, ukazuje da kod ALS nosilaca ekspanzije postoji 16% veća prevalencija u korist ženskog pola. S obzirom da je kod naših ALS nosilaca GGGGCC ekspanzije muški i ženski pol bio skoro podjednako zastupljen (51,61% i 48,39% redom), odnos rizika nije računat. Takođe, nije pokazana ni značajna razlika u zastupljenosti polova kod ALS bolesnika sa i bez GGGGCC ekspanzije ($p=0,707$) što odgovara postojećim podacima (Xi et al., 2012, Byrne et al., 2012).

U ovoj studiji sa teritorije Srbije registrovana je veća zastupljenost spinalne forme bolesti u celokupnoj kohorti ALS bolesnika (79,11%) ali i kod nosilaca GGGGCC ekspanzije (77,42%). Prema podacima iz literature, kod ALS bolesnika spinalni početak bolesti je zastupljen čak do 82% (Wijesekera and Leigh, 2009, Chiò et al., 2009, Longinetti and Fang, 2019). Oblik početka bolesti kod nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* takođe govori u prilog većoj učestalosti spinalnog fenotipa (Mok et al., 2012b, Byrne et al., 2012, Cooper-Knock et al., 2012). Neka od prethodnih istraživanja

pokazuju da je bulbarni fenotip statistički češći kod nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* (Ratti et al., 2012, Rutherford et al., 2012a, Ungaro et al., 2021), međutim, u drugim istraživanjima nije registrovana ova značajnost (Byrne et al., 2012, Cooper-Knock et al., 2012, Garcia-Redondo et al., 2013) kao ni u ovoj studiji ($p=0,738$).

Kod bulbarnog oblika ALS-a zapaženo je da bolest počinje kasnije u odnosu na spinalni i do 10,5 godina (Pinto and de Carvalho, 2017, Turgut et al., 2019). U skladu sa ovim podacima, u ovom istraživanju ALS bolesnici sa spinalnim početkom su imali 6 godina raniji početak bolesti ($p<0,0001$).

Na osnovu podataka iz literature kod nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* sa spinalnim početkom, bolest počinje ranije u proseku za dve godine ($p=0,02$) u odnosu na nosioce ekspanzije sa bulbarnim početkom (Murphy et al., 2017). U našoj kohorti bolesnici sa spinalnom formom imali su kasniji početak bolesti u odnosu na bolesnike sa bulbarnom formom, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost ($p=0,514$). Ovakav rezultat je moguće posledica malog broja analiziranih bolesnika sa ekspanzijom u našoj kohorti.

Već dugi niz godina unazad postoje podaci o kliničkoj povezanosti ALS-a i FTD-a (Hudson, 1981, Cavalleri and De Renzi, 1994, Lomen-Hoerth et al., 2002), gde pored kliničkih dolazi do preklapanja i neuropatoloških karakteristika (Lillo and Hodges, 2009). U analiziranoj kohorti u našem istraživanju komorbiditet sa FTD registrovan je kod ukupno 4,44% ALS bolesnika. Kod nosilaca ekspanzije dokumentovana je veća učestalost komorbiditeta sa FTD-om u odnosu na bolesnike bez ekspanzije (16,13% vs 3,41%, redom $p=0,001$), što je podržano podacima iz literature (Byrne et al., 2012, Garcia-Redondo et al., 2013, Umoh et al., 2016, Laaksovirta et al., 2022). Takođe, prisustvo blagog kognitivnog poremećaja u egzekutivnom domenu dokumentovano je kod skoro polovine bolesnika sa ekspanzijom. Ukupno gledano, kognitivni poremećaj kod nosilaca ekspanzije u ALS kohorti imalo je 61,29% bolesnika i ovako visok procenat kognitivnih poremećaja u saglasnosti je sa postojećim podacima (Byrne et al., 2012).

Distribucija učestalosti veličina normalnih alela gena *C9orf72* u našoj ALS kohorti pokazuje da je najveću učestalost imao alel sa 2 ponovka, a zatim aleli sa 5 i 8 ponovaka. Ovakva distribucija učestalosti veličina *C9orf72* alela prisutna je kod ALS bolesnika i u drugom istraživanju (Rutherford et al., 2012b). Svi ALS bolesnici iz naše studije kod kojih je registrovano prisustvo ekspanzije bili su heterozigotni nosioci. Homozigotni nosioci ekspanzije su veoma retki i prema dosadašnjim podacima u literaturi su opisana dva homozigotna nosioca ekspanzije, oba sa dijagnozom FTD±ALS (Fratta et al., 2013, Ramos et al., 2020), kao i jedan složeni heterozigotni nosilac ekspanzije sa različitom veličinom ekspanzovanih ponovaka na alelima, takođe sa dijagnozom FTD (Cooper-Knock et al., 2013).

Dodatno, kod jednog ALS nosioca ekspanzije u genu *C9orf72* registrovane su i dve nesinonimne varijante u heterozigotnom statusu u genima *ANG* i *FUS*, što je opisano u prethodnoj studiji iz naše kohorte (Marjanovic et al., 2017). Bolesnik nosilac mutacije u ova tri gena imao je početak bolesti u 73 godine u vidu spinalne forme i prisustva egzekutivne disfunkcije u neuropsihološkom nalazu. U porodičnoj anamnezi, bolest je bila prisutna kod nekoliko članova porodice. Međutim, prema našim saznanjima, krv obolelih srodnika nije bila dostupna za genetičke analize. Prisustvo mutacija u više od jednog gena koji se vezuju za ALS već je ranije dokumentovano u literaturi (van Blitterswijk et al., 2012, Krüger et al., 2016). Varijanta p.K17I u genu *ANG* je varijanta koja postoji u bazama podataka ClinVar (Landrum et al., 2018) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), LOVD (Fokkema et al., 2011) (<https://www.lovd.nl/>) i HGMD (Stenson et al., 2003) (<https://www.hgmd.cf.ac.uk>) sa različitim interpretacijama patogenosti: od verovatno benigne do verovatno patogene varijante. Na osnovu rezultata dobijenih putem funkcionalnih eseja, ova varijanta je jedna od varijanti u genu *ANG* koje dovode do potpunog gubitka funkcije proteina (Wu et al., 2007). Takođe, pokazana je smanjena neuroprotektivna aktivnost prilikom izlaganja hipoksiji, što dalje govori u prilog mehanizmu gubitka funkcije (Sebastià et al., 2009). Prema dosadašnjim podacima, ova varijanta u genu *ANG* je zabeležena kod bolesnika zajedno sa mutacijama u genima *FUS* i *TARDBP*, ali i u 2/1582 kontrole (van Blitterswijk et al., 2012). Druga varijanta u genu *FUS*: p.H517P registrovana je u japanskoj studiji FALS

bolesnika (Suzuki et al., 2010). Varijanta je prisutna u bazama podataka LOVD i HGMD, dok su u ClinVar bazi na datoj proteinskoj poziciji opisane druge aminokiselinske promene sa različitim tumačenjem patogenog efekta: od varijante nejasnog značaja do patogene varijante. Prema našim saznanjima, u literaturi ne postoji podaci funkcionalnih analiza za varijantu H517P. U genu *FUS* opisano je preko 50 različitih varijanti koje se vezuju za ALS, dok su kod bolesnika sa kliničkom slikom FTLD, *FUS* mutacije retke (Deng et al., 2014). U studiji koja je registrovala K17I varijantu kod 10 članova porodice zabeležen je raniji početak bolesti pre 50 godine života, osim kod jednog nosioca varijante starosti 75 godina, ali bez znakova ALS-a (van Es et al., 2009a). Takođe, nosioci varijanti u *FUS* genu iz japanske studije, među kojima je i varijanta H517P, imali su rani početak bolesti oko 30 godine života, pri čemu su uglavnom bili zahvaćeni donji motorni neuroni (Suzuki et al., 2010) kao i kod našeg bolesnika. Sa druge strane, naš bolesnik je prve simptome bolesti ispoljio tek u 73 godine života. van Es i saradnici su kod jednog nosioca K17I opisali prisustvo simptoma karakterističnih za FTD (van Es et al., 2009a), dok je kod našeg bolesnika neuropsihološki nalaz ukazivao na prisustvo egzekutivne disfunkcije. Posmatrajući gen *C9orf72*, opseg početka bolesti nosilaca ekspanzije je veoma širok (Cooper-Knock et al., 2012, Majounie et al., 2012b, Mok et al., 2012b, Stewart et al., 2012) i skoro potpuna penetrantnost je dostignuta sa 80 godina života (Majounie et al., 2012b). Takođe, kognitivne tegobe kod nosilaca ekspanzije zastupljene su u visokom procentu (Byrne et al., 2012). Imajući u vidu gore navedeno i činjenicu da je ALS multifaktorijalno oboljenje sa pokazanom oligogenom etiologijom (van Blitterswijk et al., 2012), ne možemo sa sigurnošću da tvrdimo koja od navedenih promena u ovim genima ima ključan patognomonični efekat kod ovog bolesnika. Moguće je da patološka ekspanzija u genu *C9orf72* dovodi do kasnijeg ispoljavanja kliničke slike kod našeg bolesnika, dok navedene varijante u genima *ANG* i *FUS* imaju manji klinički doprinos. Svakako, ovaj rezultat oporavdava uključivanje bolesnika sa drugim ALS mutacijama u našu studiju.

Glavno ograničenje ove studije predstavlja relativno mala veličina analizirane kohorte kao i određena nepreciznost podataka o porodičnoj anamnezi kod bolesnika kod kojih je zabeleženo odsustvo pozitivne porodične anamneze. Usled nedostajuće medicinske dokumentacije porodična anamneza nije uzimana u obzir ukoliko dijagnoze nisu bile potvrđene. Takođe, *Southern blot* metodom nismo uspeli da dobijemo izuzetno velike alele ekspanzovanih ponovaka kao što je registrovano u drugim studijama. Opseg zabeleženih ekspanzovanih ponovaka u ovoj studiji kretao se od 32-706 ponovaka.

Rezultati našeg istraživanja naglašavaju značaj genetičkog testiranja na prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72* kod svih bolesnika sa dijagnozom ALS-a u našoj populaciji, posebno ukoliko je prisutan FTD i egzekutivna disfunkcija.

5.1.2 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa bolesti sličnoj Hantingtonovoj bolesti i atipičnim parkinsonizmima (multipla sistemska atrofija i progresivna supranuklearna paraliza)

U ovom istraživanju je obuhvaćeno 80 bolesnika sa fenokopijom HB kod kojih nije detektovano prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72*. Jedan od mogućih razloga za ovakav rezultat, što istovremeno predstavlja i ograničenje ove studije, jeste relativno mala kohorta analiziranih bolesnika. Sa druge strane, primenjeni su i striktni kriterijumi za postavljanje dijagnoze fenokopije HB (Kostic et al., 2014). Odsustvo ekspanzija u genu *C9orf72* kod HB sličnih bolesnika prijavljeno je i u drugim populacijama: Francuska (Mariani et al., 2016), Južna Afrika (Baine et al., 2018), Indija (Kaur et al., 2020), pri čemu je broj testiranih bolesnika u datim kohortama isto bio relativno mali i nije prelazio 100. Takođe, prisustvo GGGGCC ekspanzije kod HB sličnih bolesnika nije registrovano ni u Latinskoj Americi (Walker et al., 2018). Prethodno istraživanje prisustva ekspanzija u genu *C9orf72* kod HB sličnih bolesnika u našoj populaciji pokazalo je prisutvo jedne bolesnice koja je bio nosilac GGGGCC ekspanzije (Kostic et al., 2014). Ova bolesnica je uključena i u našu studiju (Bolesnik 9, Poglavlje 4.2.2.2). Klinička slika bolesnice je inicijalno počela kao HB

fenokopija sa nevoljnim pokretima, problemima sa govorom i prisustvom oromandibularnih diskinezija, da bi vremenom došlo do pogoršanja kliničke slike i kognitivnog pada sa razvojem kliničke slike FTD.

Kod bolesnika sa HB sličnom bolesti na teritoriji Srbije najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka, dok je najveći broj registrovanih ponovaka bio 14. Posle alela sa 2 ponovka najveću učestalost u kohorti imali su aleli sa 8 i 5 ponovka redom, što odgovara dostupnim podacima za učestalost alela sa navedenim veličinama ponovaka, pri čemu je u drugoj studiji učestalost alela sa 5 ponovaka nešto veća od alela sa 8 ponovaka (Ida et al., 2018).

Na osnovu predloženog algoritma za testiranje bolesnika kod kojih je isključeno prisustvo CAG ekspanzije u genu *HTT*, analiza na prisustvo GGGGCC ekspanzija u genu *C9orf72* predstavlja prvi sledeći korak u analizi fenokopija HB (Hensman Moss et al., 2014). Na osnovu dobijenih rezultata iz našeg istraživanja, genetičko testiranje kod ovih bolesnika je potrebno sprovoditi u prisustvu pozitivne porodične anamneze i verifikovanog prisustva ekspanzije u porodici.

U ovoj studiji takođe je istraživano moguće prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* kod bolesnika kojima je postavljena klinička dijagnoza MSA i PSP koje nije uočeno, te distribucija veličina normalnih *C9orf72* alela.

Broj ponovaka u okviru normalnih alela u našoj studiji nije prelazio 14 kod MSA bolesnika i 17 u grupi PSP bolesnika. Ovi rezultati su u skladu sa objavljenim podacima iz literature gde je distribucija normalnih ponovaka u rangu 2-14 kod MSA (Akimoto et al., 2013, Chen et al., 2016a) i 2-18 kod PSP bolesnika (Akimoto et al., 2013, Ticozzi et al., 2014). Dalje, za alele u normalnom opsegu veličina do 20 ponovaka, podaci iz literature pokazuju da 92,3% bolesnika ima manje od 10 ponovaka (Akimoto et al., 2013). Slično podacima iz literature, u našim analiziranim kohortama MSA i PSP bolesnika 91,45% alela imalo je do 10 ponovaka.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da su kod MSA bolesnika ekspanzije GGGGCC ponovaka detektovane u prisustvu pozitivne porodične anamneze na ALS (Goldman et al., 2014, Lindquist et al., 2013). Sa druge strane, nekoliko studija na kohortama američkih, evropskih (Scholz et al., 2015, Schottlaender et al., 2015), kineskih (Chen et al., 2016a, Sun et al., 2015) i tajvanskih (Hsiao et al., 2014) MSA bolesnika, nisu pokazale povezanost između ekspanzija u genu *C9orf72* i MSA.

U kohortama PSP bolesnika nekoliko studija je prijavilo veličine *C9orf72* ponovaka u patološkom opsegu: 0,8-8,33% (Lesage et al., 2013, Origone et al., 2013) od ukupnog broja testiranih bolesnika i 5,9-7% među bolesnicima sa pozitivnom porodičnom anamnezom (Lesage et al., 2013, Le Ber et al., 2013). Ipak potrebno je naglasiti da je broj PSP bolesnika uključen u ove studije varijabilan i da je istraživanje sa najvećom prijavljenom frekvencom nosilaca ekspanzije (8,33%) obuhvatalo samo 12 bolesnika, odnosno registrovan je samo 1 bolesnik nosilac ekspanzija u genu *C9orf72* (Origone et al., 2013). Nekoliko drugih studija nije detektovalo prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* kod PSP bolesnika (Ogaki et al., 2013, Schottlaender et al., 2015, Galimberti et al., 2013, Yeh et al., 2013).

Iako je do sada nekoliko slučajeva registrovano sa GGGGCC ekspanzijom u genu *C9orf72* u PB (Lesage et al., 2013), kortikobazalnom sindromu (Schottlaender et al., 2015), PSP (Le Ber et al., 2013, Lesage et al., 2013, Origone et al., 2013, Wilke et al., 2016) i demenciji Lewijevih tela (Snowden et al., 2012a), generalno ne postoji dovoljno dokaza da bi se GGGGCC ekspanzije označile kao uzročnici PB ili atipičnog parkinsonizma (pregled dat u (Bourinaris and Houlden, 2018)). Ipak, iako su analizirane MSA i PSP kohorte u ovoj studiji relativno skromne veličine i ne mogu se doneti generalni zaključci o ulozi ekspanzovanih alela u MSA i PSP, dalja istraživanja i meta analize mogu pomoći u rasvetljavanju ovih pitanja.

Tako, i na osnovu rezultata našeg istraživanja može se zaključiti da ekspanzije u genu *C9orf72* ne predstavljaju genetički uzrok atipičnog parkinsonizma u populaciji Srbije. Sa druge strane, testiranje je potrebno sprovoditi ukoliko postoji pozitivna porodična anamneza za ALS i FTD kao i već prisustva ekspanzija u genu *C9orf72* u porodici.

5.1.3 Kliničko-genetičke korelacije veličine GGGGCC ponovaka u bolestima sa predominantno motornim poremećajima

Studije korelacije veličine GGGGCC ponovaka u različitim tkivima i određenih kliničkih parametara kod ALS i FTD bolesnika daju podatke o postojanju pozitivne, negativne kao i o odsustvu korelacije (Van Mossevelde et al., 2017a). Među ALS bolesnicima koji nisu bili nosioci ekspanzije u genu *C9orf72* u ovoj studiji nije registrovana značajna korelacija veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti kao što je ranije zabeleženo u literaturi (Rutherford et al., 2012b), sa napomenom da su u ovoj studiji iz naše populacije normalnim alelima smatrane veličine do 19 ponovaka.

Prema dosadašnjim podacima iz literature kada govorimo o veličini normalnih alela i njihovoj asocijaciji sa rizikom za nastanak ALS-a, ta povezanost nije uočena s obzirom da nisu zabeležene razlike u dužini neekspandovanih alela kod bolesnika i kontrola (Garcia-Redondo et al., 2013). Poređenjem dužeg alela kod SALS bolesnika i kontrola takođe nije uočena značajna razlika u distribuciji alela, niti je najveći broj ponovaka kod bolesnika bez ekspanzije u korelaciji sa godinama početka bolesti, oblikom početka bolesti ili trajanjem bolesti (Harms et al., 2013b). U belgijskoj kohorti SALS bolesnika bez ekspanzije nije registrovana korelacija u veličini kraćeg, dužeg kao ni zbira oba alela sa godinama bolesnika na početku bolesti ili preživljavanjem bolesnika (Debray et al., 2013). Što se tiče veličine normalnog alela kod nosilaca ekspanzije, ne postoji korelacija neekspandovanog alela sa godinama na početku bolesti, preživljavanjem niti oblikom početka bolesti kod SALS bolesnika (Debray et al., 2013).

Kod nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* u ovoj studiji takođe nije uočena korelacija veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti, niti je uočena značajna razlika u veličini ponovaka u odnosu na spinalni i bulbarni početak bolesti, što je u saglasnosti sa postojećim podacima iz literature (Dols-Icardo et al., 2014, Chen et al., 2016b). Pozitivna korelacija veličine ekspanzovanih ponovaka i godina početka bolesti uočena je u nekim studijama (Hubers et al., 2014, Cammack et al., 2019), kao i u studiji koja je obuhvatila bolesnike nosioce ekspanzija u genu *C9orf72* iz nekoliko neurodegenerativnih oboljenja (Beck et al., 2013). Međutim, u jednoj od studija ta korelacija gubi značajnost kada se isključi iz analize ispitanik sa minimalnim brojem ponovaka kod koga je bolest počela sa 27 godina (Hubers et al., 2014). Fournier i saradnici u svojoj studiji, na velikom broju nosilaca ekspanzija u genu *C9orf72* (simptomatski i asimptomatski nosioci) registruju pozitivnu korelaciju veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti, ali sugerišu da je dobijeni rezultat uglavnom vođen pozitivnom korelacijom veličine ponovaka sa starošću u trenutku uzorkovanja krvi (Fournier et al., 2019). Rezultati najnovije studije pokazuju da kod nosilaca ekspanzije, kod kojih je na kraćem alelu registrovano prisustvo intermedijerne veličine ponovaka (granica ≥ 17), ne postoji značajna asocijacija sa preživljavanjem ili starošću bolesnika na početku bolesti (Laaksovirta et al., 2022).

Asocijacija veličine ponovaka i porodične anamneze kod bolesnika bez ekspanzije, u ovoj studiji pokazala je da je veća vrednost medijane manjeg alela u grupi bolesnika koji su imali pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS, demencije ili oba. Dodatno, suprotno ranijoj studiji kod koje nije registrovana korelacija sa porodičnom anamnezom (Dols-Icardo et al., 2014), kod bolesnika sa ekspanzijom uočena je statistički značajna razlika u veličini najveće registrovane vrednosti ekspanzije u slučajevima sa pozitivnom porodičnom anamnezom na ALS. Uzimajući u obzir relativno skromnu veličinu ispitivane kohorte u ovoj studiji, uključujući činjenicu da su samo 3 bolesnika sa ekspanzijom u genu *C9orf72* imala pozitivnu porodičnu anamnezu na ALS, kao i ograničenje primenjene *Southern blot* metodologije, trebalo bi uspostaviti senzitivniju *Southern blot* metodologiju, a dobijene rezultate ispitati na većem broju uzoraka.

U ovoj studiji veličina normalnog alela ispod 20 ponovaka nije korelisala sa starošću na početku bolesti kod bolesnika sa bolešću sličnoj Huntingtonovoj bolesti. Takođe, u ovoj studiji nije pokazana asocijacija veličine ponovaka sa porodičnom anamnezom kod naših bolesnika sa fenokopijom HB. Studije korelacije ponovaka normalne veličine sa određenim kliničko-

demografskim parametrima kod HB sličnih bolesnika prema trenutnim saznanjima nisu prikazane u literaturi. Kod HB sličnih bolesnika kod kojih je registrovano prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72*, u jednoj studiji je zabeleženo da ne postoji značajna asocijacija veličine ekspanzovanih ponovaka sa godinama na početku bolesti (Hensman Moss et al., 2014).

U našim kohortama MSA i PSP bolesnika veličina normalnih ponovaka nije korelirala sa starošću bolesnika na početku bolesti. Podaci o korelaciji između broja ponovaka i određenih kliničkih parametara kod MSA i PSP bolesnika nisu brojni. Dve studije na kineskim bolesnicima nisu pronašle značajnu povezanost veličine ponovaka i starosti na početku bolesti kod MSA bolesnika (Sun et al., 2015, Chen et al., 2016a). Takođe, nepostojanje povezanosti starosti na početku bolesti sa ponovcima veličine ispod 30 prijavljeno je u studijama koje su uključivale bolesnike sa PB, esencijalnim tremorom, sindromom nemirnih nogu (Dejesus-Hernandez et al., 2013), FTD, ALS, i ALS/FTD zajedno, zaključujući da ne postoji uticaj neekspanzovanih alela na starost na početku bolesti ili fenotip oboljenja (Rutherford et al., 2012b). U našoj PSP grupi zbir ponovaka na oba alela bio je veći kod bolesnika sa pozitivnom porodičnom anamnezom, ali uzimajući u obzir relativno malu veličinu kohorte ove rezultate treba intepretirati sa oprezom i uraditi dodatne analize na većem broju uzoraka.

5.2 Bolesti sa predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima

5.2.1 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa frontotemporalnom demencijom

U ovom istraživanju na teritoriji Srbije od 129 testiranih bolesnika sa dijagnozom FTD-a, prisustvo ekspanzije registrovano je kod 6,98%. Kod bolesnika sa pozitivnom porodičnom anamnezom, ekspanzija u genu *C9orf72* registrovana je kod 13,46% bolesnika, a 2,60% kod sporadičnih slučajeva FTD-a koji su imali kategoriju 4 prema Goldman skor. Slični podaci o sveukupnoj učestalosti GGGGCC ekspanzija oko 6% dobijeni su u populaciji Italije i Portugala (6,09 i 6,62%, redom) dok je najmanja učestalost od 4,82% zabeležena u populaciji Nemačke (van der Zee et al., 2013). U pojedinačnim populacijama kod sporadičnih slučajeva FTD-a, učestalost ekspanzije registrovana je i ispod 3% (Simon-Sanchez et al., 2012, Boeve et al., 2012). Prema podatku iz pregleda literature iz 2019. godine zastupljenost ekspanzija u genu *C9orf72* kod familijarnog oblika FTD-a iznosi čak 20%, dok je za sporadični oblik 6-8% (Marogianni et al., 2019). Učestalosti ekspanzija uočene kod familijarnih i sporadičnih slučajeva FTD-a iz naše populacije su manje, što se može objasniti relativno malom veličinom ispitivane kohorte usled samog dizajna ove studije gde su bolesnici sa ranim početkom bolesti činili 86% naše kohorte. Na taj način je isključena mogućnost detekcije ekspanzija kod određenog broja bolesnika sa kasnim početkom bolesti koji nisu uključeni u studiju. Kod nosilaca ekspanzije u našoj studiji prisustvo pozitivne porodične anamneze znatno je češće registrovano nego kod bolesnika bez ekspanzije ($p=0,018$), što odgovara ranije objavljenim podacima (Snowden et al., 2012b, Xi et al., 2012).

Prosečna starost bolesnika na početku bolesti u našoj FTD kohorti iznosila je 57,13 godina sa opsegom 36-78 godina pri čemu je 40,31% bolesnika imalo pozitivnu porodičnu anamnezu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa postojećim podacima iz literature gde je početak bolesti kod FTD bolesnika obično u srednjem životnom dobu od 45-65 godina života sa veoma širokim opsegom od 21-85 godina i prisustvom pozitivne porodične anamneze kod 40-50% bolesnika (Snowden et al., 2002, Neary et al., 2005).

U okviru FTD kohorte nosilaca ekspanzije, u našoj populaciji prosečna starost bolesnika na početku bolesti iznosi $50,56 \pm 8,25$ godina i niža je od do sada registrovane prosečne vrednosti od 57,5 godina (Majounie et al., 2012b), što se može pripisati selektivnosti naše studije, odnosno pretežnim uključivanjem bolesnika sa ranim početkom bolesti. Najmlađi bolesnik nosilac ekspanzije iz naše kohorte imao je 36 a najstariji 64 godine prilikom pojave prvih simptoma bolesti, što je u saglasnosti sa literaturnim opsegom od 30-76,3 godine (Majounie et al., 2012b, Gijssels et al., 2012).

et al., 2012, Van Langenhove et al., 2013, Simon-Sanchez et al., 2012). Ženski pol bio je zastupljen sa 55,56%, a čak kod 77,78% bolesnika sa ekspanzijom registrovali smo prisustvo pozitivne porodične anamneze prema Goldman skor. Među nosiocima ekspanzije nije zabeležena značajna razlika u starosti na početku bolesti u odnosu na pol. Takođe, u našoj studiji nije postojala razlika u zastupljenosti muškog i ženskog pola kod bolesnika sa i bez ekspanzije u genu *C9orf72* ($p=0,416$), što je pokazano i u drugim studijama (Snowden et al., 2012b, Xi et al., 2012) kao ni kod bolesnika sa bvFTD (Devenney et al., 2014).

U našoj kohorti, nosioci ekspanzije sa FTD dijagnozom imali su 7 godina raniji početak bolesti od bolesnika koji nisu imali ekspanziju ($p=0,007$). Raniji početak bolesti kod nosilaca ekspanzije u odnosu na bolesnike bez ekspanzije registrovan je i u drugim studijama (Gijssels et al., 2012, Van Langenhove et al., 2013, Xi et al., 2012, Gomez-Tortosa et al., 2016), dok sa druge strane kod nekih ova razlika nije uočena (Snowden et al., 2012b) kao i kada su zasebno analizirani bolesnici sa bvFTD (Devenney et al., 2014).

U ispitivanoj kohorti FTD bolesnika registrovano je prisustvo parkinsonizma, PSP, epilepsije, mioklonusa kao i horeje. Pored klasične kliničke slike, FTD se u okviru preklapajućeg sindroma može ispoljiti zajedno sa drugim neurodegenerativnim oboljenjima kao što su BMN, PSP, KBD (Seelaar et al., 2007, Kertesz and McMonagle, 2011, Baizabal-Carvallo and Jankovic, 2016). Kod bvFTD oko 23% bolesnika ima znake parkinsonizma od kojih je bradikinezija najčešći klinički simptom prisutan kod 76,5% bolesnika, dok je najmanje zastupljen tremor sa 29,4% (Padovani et al., 2007).

Među bolesnicima sa ekspanzijom u našoj FTD kohorti bihejvioralna varijanta je registrovana kod 77,78% bolesnika. Navedeno nije iznenađenje jer, klinički posmatrano, bihejvioralna varijanta FTD u odnosu na druge FTD podtipove predstavlja najčešći klinički fenotip kod nosilaca ekspanzije (Dobson-Stone et al., 2012, Van Langenhove et al., 2013, Simon-Sanchez et al., 2012, Boeve et al., 2012, Devenney et al., 2014, Majounie et al., 2012b). Pored bvFTD fenotipa, nosioci ekspanzije mogu ispoljavati i klinički fenotip PNFA kao i semantičke demencije, ali u manjem procentu (8,9% i 5,6%, redom) (Majounie et al., 2012b). Takođe, registrovani su i nosioci ekspanzije sa kliničkim fenotipom preklapajućeg sindroma FTD/PSP (Mehravian et al., 2018).

Klinička slika FTD kod 5-10% slučajeva može obuhvatati simptome ALS-a i ovaj procenat se kreće čak do oko 50%, gde se mogu registrovati subklinički znaci degeneracije motornog neurona (Ferrari et al., 2011), dok se dijagnoza definitivne ALS može se postaviti kod 14 % FTD bolesnika (Lomen-Hoerth et al., 2002). U našoj studiji zastupljenost ALS-a na nivou čitave kohorte je nešto niža i iznosila je 4%, dok je kod bolesnika koji su bili nosioci ekspanzije bila 22%, slično ranije dobijenim podacima (Dobson-Stone et al., 2012). Od 5 bolesnika sa registrovanim prisustvom ALS-a u našoj kohorti, 2 bolesnika (40%) su bila nosioci ekspanzije u genu *C9orf72*. U studiji smo pokazali da nosioci ekspanzije u genu *C9orf72* imaju značajno češće prisustvo ALS-a u odnosu na bolesnike koji nisu nosioci ekspanzije ($p=0,003$). Imajući u vidu da su inicijalna istraživanja koja su dovela do otkrića ekspanzije ponovaka u genu *C9orf72* obuhvatala i bolesnike kod kojih je postojalo kliničko preklapanje FTD/ALS (Renton et al., 2011, DeJesus-Hernandez et al., 2011), kao i činjenicu da je ova ekspanzija prisutna kod trećine bolesnika sa preklapajućim fenotipom (Marogianni et al., 2019), nije neočekivano da kod FTD bolesnika sa ekspanzijom postoji veća prevalencija bolesnika sa ALS u odnosu na bolesnike bez ekspanzije (Snowden et al., 2012b, Xi et al., 2012).

Među bolesnicima nosiocima ekspanzije, pored bihejvioralnih izmena, u ovom istraživanju je registrovano i prisustvo halucinacija, apatije, gubitka empatije, agitacije, promena u ishrani, narušene posturalnosti i posturalnog tremora, ataksije, hipomimije, apraksije, poremećaje govora, problema sa imenovanjem, teškoće sa prepoznavanjem osoba, egzekutivnih problema, oromandibularnih diskinezija, simptoma bolesti motornog neurona, motornih stereotipija i nevoljnih pokreta. Prisustvo horeje, odnosno nevoljnih pokreta, u kliničkoj slici vezuje se za dijagnozu Hantingtonove bolesti (Govert and Schneider, 2013) i bolesnik 9 iz naše kohorte nosilaca ekspanzije (Poglavlje 4.2.2.2) inicijalno je prikazan kao bolesnik sa dijagnozom bolesti sličnoj

Hantingtonovoj bolesti (Kostic et al., 2014). Međutim, kao što je već navedeno, kod bolesnice postepeno dolazi do pogoršanja kliničke slike, kognitivnog pada i razvoja simptoma FTD. U literaturi, prisustvo motornih poremećaja kao što su tremor, parkinsonizam, mioklonus, distonija, horeja i ataksija prisutni su kod 42,5% nosilaca ekspanzije, dok kod 35,29% nosilaca, motorni poremećaji predstavljaju inicijalni klinički simptom (Estevez-Fraga et al., 2021). Kod preostalih 64,70% nosilaca ekspanzije sa motornim poremećajem, 72,73% prezentovani su kognitivnim simptomima od kojih 87,5% ima FTD koja se vremenom razvila kod ukupno 76,47% bolesnika nosilaca ekspanzije sa motornim poremećajem sa ili bez prisustva ALS-a (Estevez-Fraga et al., 2021). Kod FTD nosilaca ekspanzije pored parkinsonizma registrovani su i znaci apraksije kao i vizuelne i auditorne halucinacije (Simon-Sanchez et al., 2012). U okviru bvFTD fenotipa nosioci ekspanzije najčešće ispoljavaju simptome apatije i dezinhibicije, dok je opsesivno-kompulsivno ponašanje manje zastupljeno (Simon-Sanchez et al., 2012). U veoma visokom procentu (88%) prisutna je povećana apatija kao i smanjena motivacija i inicijativa (Snowden et al., 2012b). U literaturi, psihijatrijske tegobe prisutne su kod čak 38% bolesnika sa ekspanzijom koje se ispoljavaju kao deluzije i somatiformne psihoze ili paranoidne shizofrenije, dok je kod 75% bolesnika prisutno ponavljajuće stereotipno ponašanje. Prisustvo psihoza čak 15 puta povećava šanse da je kod bolesnika prisutna ekspanzija u genu *C9orf72* (Snowden et al., 2012b). Prema dosadašnjim podacima promene u ishrani takođe su veoma česte (44%) međutim, u odnosu na bolesnike bez ekspanzije (70%) znatno su manje prisutne (Snowden et al., 2012b). Promene u ishrani ispoljavaju se u obliku prejedanja i grabljenja hrane. Interesantno je da prekomerna upotreba slatkiša u ishrani nije toliko česta kod nosilaca ekspanzije i da upravo pojava preferencije za slatkišima 4 puta smanjuje verovatnoću prisustva ekspanzije u genu *C9orf72* (Snowden et al., 2012b). Kada govorimo o parkinsonizmu, ukoliko je prisutan, najčešće je u obliku bradikinezije ili hipokinezije, zatim rigidnosti i tremora u miru (Wilke et al., 2016). Klinička slika akinetičkog rigidnog sindroma bez tremora u miru razvija se skoro uvek u okviru dve godine kod bolesnika kod kojih je prisutna bvFTD i ALS (Boeve et al., 2012). Jedna od glavnih kognitivnih promena koja je prisutna kod većine bolesnika sa ekspanzijom je deficit egzekutivnih funkcija. Zatim, prisutne su i jezičke promene u obliku smanjene produkcije propozicionog govora, poteškoća imenovanja, fonoloških i semantičkih grešaka, a mogu se javiti i poteškoće prilikom prepoznavanja lica ili objekata (Snowden et al., 2012b).

U okviru grupe normalnih alela u analiziranoj FTD kohorti najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka, a zatim alel sa 8 ponovaka. Najveći broj registrovanih ponovaka u okviru ove grupe je bio 15. Kod 27,13% bolesnika registrovani su *C9orf72* aleli u homozigotnom stanju. Ovakva učestalost *C9orf72* normalnih alela odgovara podacima iz literature (Xi et al., 2012). Svi bolesnici nosioci ekspanzije iz naše FTD kohorte bili su heterozigoti. Kod FTD±ALS bolesnika registrovani su i homozigotni nosioci ekspanzije, ali u vrlo malom broju (Fratta et al., 2013, Ramos et al., 2020). Takođe, registrovan je i jedan složen heterozigotni nosilac ekspanzije sa dijagnozom bvFTD koji je imao 50±5 na jednom alelu i >2000 ponovaka na drugom alelu (Cooper-Knock et al., 2013). Podaci o starosti na početku bolesti bili su dostupni za dva bolesnika i oba su imala rani početak bolesti pre 60. godine života (Fratta et al., 2013, Cooper-Knock et al., 2013). Na osnovu neuropatoloških podataka kod homozigotnog nosioca ekspanzije, p62 pozitivne neurocitoplazmatske inkluzije znatno su brojnije u odnosu na TDP-43 i poređenje kliničko-patoloških karakteristika sa heterozigotnim nosiocima ukazuje na prisustvo ozbiljnije patologije, ali u opsegu patologije heterozigotnih nosilaca (Fratta et al., 2013).

Na osnovu dobijenih rezultata u našem istraživanju kod bolesnika sa FTD i ranim početkom bolesti u našoj populaciji potrebno je sprovoditi genetičko testiranje na prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72*.

5.2.2 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa atipičnom demencijom

U našem istraživanju analizirano je 49 bolesnika kod kojih je na osnovu kliničkog toka i pratećih analiza postavljena dijagnoza atipične demencije, pri čemu je kod 81,63% bolesnika bolest

bila ranog početka. Kod polovine bolesnika sa atipičnom demencijom registrovana je pozitivna porodična anamneza. Kod 2 bolesnika (4,08%) registrovano je heterozigotno prisustvo ekspanzije GGGGCC ponovaka i oba bolesnika su imala porodičnu anamnezu kategorije 3 prema Goldman skor. Kod prve bolesnice bolest je počela u tridesetoj godini starosti sa kognitivnim tegobama na planu pamćenja, prisustvom agramatizma i apraksije. Kod druge bolesnice bolest je takođe bila ranog početka, u 59 godina života, u vidu problema sa govorom da bi se postepeno javili znaci spinocerebelarne ataksije, a zatim znaci dizatrije i disfagije. Kod obe bolesnice postojali su evidentni znaci kognitivnog poremećaja.

Prema dosadašnjim saznanjima, klinička slika nosilaca ekspanzije u genu *C9orf72* je veoma raznolika i do sada su nosioci ekspanzije registrovani u nekoliko neuroloških kao i psihijatrijskih oboljenja (Beck et al., 2013, Bourinaris and Houlden, 2018, Marogianni et al., 2019). Takođe, ekspanzije u genu *C9orf72* su registrovane i kao izolovani slučaj, sa prisustvom pozitivne porodične anamneze na BMN, koji se manifestovao poremećajem ishrane u vidu smanjenog unosa hrane sa ciljem gubitka telesne mase koji je trajao dugi niz godina, pri čemu je kod bolesnice razmatrana dijagnoza bvFTD (Sanders et al., 2016). Simptomi ataksije koji su registrovani kod našeg drugog bolesnika nisu izuzetak i u literaturi su već opisani retki slučajevi ekspanzija u genu *C9orf72* kod ataksija sindroma (Corcia et al., 2016, Fogel et al., 2012), kao i kod bolesnika kod kojih već postoji prisustvo ekspanzije CAG ponovaka u genima *SCA 1*, *SCA 2*, *SCA 3*, i *SCA 6* (Figueroa et al., 2018). Ipak, ekspanzija u genu *C9orf72* kod ataksija nije toliko česta i u nekoliko studija nije registrovana (Hsiao et al., 2014, He et al., 2016, Aydin et al., 2018). Takođe, zabeležen je slučaj ekspanzije u genu *C9orf72* kod bolesnika sa neodređenim tipom demencije i prisustvom ranih psihijatrijskih tegoba (Aydin et al., 2018).

U kohorti bolesnika sa atipičnom demencijom u ovom istraživanju najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka, a zatim alel sa 5 ponovaka i kao što je već napomenuto ranije aleli sa ovim veličinama, zajedno sa alelom sa 8 ponovaka, najčešći su aleli u motornim i kognitivnim poremećajima (Xi et al., 2012, Cacace et al., 2013, Rutherford et al., 2012b, Kohli et al., 2013, Nuytemans et al., 2013, van der Zee et al., 2013, Abramycheva et al., 2015). Kod 1% alela registrovan je maksimalan broj od 15 ponovaka u okviru normalnih alela.

Rezultati dobijeni u našem istraživanju ukazuju na potrebu genetičkog testiranja na prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* kod bolesnika sa ranim početkom bolesti i atipičnim kliničkim tokom.

5.2.3 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa blagim kognitivnim poremećajem i Alchajmerovom bolesti

U našoj studiji analizirano je 118 bolesnika sa dijagnozom BKP i nije registrovano prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72*. Analiza *C9orf72* ponovaka kod BKP bolesnika do sada je urađena u malom broju studija (Cacace et al., 2013, Sha et al., 2012, Ramos et al., 2020) tako da su dostupni podaci ograničeni. Prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* nije registrovano u većini studija BKP (Cacace et al., 2013, Sha et al., 2012) i rezultati iz naše studije o odsustvu ekspanzija u genu *C9orf72* kod BKP bolesnika govore u prilog postojećim podacima iz literature.

U pomenutom istraživanju iz 2013. godine distribucija GGGGCC ponovaka kod bolesnika sa BKP bila je 2-24 ponovka bez podataka o učestalosti alela (Cacace et al., 2013). Kod BKP bolesnika iz naše studije, najveću učestalost imao je alel sa 2 ponovka, a zatim alel sa 8 ponovaka, dok je najveći registrovani broj iznosio 14 GGGGCC ponovaka. U brojnim studijama kognitivnih i motornih poremećaja pokazano je da najveću učestalost imaju upravo aleli sa 2, 5 i 8 GGGGCC ponovaka (Xi et al., 2012, Cacace et al., 2013, Rutherford et al., 2012b, Kohli et al., 2013, Nuytemans et al., 2013, van der Zee et al., 2013, Abramycheva et al., 2015).

Na osnovu rezultata ovog istraživanja, moglo bi se reći da ekspanzija u genu *C9orf72* ne predstavlja genetički uzrok BKP-a u populaciji Srbije. S obzirom na postojanje pozitivnih slučajeva BKP-a sa ekspanzijom u literaturi (Ramos et al., 2020), ukoliko kod ovih bolesnika postoji

prisustvo pozitivne porodične anamneze sa potvrđenom ekspanzijom, potrebno ih je uključiti u genetičko testiranje na prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72*.

U ovoj studiji analizirano je 176 bolesnika, od kojih je preko 90% imalo AB ranog početka i među analiziranim bolesnicima nije detektovano prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72*. Odsustvo iste kod AB bolesnika registrovano je i u drugim studijama (Rollinson et al., 2012, Xi et al., 2012, Jiao et al., 2013, Lin et al., 2014, Bonvicini et al., 2019).

Najveću učestalost kod AB bolesnika u ovom istraživanju imao je alel sa 2 ponovka, a zatim alel sa 8 ponovaka. U okviru normalnih alela najveći broj registrovanih ponovaka je bio 16. U dosadašnjim studijama u okviru normalnih alela registrovane su sve veličine GGGGCC ponovaka kod AB bolesnika, kao i ponovci u okviru intermedijerne grupe alela (Cacace et al., 2013, Kohli et al., 2013, Rollinson et al., 2012, Xi et al., 2012).

Na osnovu rezultata iz ovog istraživanja ekspanzija u genu *C9orf72* ne predstavlja genetički uzrok bolesnika sa AB u populaciji Srbije.

5.2.4 Kliničko-genetičke korelacije veličine GGGGCC ponovaka u bolestima sa predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima

U ovom istraživanju sprovedenom na BKP bolesnicima iz naše populacije nije pokazana korelacija veličine normalnih alela sa godinama bolesnika na početku bolesti. Značajna asocijacija veličine ponovaka sa porodičnom anamnezom takođe nije uočena. Odsustvo korelacije veličine normalnih ponovaka godinama na početku bolesti, kao i odsustvo asocijacije sa porodičnom anamnezom registrovano je i u kohortama naših bolesnika sa AB i atipičnom demencijom. Takođe, kod FTD bolesnika sa i bez ekspanzije u genu *C9orf72* nije uočena povezanost sa porodičnom anamnezom.

U malom broju studija koje se bave analizom *C9orf72* kod BKP bolesnika ne postoje podaci o korelaciji veličine ponovaka sa kliničkim parametrima (Cacace et al., 2013, Sha et al., 2012, Ramos et al., 2020). U istraživanju koje je obuhvatilo veliku kohortu od 1735 bolesnika sa FTD, ALS i ALS/FTD kao i 1444 kontrolna uzorka, nije zapažena značajna povezanost između veličina normalnih alela i fenotipa bolesnika, kao ni asocijacija sa godinama početka bolesti kod bolesnika koji nisu nosioci ekspanzije kao ni kod nosilaca (Rutherford et al., 2012b). Treba napomenuti da su autori u navedenoj studiji normalnom veličinom alela smatrali ponovke <30 pri čemu je najveći broj registrovanih ponovaka kod bolesnika koji nisu nosioci ekspanzije bio 25 (kod kontrola 23), dok je kod nosilaca ekspanzije normalan alel sa 17 ponovaka bio najveći registrovan. Kod FTD bolesnika kod kojih nije registrovano prisustvo ekspanzije, maksimalna vrednost dužine ponovaka, kao i srednja vrednost, ne korelišu sa starošću na početku bolesti niti sa polom bolesnika (Dobson-Stone et al., 2013).

U ovoj studiji kod FTD bolesnika bez prisustva ekspanzije u genu *C9orf72* uočena je negativna korelacija veličine većeg alela i razlike u veličini ponovaka na oba alela sa godinama bolesnika na početku bolesti. Dobijeni rezultat iz ove studije nije u saglasnosti sa dosadašnjim podacima gde nije uočena korelacija veličine ponovaka sa godinama na početku bolesti kod bolesnika koji nisu nosioci ekspanzije u genu *C9orf72* (Dobson-Stone et al., 2013, Rutherford et al., 2012b). Obe navedene studije obuhvatale su veći broj analiziranih bolesnika u odnosu na ovu studiju, dok su u studiji Rutherford i saradnika, bili uključeni i bolesnici sa ALS i ALS/FTD u ukupan broj analiziranih bolesnika. Takođe, pristup analizi korelacije veličine ponovaka se razlikuje, jer je u navednim studijama uglavnom korišćena srednja i najveća vrednost veličine ponovaka ili kategorijska vrednost, dok je naš pristup bio detaljniji obuhvatajući analizu četiri varijable veličine ponovaka. Svakako, analiza na mnogo većem broju FTD bolesnika je neophodna da bi se potvrdili rezultati dobijeni u našem istraživanju.

U kohorti FTD nosilaca ekspanzije nije registrovana korelacija veličine ponovaka sa godinama bolesnika na početku bolesti, što je u saglasnosti sa dostupnim podacima (van Blitterswijk et al., 2013, Dols-Icardo et al., 2014, Dobson-Stone et al., 2013). U literaturi je zabeležena pozitivna korelacija veličine ekspanzovanih ponovaka u frontalnom korteksu FTD

bolesnika sa godinama bolesnika na početku bolesti, ali je korelacija izostala prilikom analize ekspanzija u ćelijama krvi i cerebelumu (van Blitterswijk et al., 2013). Kod bolesnika sa AB, u studiji koja je obuhvatila preko 800 nesrodnih AB bolesnika i isto toliko kontrola, nije registrovana povezanost između dužeg neekspandovanog alela i godina početka bolesti, niti je pokazano da veći broj ponovaka u okviru normalnog ranga predstavlja faktor rizika za AB (Harms et al., 2013a). Distribucija veličina neekspandovanih alela kod AB bolesnika ne pokazuje razliku u odnosu na kontrole (Kohli et al., 2013) ni kada se aleli diskriminiraju na kratke (<7 ponovaka) i intermedijerne (≥7 ponovaka) ponovke (Cacace et al., 2013). Koristeći kategorizaciju intermedijernih alela na ≥7 ponovaka, u studiji Jiao i saradnici zabeležili su pozitivnu korelaciju starosti na početku bolesti i AB bolesnika kod kojih je na oba alela prisutan intermedijerni broj ponovaka. Međutim, statistička značajnost nije postignuta za korelaciju dužih alela i godina početka bolesti (Jiao et al., 2013).

5.3 Kliničko-genetičke karakteristike bolesnika sa preklapajućim fenotipom ALS/FTD i FTD/ALS

U ovom istraživanju u ALS i FTD kohortama registrovani su bolesnici koji su ispoljavali kliničku sliku preklapajućeg ALS/FTD i FTD/ALS sindroma. Ovi bolesnici su uključeni u ALS ili u FTD kohortu u zavisnosti od kliničke prezentacije. Ukupno su registrovana 22 bolesnika sa preklapajućim fenotipom od kojih je 31,82% bilo nosilac ekspanzije u genu *C9orf72*. Dobijeni rezultat učestalosti ekspanzije kod bolesnika sa preklapajućim sindromom u saglasnosti je sa dostupnim podacima među pojedinačnim populacijama (Byrne et al., 2012, Gijssels et al., 2012) kao i sa pregledom literature iz 2019. godine (Marogianni et al., 2019).

U našoj kohorti najveća učestalost nosilaca ekspanzije od 50% registrovana je među bolesnicima koji su imali pozitivnu porodičnu anamnezu kao što je i ranije registrovano (Ratti et al., 2012, Boeve et al., 2012, Dobson-Stone et al., 2012). Prisustvo nosilaca ekspanzije među familijarnim bolesnicima registrovano je i u znatno većem procentu (86%) (Gijssels et al., 2012). Visoka učestalost nosilaca ekspanzije od 30% u našoj studiji registrovana je među bolesnicima kod kojih je zabeležena negativna porodična anamneza, pri čemu moramo uzeti u obzir nedostatak potpunih podataka i medicinske dokumentacije kod članova porodice koji nam nisu bili dostupni. Dobijeni rezultat u ovoj studiji je viši nego prethodno prijavljena učestalost od 6%, pri čemu je veličina ispitivanih kohorti skoro identična (Gijssels et al., 2012). Ovako visoka učestalost nosilaca ekspanzije kod naših bolesnika sa negativnom porodičnom anamnezom naglašava značaj genetičkog testiranja u slučajevima bolesnika sa uočenim preklapajućim sindromom iako postoji odsustvo srodnika sa ALS i/ili demencijom u porodici.

Prosečna starost na početku bolesti bolesnika nosilaca ekspanzije u ovoj grupi iznosila je 56,43 godine i nije se značajno razlikovala od godina bolesnika na početku kod kojih nije registrovano prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* ($p=0,264$), za razliku od podatka iz ranije studije (Byrne et al., 2012), u kome je prosečna starost na početku bolesti iznosila 57,4 godine i bila je značajno ranija.

Zastupljenost muškog i ženskog pola u našoj kohorti bila je približno jednaka i nije se razlikovala između dve grupe bolesnika u odnosu na prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72* ($p=0,867$) kao što je zabeleženo i ranije u literaturi (Byrne et al., 2012).

Byrne i saradnici su u studiji registrovali povećanu stopu spinalnog početka bolesti kod nosilaca ekspanzije u odnosu na bolesnike bez ekspanzije (90% vs 50%), ali dobijena razlika nije imala statističku značajnost (Byrne et al., 2012). U ovoj studiji nije registrovana razlika u zastupljenosti spinalnog i bulbarnog oblika bolesti u grupama sa i bez ekspanzije u genu *C9orf72* ($p=0,890$).

Distribucija učestalosti normalnih *C9orf72* alela u našoj studiji pokazuje rezultat koji je u saglasnosti sa ranijim podacima (Rutherford et al., 2012b), gde je najveću učestalost imao alel sa 2, a zatim alel sa 8 GGGGCC ponovaka, dok je najveći broj registrovanih ponovaka bio 12.

Na osnovu dobijenih rezultata iz naše studije genetičko testiranje je potrebno sprovesti kod svih bolesnika sa preklapajućim ALS/FTD i FTD/ALS fenotipom nezavisno od porodične anamneze.

5.3.1 Kliničko-genetičke korelacije veličine GGGGCC ponovaka kod bolesnika sa preklapajućim fenotipom ALS/FTD i FTD/ALS

U našoj kohorti bolesnika sa preklapajućim fenotipom nije uočena značajna korelacija veličine ponovaka sa ispitivanim kliničko-demografskim karakteristikama kao ni asocijacija sa porodičnom anamnezom kod bolesnika sa i bez prisustva ekspanzije u genu *C9orf72*. Prema trenutnim saznanjima ne postoji mnogo studija u kojima su ovi bolesnici zasebno analizirani.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji koja je obuhvatila samo 7 bolesnika nosilaca ekspanzije uporedivi su sa studijom iz 2013. godine u kojoj je pokazano da veličina ekspanzovanih ponovaka kod bolesnika sa preklapajućim fenotipom FTD-a i bolesti motornog neurona nije povezana sa godinama bolesnika na početku bolesti u uzorku periferne krvi 8 nosilaca ekspanzije (van Blitterswijk et al., 2013). U drugoj studiji, koja je obuhvatila veći broj bolesnika sa dijagnozom ALS/FTD, nije uočena povezanost veličine normalnih ponovaka sa rizikom za nastanak oboljenja kod bolesnika bez ekspanzije u genu *C9orf72*, niti kod nosilaca ekspanzija u genu *C9orf72* (Rutherford et al., 2012b). Međutim, autori navedene studije asocijaciju godina bolesnika na početku bolesti i veličine normalnih alela kod nosilaca ekspanzije i kod bolesnika bez ekspanzije u genu *C9orf72* nisu posmatrali pojedinačno prema oboljenjima već kao celokupnu analiziranu kohortu.

Rezultati dobijeni iz naše populacije podržavaju gore navedena saznanja da veličina ponovaka kod bolesnika sa preklapajućim fenotipom nema uticaja na ispitivane kliničko-demografske karakteristike, nezavisno od prisustva ekspanzije u genu *C9orf72*.

5.4. Intermedijerni GGGGCC ponovci u bolestima sa predominantno motornim i predominantno kognitivno-bihejvioralnim poremećajima

Od ukupno 1052 analizirana bolesnika sa neurodegenerativnim oboljenjima iz Srbije, u ovoj studiji, registrovano je 6 bolesnika koji su bili nosioci intermedijerne veličine ponovaka na dužem alelu.

Registrovan je jedan ALS bolesnik koji je nosio 26 ponovaka na dužem alelu kao i jedan ALS bolesnik koji je bio nosilac ekspanzije u genu *C9orf72* na jednom alelu dok je na drugom alelu imao 22 ponovka. Kod bolesnika sa 22 ponovka na kraćem alelu bolest je počela sa 56 godina u formi spinalnog fenotipa na donjem levom ekstremitetu. Neuropsihološki testovi su pokazali prisustvo blagog kognitivnog poremećaja u egzekutivnom domenu. Otac bolesnice, čiji uzorak krvi nije bio dostupan za genetičke analize, imao je demenciju, dok je kod brata od ujaka dijagnostikovao FTD/ALS i prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72*. Naš bolesnik, nosilac 26 ponovaka, imao je početak bolesti u 72 godine života sa prisustvom bulbarnih simptoma i negativnom porodičnom anamnezom. Nalaz elektromiografije bolesnika ukazivao je na bolest motornog neurona koja je obuhvatala sva 4 regiona. Rezultati ranije meta analize ukazuju da su ponovci veličine 24-30 povezani sa povećanim rizikom za nastanak SALS-a (Chen et al., 2016b), a podaci iz poslednje meta analize pokazuju da su ponovci ranga 24-30 povezani sa ALS-om, sugerišući da donja granica patogenosti ovih ponovaka treba da bude snižena na čak na 24 ponovka (Iacoangeli et al., 2019). U istraživanju na finskoj populaciji (gde je korišćeno nekoliko varijanti opsega intermedijernih ponovaka), uočeno je da prisustvo više od 7 ponovaka na svakom od dva alela, posebno ukoliko jedan od njih ima ≥ 17 ponovaka, petostruko povećava šanse za nastanak ALS-a, ali da, ukoliko su intermedijerni ponovci samo na jednom alelu, isti nisu povezani sa ALS-

om (Kaivola et al., 2020). Svakako su potrebne analize na većem broju uzoraka, kao i analize srodnika i detalji porodične anamneze, kako bi se mogli izvesti jasniji zaključci.

U ispitivanoj kohorti naših bolesnika sa HB sličnoj bolesti kod 2,5% bolesnika registrovano je prisustvo *C9orf72* intermedijernih alela što je u saglasnosti sa podacima od 3% koji su dobijeni meta analizom (Alva-Diaz et al., 2020). Klinička slika naših bolesnika obuhvatala je prisustvo fokalne cervikalne distonije sa promenama na emocionalnom planu kod jednog bolesnika (27 GGGGCC ponovaka na dužem alelu), dok je kod drugog bolesnika registrovano prisustvo oromandibularne diskinezije, nevoljni pokreti kao i promena raspoloženja (23 GGGGCC ponovka na dužem alelu). Prisustvo distonije kod bolesnika sa 27 GGGGCC ponovaka nejasnog kliničkog značaja dokumentovano je u literaturi. Bolesnik sa ovim intermedijernim alelom je za razliku od našeg bolesnika, imao kasniji početak bolesti sa 62 godine života (Martins et al., 2018). Dokumentovana su još dva slučaja *C9orf72* intermedijernih alela (oba sa 22 GGGGCC ponovka) od kojih je jedan imao i ekspanziju CAG ponovaka u genu *HTT* (Ida et al., 2018).

U našem istraživanju registrovan je jedan bolesnik muškog pola sa intermedijernom veličinom alela, kliničkom slikom PSP-a i negativnom porodičnom anamnezom. Na osnovu do sada objavljenih podataka prijavljen je jedan slučaj klinički postavljene dijagnoze tipičnog PSP-a sa 27 GGGGCC ponovaka nejasnog značaja i sa pozitivnom porodičnom anamnezom na demenciju i PB (Schottlaender et al., 2015). Takođe, registrovani su bolesnici sa 26 kao i 30 GGGGCC ponovaka sa kliničkom slikom parkinsonizma, supranuklearne paralize pogleda, posturalne nestabilnosti, dizartrije i blage frontalne demencije (Lesage et al., 2013). Za kohorte koje obuhvataju PB i atipični parkinsonizam neke studije ukazuju da intermedijerni *C9orf72* ponovci mogu biti prisutni u ovim oboljenjima (Nuytemans et al., 2013, Cannas et al., 2015). Ipak, velika meta analiza koja je obuhvatala PB bolesnike (Theuns et al., 2014) i studija na PB bolesnicima čija je dijagnoza potvrđena autopsijom, nisu uspele da potvrde povezanost (Nuytemans et al., 2014). Na osnovu dosadašnjih istraživanja, ovi podaci nisu dovoljni da bi se izveli neki konkretniji zaključci o tome da li *C9orf72* intermedijerni aleli doprinose podložnosti ka PSP-u.

U našoj studiji kod FTD bolesnika registrovan je jedan bolesnik nosilac 24 GGGGCC ponovka na dužem alelu kod koga se bolest manifestovala u 54 godine života u vidu usporenosti, zbunjenosti, nerazumevanja postavljenih pitanja, dezorijentacijom u vremenu, ali očuvanom dugoročnom memorijom. Napredovanje bolesti dovodi do pojave mutističnosti kao i prisustva motornih simptoma u vidu slabosti, nestabilnosti i, na kraju, nepokretnosti bolesnice. Analizom asimptomatskih srodnika bolesnice, prisustvo intermedijernih alela registrovano je kod 60%, odnosno 3/5 ispitanika. Prema dostupnim podacima, ponovci veličina 20-22 registrovani su kod 4,59% bolesnika i oni su imali kliničke simptome iz spektra FTD (Gomez-Tortosa et al., 2013). Nedavna studija u turskoj populaciji bolesnika sa FTLD registrovala je intermedijerne ponovke veličine 20-30 kod 4% bolesnika, smatrajući ih mogućim faktorom rizika za nastanak oboljenja. Bolesnici nosioci intermedijerne veličine alela imali su veoma sličnu kliničku sliku kao bolesnik koji je imao ≥ 30 ponovaka i kod čak 75% nosilaca intermedijernih alela zabeleženi su psihijatrijski simptomi u vidu halucinacija (Erzurumluoglu et al., 2019). U studiji iz 2016. godine pokazano je da kod FTD, ALS i ALS/FTD bolesnika, kao i kontrola, nosioca alela sa 7-24 ponovka, postoji blago povećan stepen metilacije samih ponovaka u ćelijama krvi, u odnosu na alele sa 2-6 ponovaka. Isti efekat povećane metilacije intermedijernih alela postoji i kod nosilaca ekspanzije (Gijssels et al., 2016).

Drugi bolesnik iz ove studije sa intermedijernim brojem ponovaka na dužem alelu (28 GGGGCC ponovaka) registrovan je u kohorti bolesnika sa AB. Kod bolesnice prvi simptomi bolesti se javljaju u 58 godina starosti sa prisutnim kognitivnim padom u multiplim kognitivnim domenima. Alel sa 28 ponovaka u literaturi je registrovan kod jednog bolesnika sa dijagnozom neklasičnog atipičnog parkinsonizma sa demencijom sličnom FTD (Cannas et al., 2015). Aleli sa ponovcima veličine preko 20 takođe su registrovani u studijama kod bolesnika sa AB pri čemu su korišćene različite veličine ponovaka za diskriminaciju kratkih i intermedijernih alela. Cacace i saradnici intermedijernim alelima smatraju veličine ponovaka 7-25 pri čemu autori nisu uspeli da pokažu asocijaciju ovih alela kod AB bolesnika sa SNP rs2814707 (Cacace et al., 2013) za koji je

ranije utvrđena asocijacija T alela i intermedijernih ponovaka kod FTLD (van der Zee et al., 2013). U drugoj studiji sa AB bolesnicima kod ponovaka ranga (4–23) zapaženo je da postoji razlika u srednjoj veličini broja ponovaka kao i njihovoj distribuciji na osnovu etničkog porekla (evropsko vs afričko-američko), međutim, ova razlika je bila prisutna i kod kontrolnih uzoraka, što ide u prilog pretpostavci da je razlika kod bolesnika odraz populacione distribucije, a ne eventualne povezanosti sa samom bolešću (Kohli et al., 2013). Takođe, registrovan je jedan bolesnik sa 21 GGGGCC ponovkom, ali bez daljih informacija o samom bolesniku (Rollinson et al., 2012). Kod AB bolesnika, u studiji koja je uključivala bolesnike iz Evrope i Severne Amerike, učestalost intermedijernih alela veličine 20-29 ponovaka iznosila je oko 1% i slična je učestalosti ovih alela kod kontrola (Xi et al., 2012). Ovi aleli ne doprinose značajno riziku za AB niti postoji segregacija alela sa 21 i 23 ponovka sa AB u dve analizirane porodice (Xi et al., 2012). Još jedna studija u kineskoj populaciji pokazala je da ne postoji povećan rizik za nastanak AB kod bolesnika sa intermedijernim brojem ponovaka (korišćena granica ≥ 7 ponovaka za intermedijerne alele) (Jiao et al., 2013). U prilog datim podacima, rezultati meta analize govore da intermedijerni ponovci veličine 20-29 nisu povezani sa rizikom za AB (Shu et al., 2016). Ukoliko se proširi granica opsega intermedijernih ponovaka do čak 45 ponovaka, značajna povezanost sa AB nije registrovana kada je donja granica bila ≥ 7 niti u grupi ≥ 20 ponovaka (Kaivola et al., 2019). Međutim, u italijanskoj studiji intermedijerni aleli veličine 9-30 ponovaka češći su kod AB bolesnika u odnosu na kontrolnu grupu i mogu predstavljati faktor rizika za nastanak oboljenja (Serpente et al., 2021).

5.5 Preporuke za genetičko testiranje na prisustvo GGGGCC ekspanzije u genu *C9orf72*

Na osnovu dobijenih rezultata iz ove studije, izvedene su sledeće preporuke za genetičko testiranje bolesnika na prisustvo heksanukleotidne ekspanzije u genu *C9orf72*:

- genetičko testiranje na prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* potrebno je raditi u okviru standardne dijagnostičke procedure kod bolesnika sa dijagnozom ALS i FTD, posebno FTD ranog početka, kao i kod bolesnika sa prisustvom demencije ranog početka atipičnog kliničkog toka i prisustvom pozitivne porodične anamneze.
- kod bolesnika sa fenokopijom HB, MSA, PSP, AB i BKP indikator za genetičko testiranje treba da bude prisustvo pozitivne porodične anamneze, posebno ALS i FTD, kao i potvrđeno prisustvo ekspanzije kod srodnika.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu ciljeva koji su postavljeni u ovom istraživanju i dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Utvrđeno je prisustvo ekspanzija GGGGCC ponovaka u genu *C9orf72*, kao i distribucija učestalosti neekspandovanih alela kod nekoliko grupa bolesnika sa oboljenjima iz spektra bolesti sa predominantno motornim i predominantno kognitivno-bihevioralnim poremećajima u populaciji Srbije, kao i distribucija učestalosti u neekspandovanih alela u grupi kontrola.

- Prisustvo heterozigotne ekspanzije u genu *C9orf72* registrovano je kod 31/383 (8,09%) bolesnika sa dijagnozom amiotrofične lateralne skleroze, 9/129 (6,98%) bolesnika sa frontotemporalnom demencijom, te kod 2/49 (4,08%) bolesnika sa atipičnom demencijom;
- Utvrđena učestalost ekspanzija kod bolesnika sa ALS je u skladu sa podacima iz literature, dok je učestalost ekspanzija kod FTD slučajeva niža;
- Kod bolesnika sa ALS i FTD preklapajućim fenotipom, heterozigotna ekspanzija u genu *C9orf72* registrovana je kod 7/22 bolesnika (31,82%) i u saglasnosti je sa učestalošću u drugim populacijama kao i sa sveukupnom učestalošću kod ovih bolesnika;
- Prisustvo ekspanzije u genu *C9orf72* nije registrovano u kohortama bolesnika sa bolesti sličnoj Hantingtonovoj bolesti, MSA, PSP, BKP, AB kao ni kod zdravih kontrola;
- Kod jednog ALS nosioca ekspanzije na kraćem alelu registrovana je intermedijerna veličina GGGGCC ponovaka;
- Registrovano je ukupno 6 bolesnika koji su bili nosioci intermedijerne veličine ponovaka na dužem alelu (1/383 (0,26%) kod ALS, 2/80 (2,5%) kod HB sličnih bolesnika, 1/73 (1,37%) kod PSP, 1/129 (0,78%) kod FTD i 1/176 (0,57%) kod bolesnika sa AB) kao i 3/5 (60%) asimptomatska nosioca intermedijerne veličine ponovaka na dužem alelu, dok ni kod jednog kontrolnog uzorka nije utvrđeno prisustvo alela intermedijerne veličine;
- Najveću učestalost u okviru grupe normalnih alela kod svih grupa bolesnika i kontrola imali su aleli sa 2, 5 i 8 ponovaka;
- Jedan nosilac ekspanzije u ALS grupi bio je i nosilac dve nesinonimne varijante, obe u heterozigotnom statusu, jedna u genu *ANG:c.122A>T, p.K17I*, a druga u genu *FUS:c.1550A>C, p.H517P*.

2. Poređenjem grupa bolesnika sa prisustvom ekspanzija u genu *C9orf72* i bez nje, prema dijagnozi, izvedeni su sledeći zaključci:

- U ALS grupi kod nosilaca ekspanzije zabeleženo je češće prisustvo pozitivne porodične anamneze kao i prisustvo FTD-a;
- U FTD grupi nosioci ekspanzije imali su značajno raniji početak bolesti, češće prisustvo pozitivne porodične anamneze, kao i prisustvo simptoma ALS-a;

3. Kod nosilaca ekspanzija u genu *C9orf72*, grupisano prema dijagnozi, izvedeni su sledeći zaključci:

- U ALS grupi kod 32%, nosilaca ekspanzije zabeležena je pozitivna porodična anamneza, kod 61% nosilaca negativna, kod 45% bolesnika registrovana je egzekutivna disfunkcija, a kod 16% FTD;
- U FTD grupi kod 78% registrovana je pozitivna porodična anamneza, kod 22% negativna, kod 22% zabeležen je preklapajući fenotip sa ALS; zabeleženo je prisustvo bihevioralnih izmena kao i preklapajućih fenotipova;
- Kod nosilaca ekspanzije sa atipičnom demencijom zabeleženo je prisustvo agramatizma, apraksije, problemi sa govorom, znaci spinocerebelarne ataksije, dizartrije i disfagije;

4. Na osnovu rezultata korelacije veličine GGGGCC ponovaka i kliničkih parametara izvedeni su sledeći zaključci:

- Asocijacija veličine *C9orf72* ponovaka sa porodičnom anamnezom registrovana je u grupi bolesnika sa PSP, kod ALS bolesnika bez ekspanzije u genu *C9orf72* kao i kod ALS bolesnika nosilaca ekspanzije;
 - Kod FTD bolesnika bez ekspanzija u genu *C9orf72* uočena je negativna korelacija veličine ponovaka i godina na početku bolesti;
5. Na osnovu svih rezultata proizilaze sledeće preporuke za genetičko testiranje:
- Genetičko testiranje na prisustvo ekspanzija u genu *C9orf72* potrebno je raditi u okviru standardne dijagnostičke procedure kod bolesnika sa dijagnozom ALS i FTD, posebno FTD ranog početka, kao i kod bolesnika sa prisustvom demencije ranog početka atipičnog kliničkog toka i prisustvom pozitivne porodične anamneze;
 - Kod bolesnika sa fenokopijom HB, MSA, PSP, AB i BKP indikator za genetičko testiranje treba da bude prisustvo pozitivne porodične anamneze, posebno ALS i FTD, kao i potvrđeno prisustvo ekspanzije kod srodnika.

7. LITERATURA

- Abramycheva, N. Y., Lysogorskaia, E. V., Stepanova, M. S., Zakharova, M. N., Kovrazhkina, E. A., Razinskaya, O. D., Smirnov, A. P., Maltsev, A. V., Ustyugov, A. A., Kukharsky, M. S., Khritankova, I. V., Bachurin, S. O., Cooper-Knock, J., Buchman, V. L., Illarioshkin, S. N., Skvortsova, V. I. & Ninkina, N. 2015. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in ALS patients from the Central European Russia population. *Neurobiol Aging*, 36, 2908 e5-9.
- Akimoto, C., Forsgren, L., Linder, J., Birve, A., Backlund, I., Andersson, J., Nilsson, A. C., Alstermark, H. & Andersen, P. M. 2013. No GGGGCC-hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 in parkinsonism patients in Sweden. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14, 26-9.
- Albert, M. S., Dekosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B. & Phelps, C. H. 2011. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7, 270-9.
- Alcaz, S., Jarebinski, M., Pekmezović, T., Stević-Marinković, Z., Pavlović, S. & Apostolski, S. 1996. Epidemiological and clinical characteristics of ALS in Belgrade, Yugoslavia. *Acta Neurol Scand*, 94, 264-8.
- Alva-Diaz, C., Alarcon-Ruiz, C. A., Pacheco-Barrios, K., Mori, N., Pacheco-Mendoza, J., Traynor, B. J., Rivera-Valdivia, A., Lertwilaiwittaya, P., Bird, T. D. & Cornejo-Olivas, M. 2020. C9orf72 Hexanucleotide Repeat in Huntington-Like Patients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Genet*, 11, 551780.
- Alzheimer's, Association. 2016. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 12, 459-509.
- Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Squitieri, F., Theilmann, J., Zeisler, J., Telenius, H., Adam, S., Almquist, E. & Anvret, M. et al. 1994. Huntington disease without CAG expansion: phenocopies or errors in assignment? *Am J Hum Genet*, 54, 852-63.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y. & Oda, T. 2006. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 602-11.
- Arvanitakis, Z. 2010. Update on frontotemporal dementia. *Neurologist*, 16, 16-22.
- Ash, P. E., Bieniek, K. F., Gendron, T. F., Caulfield, T., Lin, W. L., DeJesus-Hernandez, M., Van Blitterswijk, M. M., Jansen-West, K., Paul, J. W., 3rd, Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W. & Petrucelli, L. 2013. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*, 77, 639-46.
- Atanasio, A., Decman, V., White, D., Ramos, M., Ikiz, B., Lee, H. C., Siao, C. J., Brydges, S., Larosa, E., Bai, Y., Fury, W., Burfeind, P., Zamfirova, R., Warshaw, G., Orenco, J., Oyejide, A., Fralish, M., Auerbach, W., Poueymirou, W., Freudenberg, J., Gong, G., Zambrowicz, B., Valenzuela, D., Yancopoulos, G., Murphy, A., Thurston, G. & Lai, K. M. 2016. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Sci Rep*, 6, 23204.
- Au, B., Dale-McGrath, S. & Tierney, M. C. 2017. Sex differences in the prevalence and incidence of mild cognitive impairment: A meta-analysis. *Ageing Res Rev*, 35, 176-199.
- Aydin, G., Dekomien, G., Hoffjan, S., Gerding, W. M., Epplen, J. T. & Arning, L. 2018. Frequency of SCA8, SCA10, SCA12, SCA36, FXTAS and C9orf72 repeat expansions in SCA patients negative for the most common SCA subtypes. *BMC Neurol*, 18, 3.

- Baine, F. K., Peerbhai, N. & Krause, A. 2018. A study of Huntington disease-like syndromes in black South African patients reveals a single SCA2 mutation and a unique distribution of normal alleles across five repeat loci. *J Neurol Sci*, 390, 200-204.
- Baizabal-Carvalho, J. F. & Jankovic, J. 2016. Parkinsonism, movement disorders and genetics in frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol*, 12, 175-85.
- Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E. & Hutton, M. 1999. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.*, 8, 711-5.
- Bannwarth, S., Ait-El-Mkadem, S., Chausse, A., Genin, E. C., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., Berg-Alonso, L., Kageyama, Y., Serre, V., Moore, D. G., Verschueren, A., Rouzier, C., Le Ber, I., Augé, G., Cochaud, C., Lespinasse, F., N'Guyen, K., De Septenville, A., Brice, A., Yu-Wai-Man, P., Sesaki, H., Pouget, J. & Paquis-Flucklinger, V. 2014. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, 137, 2329-2345.
- Barker, W. W., Luis, C. A., Kashuba, A., Luis, M., Harwood, D. G., Loewenstein, D., Waters, C., Jimison, P., Shepherd, E., Sevush, S., Graff-Radford, N., Newland, D., Todd, M., Miller, B., Gold, M., Heilman, K., Doty, L., Goodman, I., Robinson, B., Pearl, G., Dickson, D. & Duara, R. 2002. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 16, 203-12.
- Beck, J., Poulter, M., Hensman, D., Rohrer, J. D., Mahoney, C. J., Adamson, G., Campbell, T., Uphill, J., Borg, A., Fratta, P., Orrell, R. W., Malaspina, A., Rowe, J., Brown, J., Hodges, J., Sidle, K., Polke, J. M., Houlden, H., Schott, J. M., Fox, N. C., Rossor, M. N., Tabrizi, S. J., Isaacs, A. M., Hardy, J., Warren, J. D., Collinge, J. & Mead, S. 2013. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am J Hum Genet*, 92, 345-53.
- Beck, J., Rohrer, J. D., Campbell, T., Isaacs, A., Morrison, K. E., Goodall, E. F., Warrington, E. K., Stevens, J., Revesz, T., Holton, J., Al-Sarraj, S., King, A., Scahill, R., Warren, J. D., Fox, N. C., Rossor, M. N., Collinge, J. & Mead, S. 2008. A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain*, 131, 706-20.
- Belzil, V. V., Bauer, P. O., Gendron, T. F., Murray, M. E., Dickson, D. & Petrucelli, L. 2014. Characterization of DNA hypermethylation in the cerebellum of c9FTD/ALS patients. *Brain Res*, 1584, 15-21.
- Belzil, V. V., Bauer, P. O., Prudencio, M., Gendron, T. F., Stetler, C. T., Yan, I. K., Pregent, L., Daugherty, L., Baker, M. C., Rademakers, R., Boylan, K., Patel, T. C., Dickson, D. W. & Petrucelli, L. 2013. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathol*, 126, 895-905.
- Benajiba, L., Le Ber, I., Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., Legallic, S., Salachas, F., Hannequin, D., Decousus, M., Lacomblez, L., Guedj, E., Golfier, V., Camu, W., Dubois, B., Champion, D., Meininger, V., Brice, A., & French Clinical and Genetic Research Network on Frontotemporal Lobar Degeneration/Frontotemporal Lobar Degeneration with Motoneuron Disease. 2009. TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol*, 65, 470-3.
- Benussi, L., Rossi, G., Glionna, M., Tonoli, E., Piccoli, E., Fostinelli, S., Paterlini, A., Flocco, R., Albani, D., Pantieri, R., Cereda, C., Forloni, G., Tagliavini, F., Binetti, G. & Ghidoni, R. 2014. C9ORF72 hexanucleotide repeat number in frontotemporal lobar degeneration: a genotype-phenotype correlation study. *J Alzheimers Dis*, 38, 799-808.
- Binetti, G., Signorini, S., Squitti, R., Alberici, A., Benussi, L., Cassetta, E., Frisoni, G. B., Barbiero, L., Feudatari, E., Nicosia, F., Testa, C., Zanetti, O., Gennarelli, M., Perani, D., Anchisi, D., Ghidoni, R. & Rossini, P. M. 2003. Atypical dementia associated with a novel presenilin-2 mutation. *Ann Neurol*, 54, 832-6.

- Boeve, B. F., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., DeJesus-Hernandez, M., Knopman, D. S., Pedraza, O., Vemuri, P., Jones, D., Lowe, V., Murray, M. E., Dickson, D. W., Josephs, K. A., Rush, B. K., Machulda, M. M., Fields, J. A., Ferman, T. J., Baker, M., Rutherford, N. J., Adamson, J., Wszolek, Z. K., Adeli, A., Savica, R., Boot, B., Kuntz, K. M., Gavrilo, R., Reeves, A., Whitwell, J., Kantarci, K., Jack, C. R., Jr., Parisi, J. E., Lucas, J. A., Petersen, R. C. & Rademakers, R. 2012. Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain*, 135, 765-83.
- Boeynaems, S., Bogaert, E., Michiels, E., Gijssels, I., Sieben, A., Jovicic, A., De Baets, G., Scheveneels, W., Steyaert, J., Cuijt, I., Verstrepen, K. J., Callaerts, P., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Cruys, M., Van Broeckhoven, C., Van Damme, P., Gitler, A. D., Robberecht, W. & van den Bosch, L. 2016. Drosophila screen connects nuclear transport genes to DPR pathology in c9ALS/FTD. *Sci Rep*, 6, 20877.
- Bonapace, G., Gagliardi, M., Procopio, R., Morelli, M., Quattrone, A., Brighina, L., Quattrone, A. & Annesi, G. 2022. Multiple system atrophy and C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in a cohort of Italian patients. *Neurobiol Aging*, 112, 12-15.
- Bonvicini, C., Scassellati, C., Benussi, L., Di Maria, E., Maj, C., Ciani, M., Fostinelli, S., Mega, A., Bocchetta, M., Lanzi, G., Giacomuzzi, 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. *J Alzheimers Dis*, 67, 243-256.
- Bourinaris, T. & Houlden, H. 2018. C9orf72 and its Relevance in Parkinsonism and Movement Disorders: A Comprehensive Review of the Literature. *Mov Disord Clin Pract*, 5, 575-585.
- Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K. & Rocca, W. A. 1997. Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology*, 49, 1284-8.
- Boxer, A. L., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Baker, M., Seeley, W. W., Crook, R., Feldman, H., Hsiung, G. Y., Rutherford, N., Laluz, V., Whitwell, J., Foti, D., McDade, E., Molano, J., Karydas, A., Wojtas, A., Goldman, J., Mirsky, J., Sengdy, P., Dearmond, S., Miller, B. L. & Rademakers, R. 2011. Clinical, neuroimaging and neuropathological features of a new chromosome 9p-linked FTD-ALS family. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82, 196-203.
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., Munsat, T. L. & World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. 2000. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 1, 293-9.
- Brooks, J. A., Houlden, H., Melchers, A., Islam, A. J., Ding, J., Li, A., Paudel, R., Revesz, T., Holton, J. L., Wood, N., Lees, A., Singleton, A. B. & Scholz, S. W. 2011. Mutational analysis of parkin and PINK1 in multiple system atrophy. *Neurobiol Aging*, 32, 548 e5-7.
- Broustal, O., Camuzat, A., Guillot-Noël, L., Guy, N., Millecamps, S., Deffond, D., Lacomblez, L., Golfier, V., Hannequin, D., Salachas, F., Camu, W., Didic, M., Dubois, B., Meininger, V., Le Ber, I. & Brice, A. French clinical and genetic research network on FTD/FTD-MND. 2010. FUS mutations in frontotemporal lobar degeneration with amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis*, 22, 765-9.
- Buchman, V. L., Cooper-Knock, J., Connor-Robson, N., Higginbottom, A., Kirby, J., Razinskaya, O. D., Ninkina, N. & Shaw, P. J. 2013. Simultaneous and independent detection of C9ORF72 alleles with low and high number of GGGGCC repeats using an optimised protocol of Southern blot hybridisation. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 12.
- Burberry, A., Suzuki, N., Wang, J. Y., Moccia, R., Mordes, D. A., Stewart, M. H., Suzuki-Uematsu, S., Ghosh, S., Singh, A., Merkle, F. T., Koszka, K., Li, Q. Z., Zon, L., Rossi, D. J., Trowbridge, J. J., Notarangelo, L. D. & Eggan, K. 2016. Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Sci Transl Med*, 8, 347ra93.

- Burrell, J. R., Kiernan, M. C., Vucic, S. & Hodges, J. R. 2011. Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain*, 134, 2582-94.
- Byrne, S., Elamin, M., Bede, P., Shatunov, A., Walsh, C., Corr, B., Heverin, M., Jordan, N., Kenna, K., Lynch, C., McLaughlin, R. L., Iyer, P. M., O'Brien, C., Phukan, J., Wynne, B., Bokde, A. L., Bradley, D. G., Pender, N., Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. 2012. Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *The Lancet Neurology*, 11, 232-240.
- Byrne, S., Heverin, M., Elamin, M., Walsh, C. & Hardiman, O. 2014. Intermediate repeat expansion length in C9orf72 may be pathological in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 15, 148-50.
- Cacace, R., Van Cauwenberghe, C., Bettens, K., Gijssels, I., Van Der Zee, J., Engelborghs, S., Vandenbulcke, M., van Dongen, J., Baumer, V., Dillen, L., Mattheijssens, M., Peeters, K., Cruts, M., Vandenberghe, R., De Deyn, P. P., van Broeckhoven, C. & Sleegers, K. 2013. C9orf72 G4C2 repeat expansions in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 34, 1712 e1-7.
- Cali, C. P., Patino, M., Tai, Y. K., Ho, W. Y., McLean, C. A., Morris, C. M., Seeley, W. W., Miller, B. L., Gaig, C., Vonsattel, J. P. G., White, C. L., 3rd, Roeber, S., Kretschmar, H., Troncoso, J. C., Troakes, C., Gearing, M., Ghetti, B., Van Deerlin, V. M., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Mok, K. Y., Ling, H., Dickson, D. W., Schellenberg, G. D., Ling, S. C. & Lee, E. B. 2019. C9orf72 intermediate repeats are associated with corticobasal degeneration, increased C9orf72 expression and disruption of autophagy. *Acta Neuropathol*, 138, 795-811.
- Cammack, A. J., Atassi, N., Hyman, T., Van Den Berg, L. H., Harms, M., Baloh, R. H., Brown, R. H., Van Es, M. A., Veldink, J. H., De Vries, B. S., Rothstein, J. D., Drain, C., Jockel-Balsarotti, J., Malcolm, A., Boodram, S., Salter, A., Wightman, N., Yu, H., Sherman, A. V., Esparza, T. J., McKenna-Yasek, D., Owegi, M. A., Douthwright, C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, McCampbell, A., Ferguson, T., Cruchaga, C., Cudkovic, M. & Miller, T. M. 2019. Prospective natural history study of C9orf72 ALS clinical characteristics and biomarkers. *Neurology*, 93, e1605-e1617.
- Cannas, A., Solla, P., Borghero, G., Floris, G. L., Chio, A., Mascia, M. M., Modugno, N., Muroli, A., Orofino, G., Di Stefano, F., Calvo, A., Moglia, C., Restagno, G., Meloni, M., Farris, R., Ciaccio, D., Puddu, R., Vacca, M. I., Melis, R., Murru, M. R., Tranquilli, S., Corongiu, D., Rolesu, M., Cuccu, S., Marrosu, M. G. & Marrosu, F. 2015. C9ORF72 intermediate repeat expansion in patients affected by atypical parkinsonian syndromes or Parkinson's disease complicated by psychosis or dementia in a Sardinian population. *J Neurol*, 262, 2498-503.
- Cavalleri, F. & De Renzi, E. 1994. Amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Acta Neurol Scand*, 89, 391-4.
- Chen, D. H., Méneret, A., Friedman, J. R., Korvatska, O., Gad, A., Bonkowski, E. S., Stessman, H. A., Doummar, D., Mignot, C., Anheim, M., Bernes, S., Davis, M. Y., Damon-Perrière, N., Degos, B., Grabli, D., Gras, D., Hisama, F. M., Mackenzie, K. M., Swanson, P. D., Tranchant, C., Vidailhet, M., Winesett, S., Trouillard, O., Amendola, L. M., Dorschner, M. O., Weiss, M., Eichler, E. E., Torkamani, A., Roze, E., Bird, T. D. & Raskind, W. H. 2015. ADCY5-related dyskinesia: Broader spectrum and genotype-phenotype correlations. *Neurology*, 85, 2026-35.
- Chen, X., Chen, Y., Wei, Q., Ou, R., Cao, B., Zhao, B. & Shang, H. F. 2016a. C9ORF72 repeat expansions in Chinese patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm (Vienna)*, 123, 1341-1345.
- Chen, Y., Lin, Z., Chen, X., Cao, B., Wei, Q., Ou, R., Zhao, B., Song, W., Wu, Y. & Shang, H. F. 2016b. Large C9orf72 repeat expansions are seen in Chinese patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, 38, 217 e15-217 e22.
- 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. *Arch Neurol*, 69, 630-5.
- Chen, Z., Chen, J. A., Shatunov, A., Jones, A. R., Kravitz, S. N., Huang, A. Y., Lawrence, L., Lowe, J. K., Lewis, C. M., Payan, C. A. M., Lieb, W., Franke, A., Deloukas, P., Amouyel, P., Tzourio, C., Dartigues, J. F., NNIPPS and BBBIPPS Study Groups, Ludolph, A., Bensimon, G., Leigh, P. N., Bronstein, J. M., Coppola, G., Geschwind, D. H. & Al-Chalabi, A. 2019. Genome-wide survey of copy number variants finds MAPT duplications in progressive supranuclear palsy. *Mov Disord*, 34, 1049-1059.
- Chiang, H.-H., Forsell, C., Lindström, A.-K., Lilius, L., Thonberg, H., Nennesmo, I. & Graff, C. 2016. No common founder for C9orf72 expansion mutation in Sweden. *Journal of Human Genetics*, 62, 321-324.
- Chio, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., Traynor, B. G. & EURALS Consortium. 2009. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler*, 10, 310-23.
- Chio, A., Logroscino, G., Traynor, B. J., Collins, J., Simeone, J. C., Goldstein, L. A. & White, L. A. 2013. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*, 41, 118-30.
- Chiò, A., Magnani, C. & Schiffer, D. 1998. Prevalence of Parkinson's disease in Northwestern Italy: comparison of tracer methodology and clinical ascertainment of cases. *Movement Disorders*, 13, 400-405.
- Chiò, A., Mora, G., Calvo, A., Mazzini, L., Bottacchi, E. & PARALS. 2009. Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study. *Neurology*, 72, 725-31.
- Cho, J., Kim, S., Park, S. & Jeon, B. 2009. The G2019S LRRK2 Mutation is Rare in Korean Patients with Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *J Clin Neurol.*, 5, 29-32.
- Cipriani, G., Lucetti, C., Danti, S., Ulivi, M. & Nuti, A. 2015. Uncommon and/or bizarre features of dementia. *Acta Neurol Belg*, 115, 19-25.
- Ciura, S., Lattante, S., Le Ber, I., Latouche, M., Tostivint, H., Brice, A. & Kabashi, E. 2013. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in a zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 74, 180-7.
- Cochran, J. N., McKinley, E. C., Cochran, M., Amaral, M. D., Moyers, B. A., Lasseigne, B. N., Gray, D. E., Lawlor, J. M. 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 Harb Mol Case Stud*, 5.
- Conforti, F. L., Tortelli, R., Morello, G., Capozzo, R., Barulli, M. R., Cavallaro, S. & Logroscino, G. 2018. Clinical features and genetic characterization of two dizygotic twins with C9orf72 expansion. *Neurobiol Aging*, 69, 293 e1-293 e8.
- Connolly, O., Le Gall, L., McCluskey, G., Donaghy, C. G., Duddy, W. J. & Duguez, S. 2020. A Systematic Review of Genotype-Phenotype Correlation across Cohorts Having Causal Mutations of Different Genes in ALS. *J Pers Med*, 10.
- Conrad, C., Andreadis, A., Trojanowski, J. Q., Dickson, D. W., Kang, D., Chen, X., Wiederholt, W., Hansen, L., Masliah, E., Thal, L. J., Katzman, R., Xia, Y. & Saitoh, T. 1997. Genetic evidence for the involvement of tau in progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol*, 41, 277-81.
- Cooper-Knock, J., Hewitt, C., Highley, J. R., Brockington, A., Milano, A., Man, S., Martindale, J., Hartley, J., Walsh, T., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Fox, M., Bury, J., Mok, K., McDermott, C. J., Traynor, B. J., Kirby, J., Wharton, S. B., Ince, P. G., Hardy, J. & Shaw, P. J. 2012. Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain*, 135, 751-64.

- Cooper-Knock, J., Higginbottom, A., Connor-Robson, N., Bayatti, N., Bury, J. J., Kirby, J., Ninkina, N., Buchman, V. L., & Shaw, P. J. 2013. C9ORF72 transcription in a frontotemporal dementia case with two expanded alleles. *Neurology*, 81, 1719–1721.
- Corcia, P., Vourc'h, P., Guennoc, A. M., Del Mar Amador, M., Blasco, H., Andres, C., Couratier, P., Gordon, P. H. & Meininger, V. 2016. Pure cerebellar ataxia linked to large C9orf72 repeat expansion. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 17, 301-3.
- Costa, M. D. C., Teixeira-Castro, A., Constante, M., Magalhaes, M., Magalhaes, P., Cerqueira, J., Vale, J., Passao, V., Barbosa, C., Robalo, C., Coutinho, P., Barros, J., Santos, M. M., Sequeiros, J. & Maciel, P. 2006. Exclusion of mutations in the PRNP, JPH3, TBP, ATN1, CREBBP, POU3F2 and FTL genes as a cause of disease in Portuguese patients with a Huntington-like phenotype. *J Hum Genet*, 51, 645-651.
- Cruts, M., Gijssels, I., Van Der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J. J., Van Duijn, C., Peeters, K., Sciot, R., Santens, P., De Pooter, T., Mattheijssens, M., van den Broeck, M., Cuijt, I., Vennekens, K., De Deyn, P. P., Kumar-Singh, S. & van Broeckhoven, C. 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*, 442, 920-4.
- Cummings, J. 2004. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 351, 56-67.
- Curtis, A. F., Masellis, M., Hsiung, G. R., Moineddin, R., Zhang, K., Au, B., Millett, G., Mackenzie, I., Rogava, E., & Tierney, M. C. 2017. Sex differences in the prevalence of genetic mutations in FTD and ALS: A meta-analysis. *Neurology*, 89, 1633–1642.
- Davidson, Y. S., Barker, H., Robinson, A. C., Thompson, J. C., Harris, J., Troakes, C., Smith, B., Al-Saraj, S., Shaw, C., Rollinson, S., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M., Pickering-Brown, S., Snowden, J. S., & Mann, D. M. 2014. Brain distribution of dipeptide repeat proteins in frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta neuropathologica communications*, 2.
- Debray, S., Race, V., Crabbe, V., Herdewyn, S., Matthijs, G., Goris, A., Dubois, B., Thijs, V., Robberecht, W. & Van Damme, P. 2013. Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: a Belgian cohort study. *Neurobiol Aging*, 34, 2890 e7-2890 e12.
- DeJesus-Hernandez, M., Finch, N. A., Wang, X., Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Heckman, M. G., Vasilevich, A., Murray, M. E., Rousseau, L., Weesner, R., Lucido, A., Parsons, M., Chew, J., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., De Boer, J., Asmann, Y. W., Petrucelli, L., Boylan, K. B., Dickson, D. W., van Blitterswijk, M. & Rademakers, R. 2017. In-depth clinico-pathological examination of RNA foci in a large cohort of C9ORF72 expansion carriers. *Acta Neuropathol*, 134, 255-269.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., Wszolek, Z. K., Feldman, H., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Miller, B. L., Dickson, D. W., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R. & Rademakers, R. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72, 245-56.
- DeJesus-Hernandez, M., Rayaprolu, S., Soto-Ortolaza, A. I., Rutherford, N. J., Heckman, M. G., Traynor, S., Strongosky, A., Graff-Radford, N., Van Gerpen, J., Uitti, R. J., Shih, J. J., Lin, S. C., Wszolek, Z. K., Rademakers, R. & Ross, O. A. 2013. Analysis of the C9orf72 repeat in Parkinson's disease, essential tremor and restless legs syndrome. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 198-201.
- Dekker, A. M., Seelen, M., van Doormaal, P. T., van Rheenen, W., Bothof, R. J., van Riessen, T., Brands, W. J., van der Kooij, A. J., De Visser, M., Voermans, N. C., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., van den Berg, L. H. & van Es, M. A. 2016. Large-scale screening in sporadic

- amyotrophic lateral sclerosis identifies genetic modifiers in C9orf72 repeat carriers. *Neurobiol Aging*, 39, 220 e9-15.
- Delisle, M. B., Murrell, J. R., Richardson, R., Trofatter, J. A., Rascol, O., Soulages, X., Mohr, M., Calvas, P. & Ghetti, B. 1999. A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 98, 62-77.
- Deng, H., Gao, K. & Jankovic, J. 2014. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, 10, 337-348.
- Devenney, E., Hornberger, M., Irish, M., Mioshi, E., Burrell, J., Tan, R., Kiernan, M. C. & Hodges, J. R. 2014. Frontotemporal dementia associated with the C9ORF72 mutation: a unique clinical profile. *JAMA Neurol*, 71, 331-9.
- Dobson-Stone, C., Hallupp, M., Bartley, L., Shepherd, C. E., Halliday, G. M., Schofield, P. R., Hodges, J. R. & Kwok, J. B. 2012. C9ORF72 repeat expansion in clinical and neuropathologic frontotemporal dementia cohorts. *Neurology*, 79, 995-1001.
- Dobson-Stone, C., Hallupp, M., Loy, C. T., Thompson, E. M., Haan, E., Sue, C. M., Panegyres, P. K., Razquin, C., Seijo-Martinez, M., Rene, R., Gascon, J., Campdelacreu, J., Schmoll, B., Volk, A. E., Brooks, W. S., Schofield, P. R., Pastor, P. & Kwok, J. B. 2013. C9ORF72 repeat expansion in Australian and Spanish frontotemporal dementia patients. *PLoS One*, 8, e56899.
- Dols-Icardo, O., Garcia-Redondo, A., Rojas-Garcia, R., Sanchez-Valle, R., Noguera, A., Gomez-Tortosa, E., Pastor, P., Hernandez, I., Esteban-Perez, J., Suarez-Calvet, M., Anton-Aguirre, S., Amer, G., Ortega-Cubero, S., Blesa, R., Fortea, J., Alcolea, D., Capdevila, A., Antonell, A., Llado, A., Munoz-Blanco, J. L., Mora, J. S., Galan-Davila, L., Rodriguez De Rivera, F. J., Lleo, A. & Clarimon, J. 2014. Characterization of the repeat expansion size in C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Hum Mol Genet*, 23, 749-54.
- Elden, A. C., Kim, H. J., Hart, M. P., Chen-Plotkin, A. S., Johnson, B. S., Fang, X., Armarkola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M. M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Juhr, D., Gruber, P. J., Rub, U., Auburger, G., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., van Deerlin, V. M., Bonini, N. M. & Gitler, A. D. 2010. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 466, 1069-75.
- Erzurumluoglu, E., Cilingir, O., Ozbabalik Adapinar, B. D., Bilgic, B., Kocagil, S., Ozen, H., Durak Aras, B., Yenilmez, C. & Artan, S. 2019. The association between repeat number in C9orf72 and phenotypic variability in Turkish patients with frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging*, 76, 216 e1-216 e7.
- Estevez-Fraga, C., Magrinelli, F., Hensman Moss, D., Mulroy, E., Di Lazzaro, G., Latorre, A., Mackenzie, M., Houlden, H., Tabrizi, S. J. & Bhatia, K. P. 2021. Expanding the Spectrum of Movement Disorders Associated With C9orf72 Hexanucleotide Expansions. *Neurol Genet*, 7, e575.
- Fallis, B. A. & Hardiman, O. 2009. Aggregation of neurodegenerative disease in ALS kindreds. *Amyotroph Lateral Scler*, 10, 95-8.
- Farg, M. A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J. M., Yang, S., Atkinson, R. A., Levina, V., Halloran, M. A., Gleeson, P. A., Blair, I. P., Soo, K. Y., King, A. E. & Atkin, J. D. 2014. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*, 23, 3579-95.
- Federoff, M., Schottlaender, L. V., Houlden, H. & Singleton, A. 2015. Multiple system atrophy: the application of genetics in understanding etiology. *Clin Auton Res*, 25, 19-36.
- Ferrari, R., Kapogiannis, D., Huey, E. D. & Momeni, P. 2011. FTD and ALS: a tale of two diseases. *Current Alzheimer research*, 8, 273-294.
- Fiest, K. M., Roberts, J. I., Maxwell, C. J., Hogan, D. B., Smith, E. E., Frolkis, A., Cohen, A., Kirk, A., Pearson, D., Pringsheim, T., Venegas-Torres, A. & Jette, N. 2016. The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Neurol Sci*, 43 Suppl 1, S51-82.

- Figueroa, K. P., Gan, S. R., Perlman, S., Wilmot, G., Gomez, C. M., Schmahmann, J., Paulson, H., Shakkottai, V. G., Ying, S. H., Zesiewicz, T., Bushara, K., Geschwind, M., Xia, G., Subramony, S. H., Ashizawa, T., Pulst, S. M. & Kuo, S. H. 2018. C9orf72 repeat expansions as genetic modifiers for depression in spinocerebellar ataxias. *Mov Disord*, 33, 497-498.
- Finger, E. 2016. Frontotemporal Dementias. *Continuum (Minneapolis)*, 22, 464-89.
- Fogel, B. L., Pribadi, M., Pi, S., Perlman, S. L., Geschwind, D. H. & Coppola, G. 2012. C9ORF72 expansion is not a significant cause of sporadic spinocerebellar ataxia. *Mov Disord*, 27, 1832-3.
- Fokkema, I. F. A. C., Taschner, P. E. M., Schaafsma, G. C. P., Celli, J., Laros, J. F. J. & den Dunnen, J. T. 2011. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Human Mutation*, 32, 557-563.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E. & McHugh, P. R. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, 12, 189-198.
- Fournier, C., Barbier, M., Camuzat, A., Anquetil, V., Lattante, S., Clot, F., Cazeneuve, C., Rinaldi, D., Couratier, P., Deramecourt, V., Sabatelli, M., Belliard, S., Vercelletto, M., Forlani, S., Jornea, L., French, C., Genetic Research Network on FTLN/FTLN-ALS and FTLN-Exome Study Groups, Leguern, E., Brice, A. & Le Ber, I. 2019. Relations between C9orf72 expansion size in blood, age at onset, age at collection and transmission across generations in patients and presymptomatic carriers. *Neurobiol Aging*, 74, 234 e1-234 e8.
- Fratta, P., Mizielińska, S., Nicoll, A. J., Zloh, M., Fisher, E. M., Parkinson, G. & Isaacs, A. M. 2012. C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. *Sci Rep*, 2, 1016.
- Fratta, P., Polke, J. M., Newcombe, J., Mizielińska, S., Lashley, T., Poulter, M., Beck, J., Preza, E., Devoy, A., Sidle, K., Howard, R., Malaspina, A., Orrell, R. W., Clarke, J., Lu, C. H., Mok, K., Collins, T., Shoai, M., Nanji, T., Wray, S., Adamson, G., Pittman, A., Renton, A. E., Traynor, B. J., Sweeney, M. G., Revesz, T., Houlden, H., Mead, S., Isaacs, A. M. & Fisher, E. M. 2015. Screening a UK amyotrophic lateral sclerosis cohort provides evidence of multiple origins of the C9orf72 expansion. *Neurobiol Aging*, 36, 546 e1-7.
- Fratta, P., Poulter, M., Lashley, T., Rohrer, J. D., Polke, J. M., Beck, J., Ryan, N., Hensman, D., Mizielińska, S., Waite, A. J., Lai, M. C., Gendron, T. F., Petrucelli, L., Fisher, E. M., Revesz, T., Warren, J. D., Collinge, J., Isaacs, A. M. & Mead, S. 2013. Homozygosity for the C9orf72 GGGGCC repeat expansion in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*, 126, 401-9.
- Frick, P., Sellier, C., Mackenzie, I. R. A., Cheng, C. Y., Tahraoui-Bories, J., Martinat, C., Pasterkamp, R. J., Prudlo, J., Edbauer, D., Oulad-Abdelghani, M., Feederle, R., Charlet-Berguerand, N. & Neumann, M. 2018. Novel antibodies reveal presynaptic localization of C9orf72 protein and reduced protein levels in C9orf72 mutation carriers. *Acta Neuropathol Commun*, 6, 72.
- Gaig, C., Ezquerro, M., Marti, M. J., Valldeoriola, F., Munoz, E., Llado, A., Rey, M. J., Cardozo, A., Molinuevo, J. L. & Tolosa, E. 2008. Screening for the LRRK2 G2019S and codon-1441 mutations in a pathological series of parkinsonian syndromes and frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol Sci*, 270, 94-8.
- Gale, S. A., Acar, D. & Daffner, K. R. 2018. Dementia. *Am J Med*, 131, 1161-1169.
- Galimberti, D., Fenoglio, C., Serpente, M., Villa, C., Bonsi, R., Arighi, A., Fumagalli, G. G., Del Bo, R., Bruni, A. C., Anfossi, M., Clodomiro, A., Cupidi, C., Nacmias, B., Sorbi, S., Piaceri, I., Bagnoli, S., Bessi, V., Marcone, A., Cerami, C., Cappa, S. F., Filippi, M., Agosta, F., Magnani, G., Comi, G., Franceschi, M., Rainero, I., Giordana, M. T., Rubino, E., Ferrero, P., Rogaeva, E., Xi, Z., Confaloni, A., Piscopo, P., Bruno, G., Talarico, G., Cagnin, A., Clerici, F., Dell'Osso, B., Comi, G. P., Altamura, A. C., Mariani, C. & Scarpini, E. 2013. Autosomal Dominant Frontotemporal Lobar Degeneration Due to the C9ORF72

Hexanucleotide Repeat Expansion: Late-Onset Psychotic Clinical Presentation. *Biological Psychiatry*, 74, 384-391.

- Gallagher, M. D., Suh, E., Grossman, M., Elman, L., McCluskey, L., van Swieten, J. C., Al-Sarraj, S., Neumann, M., Gelpi, E., Ghetti, B., Rohrer, J. D., Halliday, G., van Broeckhoven, C., Seilhean, D., Shaw, P. J., Frosch, M. P., Alafuzoff, I., Antonell, A., Bogdanovic, N., Brooks, W., Cairns, N. J., Cooper-Knock, J., Cotman, C., Cras, P., Cruts, M., De Deyn, P. P., Decarli, C., Dobson-Stone, C., Engelborghs, S., Fox, N., Galasko, D., Gearing, M., Gijssels, I., Grafman, J., Hartikainen, P., Hatanpaa, K. J., Highley, J. R., Hodges, J., Hulette, C., Ince, P. G., Jin, L. W., Kirby, J., Kofler, J., Kril, J., Kwok, J. B., Levey, A., Lieberman, A., Llado, A., Martin, J. J., Masliah, E., McDermott, C. J., McKee, A., McLean, C., Mead, S., Miller, C. A., Miller, J., Munoz, D. G., Murrell, J., Paulson, H., Piguet, O., Rossor, M., Sanchez-Valle, R., Sano, M., Schneider, J., Silbert, L. C., Spina, S., van der Zee, J., van Langenhove, T., Warren, J., Wharton, S. B., White, C. L., 3rd, Woltjer, R. L., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., van Deerlin, V. & Chen-Plotkin, A. S. 2014. TMEM106B is a genetic modifier of frontotemporal lobar degeneration with C9orf72 hexanucleotide repeat expansions. *Acta Neuropathol*, 127, 407-18.
- Garcia-Redondo, A., Dols-Icardo, O., Rojas-Garcia, R., Esteban-Perez, J., Cordero-Vazquez, P., Munoz-Blanco, J. L., Catalina, I., Gonzalez-Munoz, M., Varona, L., Sarasola, E., Povedano, M., Sevilla, T., Guerrero, A., Pardo, J., Lopez de Munain, A., Marquez-Infante, C., de Rivera, F. J., Pastor, P., Jerico, I., de Arcaya, A. A., Mora, J. S., Clarimon, J., C9ORF72 Spanish Study Group, Gonzalo-Martinez, J. F., Juarez-Rufian, A., Atencia, G., Jimenez-Bautista, R., Moran, Y., Mascias, J., Hernandez-Barral, M., Kapetanovic, S., Garcia-Barcina, M., Alcalá, C., Vela, A., Ramirez-Ramos, C., Galan, L., Perez-Tur, J., Quintans, B., Sobrido, M. J., Fernandez-Torron, R., Poza, J. J., Gorostidi, A., Paradas, C., Villoslada, P., Larrode, P., Capablo, J. L., Pascual-Calvet, J., Goni, M., Morgado, Y., Guitart, M., Moreno-Laguna, S., Rueda, A., Martin-Estefania, C., Cemillan, C., Blesa, R. & Lleo, A. 2013. Analysis of the C9orf72 gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis in Spain and different populations worldwide. *Hum Mutat*, 34, 79-82.
- Geda, Y. E., Roberts, R. O., Knopman, D. S., Christianson, T. J., Pankratz, V. S., Ivnik, R. J., Boeve, B. F., Tangalos, E. G., Petersen, R. C. & Rocca, W. A. 2010. Physical exercise, aging, and mild cognitive impairment: a population-based study. *Arch Neurol*, 67, 80-6.
- Geda, Y. E., Roberts, R. O., Mielke, M. M., Knopman, D. S., Christianson, T. J., Pankratz, V. S., Boeve, B. F., Sochor, O., Tangalos, E. G., Petersen, R. C. & Rocca, W. A. 2014. Baseline neuropsychiatric symptoms and the risk of incident mild cognitive impairment: a population-based study. *Am J Psychiatry*, 171, 572-81.
- Gellera, C., Tiloca, C., del Bo, R., Corrado, L., Pensato, V., Agostini, J., Cereda, C., Ratti, A., Castellotti, B., Corti, S., Bagarotti, A., Cagnin, A., Milani, P., Gabelli, C., Riboldi, G., Mazzini, L., Soraru, G., D'Alfonso, S., Taroni, F., Comi, G. P., Ticozzi, N., Silani, V. & SLAGEN Consortium. 2013. Ubiquilin 2 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84, 183-7.
- Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Zhang, Y. J., Jansen-West, K., Ash, P. E., Caulfield, T., Daugherty, L., Dunmore, J. H., Castanedes-Casey, M., Chew, J., Cosio, D. M., van Blitterswijk, M., Lee, W. C., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W. & Petrucelli, L. 2013. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol*, 126, 829-44.
- Gijssels, I., van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., van Cauwenberghe, C., Pereson, S., Engelborghs, S., Sieben, A., De Jonghe, P., Vandenberghe, R., Santens, P., De Bleecker, J., Maes, G., Bäumer, V., Dillen, L., Joris, G., Cuijt, I., Corsmit, E., Elinck, E., van Dongen, J., Vermeulen, S., van den Broeck, M., Vaerenberg, C., Mattheijssens, M., Peeters, K., Robberecht, W., Cras, P., Martin, J.-J., De Deyn, P. P., Cruts, M. & van Broeckhoven, C. 2012. A C9orf72 promoter

- repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *The Lancet Neurology*, 11, 54-65.
- Gijselink, I., van Mossevelde, S., van der Zee, J., Sieben, A., Engelborghs, S., De Bleecker, J., Ivanoiu, A., Deryck, O., Edbauer, D., Zhang, M., Heeman, B., Baumer, V., van den Broeck, M., Mattheijssens, M., Peeters, K., Rogaeva, E., De Jonghe, P., Cras, P., Martin, J. J., De Deyn, P. P., Cruts, M. & van Broeckhoven, C. 2016. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry*, 21, 1112-24.
- Gill, A. L., Wang, M. Z., Levine, B., Premasiri, A. & Vieira, F. G. 2019. Primary Neurons and Differentiated NSC-34 Cells Are More Susceptible to Arginine-Rich ALS Dipeptide Repeat Protein-Associated Toxicity than Non-Differentiated NSC-34 and CHO Cells. *Int J Mol Sci*, 20.
- Gilman, S., Low, P., Quinn, N., Albanese, A., Ben-Shlomo, Y., Fowler, C., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lang, A., Lantos, P., Litvan, I., Mathias, C., Oliver, E., Robertson, D., Schatz, I. & Wenning, G. 1998. Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. American Autonomic Society and American Academy of Neurology. *Clin Auton Res*, 8, 359-62.
- Gilman, S., Wenning, G. K., Low, P. A., Brooks, D. J., Mathias, C. J., Trojanowski, J. Q., Wood, N. W., Colosimo, C., Dürr, A., Fowler, C. J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K. & Vidailhet, M. 2008. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology*, 71, 670-6.
- Goker-Alpan, O., Giasson, B. I., Eblan, M. J., Nguyen, J., Hurtig, H. I., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. & Sidransky, E. 2006. Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders. *Neurology*, 67, 908-10.
- Golbe, L. I., Davis, P. H., Schoenberg, B. S. & Duvoisin, R. C. 1988. Prevalence and natural history of progressive supranuclear palsy. *Neurology*, 38, 1031-1034.
- 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 FTLD subtypes and related tauopathies. *Neurology*, 65, 1817-9.
- Goldman, J. S., Quinzii, C., Dunning-Broadbent, J., Waters, C., Mitsumoto, H., Brannagan, T. H., 3rd, Cosentino, S., Huey, E. D., Nagy, P. & Kuo, S. H. 2014. Multiple system atrophy and amyotrophic lateral sclerosis in a family with hexanucleotide repeat expansions in C9orf72. *JAMA Neurol*, 71, 771-4.
- Gomes-Pereira, M., Bidichandani, S. I. & Monckton, D. G. 2004. Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.*, 277, 61-76.
- Gomez-Tortosa, E., Gallego, J., Guerrero-Lopez, R., Marcos, A., Gil-Neciga, E., Sainz, M. J., Diaz, A., Franco-Macias, E., Trujillo-Tiebas, M. J., Ayuso, C. & Perez-Perez, J. 2013. C9ORF72 hexanucleotide expansions of 20-22 repeats are associated with frontotemporal deterioration. *Neurology*, 80, 366-70.
- Gomez-Tortosa, E., Prieto-Jurczynska, C., Serrano, S., Franco-Macias, E., Olivie, L., Gallego, J., Guerrero-Lopez, R., Trujillo-Tiebas, M. J., Ayuso, C., Garcia Ruiz, P., Perez-Perez, J. & Sainz, M. J. 2016. Diversity of Cognitive Phenotypes Associated with C9ORF72 Hexanucleotide Expansion. *J Alzheimers Dis*, 52, 25-31.
- Gorno-Tempini, M. L., Hillis, A. E., Weintraub, S., Kertesz, A., Mendez, M., Cappa, S. F., Ogar, J. M., Rohrer, J. D., Black, S., Boeve, B. F., Manes, F., Dronkers, N. F., Vandenberghe, R., Rascovsky, K., Patterson, K., Miller, B. L., Knopman, D. S., Hodges, J. R., Mesulam, M. M. & Grossman, M. 2011. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*, 76, 1006-14.

- Gorno-Tempini, M. L., Murray, R. C., Rankin, K. P., Weiner, M. W. & Miller, B. L. 2004. Clinical, cognitive and anatomical evolution from nonfluent progressive aphasia to corticobasal syndrome: a case report. *Neurocase*, 10, 426-36.
- Govert, F. & Schneider, S. A. 2013. Huntington's disease and Huntington's disease-like syndromes: an overview. *Curr Opin Neurol*, 26, 420-7.
- Govoni, V., Della Coletta, E., Cesnik, E., Casetta, I. & Granieri, E. 2017. Can the age at onset give a clue to the pathogenesis of ALS? *Acta Neurol Belg*, 117, 221-227.
- Greenway, M. J., Andersen, P. M., Russ, C., Ennis, S., Cashman, S., Donaghy, C., Patterson, V., Swingler, R., Kieran, D., Prehn, J., Morrison, K. E., Green, A., Acharya, K. R., Brown, R. H. & Hardiman, O. 2006. ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 38, 411-413.
- Grossman, M. 2012. The non-fluent/agrammatic variant of primary progressive aphasia. *The Lancet Neurology*, 11, 545-555.
- Group, The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72, 971-83.
- Guerreiro, R. J., Lohmann, E., Bras, J. M., Gibbs, J. R., Rohrer, J. D., Gurnulian, N., Dursun, B., Bilgic, B., Hanagasi, H., Gurvit, H., Emre, M., Singleton, A. & Hardy, J. 2013. Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement. *JAMA Neurol*, 70, 78-84.
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A., Shaw, P. G., Kim, M. S., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J. D. & Wang, J. 2014. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, 507, 195-200.
- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K. & Minthon, L. 2006. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet Neurology*, 5, 228-234.
- Hardy, J. A. & Higgins, G. A. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256, 184-5.
- Harms, M., Benitez, B. A., Cairns, N., Cooper, B., Cooper, P., Mayo, K., Carrell, D., Faber, K., Williamson, J., Bird, T., Diaz-Arrastia, R., Foroud, T. M., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Mayeux, R., Chakraverty, S., Goate, A. M., Cruchaga, C. & NIA-LOAD/NCRAD Family Study Consortium. 2013a. C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in clinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol*, 70, 736-41.
- Harms, M. B., Cady, J., Zaidman, C., Cooper, P., Bali, T., Allred, P., Cruchaga, C., Baughn, M., Libby, R. T., Pestronk, A., Goate, A., Ravits, J. & Baloh, R. H. 2013b. Lack of C9ORF72 coding mutations supports a gain of function for repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, 34, 2234 e13-9.
- He, M., Yan, W.-Q., Zeng, S., Liu, Z., Zhou, Y., Zeng, X.-F., Zeng, J.-S., Jiang, H., Shen, L., Tang, B.-S. & Wang, J.-L. 2016. C9ORF72 repeat expansion is not detected in sporadic ataxia patients in mainland China. *Journal of the Neurological Sciences*, 361, 181-183.
- Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. & Evans, D. A. 2013. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*, 80, 1778-83.
- 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, 292-9.
- Hinz, F. I. & Geschwind, D. H. 2017. Molecular Genetics of Neurodegenerative Dementias. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
- Hodges, J. R., Patterson, K., Oxbury, S. & Funnell, E. 1992. Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain* 115, 1783-806.

- Hogan, D. B., Jette, N., Fiest, K. M., Roberts, J. I., Pearson, D., Smith, E. E., Roach, P., Kirk, A., Pringsheim, T. & Maxwell, C. J. 2016. The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *Can J Neurol Sci*, 43 Suppl 1, S96-S109.
- Hoglinger, G. U., Melhem, N. M., Dickson, D. W., Sleiman, P. M., Wang, L. S., Klei, L., Rademakers, R., De Silva, R., Litvan, I., Riley, D. E., van Swieten, J. C., Heutink, P., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Vandrovicova, J., Hurtig, H. I., Gross, R. G., Maetzler, W., Goldwurm, S., Tolosa, E., Borroni, B., Pastor, P., PSP Genetics Study Group, Cantwell, L. B., Han, M. R., Dillman, A., van der Brug, M. P., Gibbs, J. R., Cookson, M. R., Hernandez, D. G., Singleton, A. B., Farrer, M. J., Yu, C. E., Golbe, L. I., Revesz, T., Hardy, J., Lees, A. J., Devlin, B., Hakonarson, H., Muller, U. & Schellenberg, G. D. 2011. Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *Nat Genet*, 43, 699-705.
- Hoglinger, G. U., Respondek, G., Stamelou, M., Kurz, C., Josephs, K. A., Lang, A. E., Mollenhauer, B., Muller, U., Nilsson, C., Whitwell, J. L., Arzberger, T., Englund, E., Gelpi, E., Giese, A., Irwin, D. J., Meissner, W. G., Pantelyat, A., Rajput, A., van Swieten, J. C., Troakes, C., Antonini, A., Bhatia, K. P., Bordelon, Y., Compta, Y., Corvol, J. C., Colosimo, C., Dickson, D. W., Dodel, R., Ferguson, L., Grossman, M., Kassubek, J., Krismer, F., Levin, J., Lorenzl, S., Morris, H. R., Nestor, P., Oertel, W. H., Poewe, W., Rabinovici, G., Rowe, J. B., Schellenberg, G. D., Seppi, K., van Eimeren, T., Wenning, G. K., Boxer, A. L., Golbe, L. I., Litvan, I. & Movement Disorder Society-endorsed PSP Study Group. 2017. Clinical diagnosis of progressive supranuclear palsy: The movement disorder society criteria. *Mov Disord*, 32, 853-864.
- Hsiao, C. T., Tsai, P. C., Liao, Y. C., Lee, Y. C. & Soong, B. W. 2014. C9ORF72 repeat expansion is not a significant cause of late onset cerebellar ataxia syndrome. *J Neurol Sci*, 347, 322-4.
- Hsiung, G. Y., DeJesus-Hernandez, M., Feldman, H. H., Sengdy, P., Bouchard-Kerr, P., Dwosh, E., Butler, R., Leung, B., Fok, A., Rutherford, N. J., Baker, M., Rademakers, R. & Mackenzie, I. R. 2012. Clinical and pathological features of familial frontotemporal dementia caused by C9ORF72 mutation on chromosome 9p. *Brain*, 135, 709-22.
- Hubers, A., Marroquin, N., Schmoll, B., Vielhaber, S., Just, M., Mayer, B., Hogel, J., Dorst, J., Mertens, T., Just, W., Aulitzky, A., Wais, V., Ludolph, A. C., Kubisch, C., Weishaupt, J. H. & Volk, A. E. 2014. Polymerase chain reaction and Southern blot-based analysis of the C9orf72 hexanucleotide repeat in different motor neuron diseases. *Neurobiol Aging*, 35, 1214 e1-6.
- Hudson, A. 1981. Amyotrophic lateral sclerosis and its association with dementia, parkinsonism and other neurological disorders: a review. *Brain* 104, 217-47.
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., De Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L. K., Norton, J., Morris, J. C., Reed, L. A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P. R., Hayward, N., Kwok, J. B., Schofield, P. R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B. A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702-5.
- Iacoangeli, A., AL Khleifat, A., Jones, A. R., Sproviero, W., Shatunov, A., Opie-Martin, S., Alzheimer's Disease Neuroimaging, Initiative, Morrison, K. E., Shaw, P. J., Shaw, C. E., Fogh, I., Dobson, R. J., Newhouse, S. J. & Al-Chalabi, A. 2019. C9orf72 intermediate expansions of 24-30 repeats are associated with ALS. *Acta Neuropathol Commun*, 7, 115.
- Iazzolino, B., Peotta, L., Zucchetti, J. P., Canosa, A., Manera, U., Vasta, R., Grassano, M., Palumbo, F., Brunetti, M., Barberis, M., Sbaiz, L., Moglia, C., Calvo, A. & Chio, A. 2021. Differential Neuropsychological Profile of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis With and Without C9orf72 Mutation. *Neurology*, 96, e141-e152.

- Ida, C. M., Butz, M. L., Lundquist, P. A. & Dawson, D. B. 2018. C9orf72 Repeat Expansion Frequency among Patients with Huntington Disease Genetic Testing. *Neurodegener Dis*, 18, 239-253.
- Jackson, J. L., Finch, N. A., Baker, M. C., Kachergus, J. M., DeJesus-Hernandez, M., Pereira, K., Christopher, E., Prudencio, M., Heckman, M. G., Thompson, E. A., Dickson, D. W., Shah, J., Oskarsson, B., Petrucelli, L., Rademakers, R. & van Blitterswijk, M. 2020. Elevated methylation levels, reduced expression levels, and frequent contractions in a clinical cohort of C9orf72 expansion carriers. *Mol Neurodegener*, 15, 7.
- Jacquemont, M. L., Campion, D., Hahn, V., Tallaksen, C., Frebourg, T., Brice, A. & Durr, A. 2002. Spastic paraparesis and atypical dementia caused by PSEN1 mutation (P264L), responsible for Alzheimer's disease. *J Med Genet*, 39, E2.
- Jarmolowicz, A. I., Chen, H. Y. & Panegyres, P. K. 2015. The patterns of inheritance in early-onset dementia: Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 30, 299-306.
- Jeffreys, A. J., Tamaki, K., Macleod, A., Monckton, D. G., Neil, D. L. & Armour, J. A. 1994. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nat Genet*, 6, 136-45.
- Jiao, B., Guo, J. F., Wang, Y. Q., Yan, X. X., Zhou, L., Liu, X. Y., Zhang, F. F., Zhou, Y. F., Xia, K., Tang, B. S. & Shen, L. 2013. C9orf72 mutation is rare in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and essential tremor in China. *Front Cell Neurosci*, 7, 164.
- Johnson, J. O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., van Deerlin, V. M., Trojanowski, J. Q., Gibbs, J. R., Brunetti, M., Gronka, S., Wu, J., Ding, J., McCluskey, L., Martinez-Lage, M., Falcone, D., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Chong, S., Schymick, J. C., Rothstein, J., Landi, F., Wang, Y. D., Calvo, A., Mora, G., Sabatelli, M., Monsurro, M. R., Battistini, S., Salvi, F., Spataro, R., Sola, P., Borghero, G., ITALSGEN Consortium, Galassi, G., Scholz, S. W., Taylor, J. P., Restagno, G., Chio, A. & Traynor, B. J. 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*, 68, 857-64.
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Vande Velde, C., Bouchard, J. P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P. F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N. & Rouleau, G. A. 2008. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 40, 572-4.
- Kaivola, K., Kiviharju, A., Jansson, L., Rantalainen, V., Eriksson, J. G., Strandberg, T. E., Laaksovirta, H., Renton, A. E., Traynor, B. J., Myllykangas, L. & Tienari, P. J. 2019. C9orf72 hexanucleotide repeat length in older population: normal variation and effects on cognition. *Neurobiol Aging*, 84, 242 e7-242 e12.
- Kaivola, K., Salmi, S. J., Jansson, L., Launes, J., Hokkanen, L., Niemi, A. K., Majamaa, K., Lahti, J., Eriksson, J. G., Strandberg, T., Laaksovirta, H. & Tienari, P. J. 2020. Carriership of two copies of C9orf72 hexanucleotide repeat intermediate-length alleles is a risk factor for ALS in the Finnish population. *Acta Neuropathol Commun*, 8, 187.
- Kaur, J., Parveen, S., Shamim, U., Sharma, P., Suroliya, V., Sonkar, A. K., Ahmad, I., Garg, J., Anand, K. S., Laskar, S., Chowdhury, D., Kushwaha, S., Goyal, V., Srivastava, A. K., Singh, G. & Faruq, M. 2020. Investigations of Huntington's Disease and Huntington's Disease-Like Syndromes in Indian Choreatic Patients. *J Huntingtons Dis*, 9, 283-289.
- Keckarevic, M., Savic, D., Svetel, M., Kostic, V., Vukosavic, S. & Romac, S. 2005. Yugoslav HD phenocopies analyzed on the presence of mutations in PrP, ferritin, and Jp-3 genes. *Int J Neurosci*, 115, 299-301.
- Kertesz, A. & McMonagle, P. 2011. The overlapping syndromes of the pick complex. *Curr Alzheimer Res*, 8, 224-8.
- Knopman, D. S. & Roberts, R. O. 2011. Estimating the number of persons with frontotemporal lobar degeneration in the US population. *J Mol Neurosci*, 45, 330-5.
- Kohli, M. A., John-Williams, K., Rajbhandary, R., Naj, A., Whitehead, P., Hamilton, K., Carney, R. M., Wright, C., Crocco, E., Gwirtzman, H. E., Lang, R., Beecham, G., Martin, E. R.,

- Gilbert, J., Benatar, M., Small, G. W., Mash, D., Byrd, G., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. & Zuchner, S. 2013. Repeat expansions in the C9ORF72 gene contribute to Alzheimer's disease in Caucasians. *Neurobiol Aging*, 34, 1519 e5-12.
- 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? . *Hum Mol Genet*, 8, 2047-53.
- Korbie, D. J. & Mattick, J. S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*, 3, 1452-6.
- Koressaar, T. & Remm, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23, 1289-91.
- Kostic, V. S., Dobricic, V., Stankovic, I., Ralic, V. & Stefanova, E. 2014. C9orf72 expansion as a possible genetic cause of Huntington disease phenocopy syndrome. *J Neurol*, 261, 1917-21.
- Kovanda, A., Zalar, M., Sket, P., Plavec, J. & Rogelj, B. 2015. Anti-sense DNA d(GGCCCC)n expansions in C9ORF72 form i-motifs and protonated hairpins. *Sci Rep*, 5, 17944.
- Krüger, S., Battke, F., Sprecher, A., Munz, M., Synofzik, M., Schöls, L., Gasser, T., Grehl, T., Prudlo, J. & Biskup, S. 2016. Rare Variants in Neurodegeneration Associated Genes Revealed by Targeted Panel Sequencing in a German ALS Cohort. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9.
- Kwiatkowski, T. J. J., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., De Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. C., Horvitz, H. R., Landers, J. E. & Brown, R. H. J. 2009. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 323, 1205-8.
- Laaksovirta, H., Launes, J., Jansson, L., Traynor, B. J., Kaivola, K. & Tienari, P. J. 2022. ALS in Finland: Major Genetic Variants and Clinical Characteristics of Patients With and Without the C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion. *Neurol Genet*, 8, e665.
- Laaksovirta, H., Peuralinna, T., Schymick, J. C., Scholz, S. W., Lai, S.-L., Myllykangas, L., Sulkava, R., Jansson, L., Hernandez, D. G., Gibbs, J. R., Nalls, M. A., Heckerman, D., Tienari, P. J. & Traynor, B. J. 2010. Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *The Lancet Neurology*, 9, 978-985.
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., Holmes, J B., Kattman, B. L. & Maglott, D. R. 2018. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*, 46, D1062-D1067.
- Lattante, S., Millecamps, S., Stevanin, G., Rivaud-PÉchoux, S., Moigneu, C., Camuzat, A., Da Barroca, S., Mundwiller, E., Couarch, P., Salachas, F., Hannequin, D., Meininger, V., Pasquier, F., Seilhean, D., Couratier, P., Danel-Brunaud, V., Bonnet, A. M., Tranchant, C., Leguern, E., Brice, A., Le Ber, I., Kabashi, E. & French Research Network on FTD and FTD-ALS. 2014. Contribution of ATXN2 intermediary polyQ expansions in a spectrum of neurodegenerative disorders. *Neurology*, 83, 990-5.
- Lattante, S., Pomponi, M. G., Conte, A., Marangi, G., Bisogni, G., Patanella, A. K., Meleo, E., Lunetta, C., Riva, N., Mosca, L., Carrera, P., Bee, M., Zollino, M. & Sabatelli, M. 2018. ATXN1 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, 64, 157 e1-157 e5.
- Le Ber, I., Camuzat, A., Berger, E., Hannequin, D., Laquerrière, A., Golfier, V., Seilhean, D., Viennet, G., Couratier, P., Verpillat, P., Heath, S., Camu, W., Martinaud, O., Lacomblez, L., Vercelletto, M., Salachas, F., Sellal, F., Didic, M., Thomas-Anterion, C., Puel, M., Michel, B. F., Besse, C., Duyckaerts, C., Meininger, V., Campion, D., Dubois, B., Brice, A. &

- French Research Network on FTD/FTD-MND. 2009. Chromosome 9p-linked families with frontotemporal dementia associated with motor neuron disease. *Neurology*, 72, 1669-76.
- Le Ber, I., Camuzat, A., Guillot-Noel, L., Hannequin, D., Lacomblez, L., Golfier, V., Puel, M., Martinaud, O., Deramecourt, V., Rivaud-Pechoux, S., Millecamps, S., Vercelletto, M., Couratier, P., Sellal, F., Pasquier, F., Salachas, F., Thomas-Anterion, C., Didic, M., Pariente, J., Seilhean, D., Ruberg, M., Wargon, I., Blanc, F., Camu, W., Michel, B. F., Berger, E., Sauvee, M., Thauvin-Robinet, C., Mondon, K., Tournier-Lasserre, E., Goizet, C., Fleury, M., Viennet, G., Verpillat, P., Meininger, V., Duyckaerts, C., Dubois, B. & Brice, A. 2013. C9ORF72 repeat expansions in the frontotemporal dementias spectrum of diseases: a flow-chart for genetic testing. *J Alzheimers Dis*, 34, 485-99.
- Lehmer, C., Oeckl, P., Weishaupt, J. H., Volk, A. E., Diehl-Schmid, J., Schroeter, M. L., Lauer, M., Kornhuber, J., Levin, J., Fassbender, K., Landwehrmeyer, B., German Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration, Schludi, M. H., Arzberger, T., Kremmer, E., Flatley, A., Feederle, R., Steinacker, P., Weydt, P., Ludolph, A. C., Edbauer, D. & Otto, M. 2017. Poly-GP in cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. *EMBO Mol Med*, 9, 859-868.
- Lesage, S., Le Ber, I., Condroyer, C., Broussolle, E., Gabelle, A., Thobois, S., Pasquier, F., Mondon, K., Dion, P. A., Rochefort, D., Rouleau, G. A., Durr, A., Brice, A. & French Parkinson's Disease Genetics Study Group. 2013. C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain*, 136, 385-91.
- Levine, T. P., Daniels, R. D., Gatta, A. T., Wong, L. H. & Hayes, M. J. 2013. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics*, 29, 499-503.
- Lillo, P. & Hodges, J. R. 2009. Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders. *J Clin Neurosci*, 16, 1131-5.
- Lin, C. H., Chen, T. F., Chiu, M. J., Lin, H. I. & Wu, R. M. 2014. Lack of c9orf72 repeat expansion in taiwanese patients with mixed neurodegenerative disorders. *Front Neurol*, 5, 59.
- Lincoln, S. J., Ross, O. A., Milkovic, N. M., Dickson, D. W., Rajput, A., Robinson, C. A., Papapetropoulos, S., Mash, D. C. & Farrer, M. J. 2007. Quantitative PCR-based screening of alpha-synuclein multiplication in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*, 13, 340-2.
- Lindquist, S. G., Duno, M., Batbayli, M., Puschmann, A., Braendgaard, H., Mardosiene, S., Svenstrup, K., Pinborg, L. H., Vestergaard, K., Hjermand, L. E., Stokholm, J., Andersen, B. B., Johannsen, P. & Nielsen, J. E. 2013. Corticobasal and ataxia syndromes widen the spectrum of C9ORF72 hexanucleotide expansion disease. *Clin Genet*, 83, 279-83.
- Liu, E. Y., Russ, J., Wu, K., Neal, D., Suh, E., McNally, A. G., Irwin, D. J., van Deerlin, V. M. & Lee, E. B. 2014. C9orf72 hypermethylation protects against repeat expansion-associated pathology in ALS/FTD. *Acta Neuropathol*, 128, 525-41.
- Lomen-Hoerth, C., Anderson, T. & Miller, B. 2002. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology*, 59, 1077-9.
- Longinetti, E. & Fang, F. 2019. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol*, 32, 771-776.
- Luty, A. A., Kwok, J. B., Thompson, E. M., Blumbergs, P., Brooks, W. S., Loy, C. T., Dobson-Stone, C., Panegyres, P. K., Hecker, J., Nicholson, G. A., Halliday, G. M. & Schofield, P. R. 2008. Pedigree with frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease and Tar DNA binding protein-43 positive neuropathology: genetic linkage to chromosome 9. *BMC Neurol*, 8, 32.
- Mackenzie, I. R., Frick, P., Grasser, F. A., Gendron, T. F., Petrucelli, L., Cashman, N. R., Edbauer, D., Kremmer, E., Prudlo, J., Troost, D. & Neumann, M. 2015. Quantitative analysis and clinico-pathological correlations of different dipeptide repeat protein pathologies in C9ORF72 mutation carriers. *Acta Neuropathol*, 130, 845-61.

- Mackenzie, I. R., Neumann, M., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G. G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I. E., Ince, P. G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A. J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q. & Mann, D. M. 2010. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol*, 119, 1-4.
- Majounie, E., Abramzon, Y., Renton, A. E., Perry, R., Bassett, S. S., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Hardy, J., Singleton, A. B. & Traynor, B. J. 2012a. Repeat expansion in C9ORF72 in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 366, 283-4.
- Majounie, E., Renton, A. E., Mok, K., Dopper, E. G. P., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., van Swieten, J. C., Abramzon, Y., Johnson, J. O., Sendtner, M., Pamphlett, R., Orrell, R. W., Mead, S., Sidle, K. C., Houlden, H., Rohrer, J. D., Morrison, K. E., Pall, H., Talbot, K., Ansorge, O., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Sabatelli, M., Mora, G., Corbo, M., Giannini, F., Calvo, A., Englund, E., Borghero, G., Floris, G. L., Remes, A. M., Laaksovirta, H., McCluskey, L., Trojanowski, J. Q., van Deerlin, V. M., Schellenberg, G. D., Nalls, M. A., Drory, V. E., Lu, C.-S., Yeh, T.-H., Ishiura, H., Takahashi, Y., Tsuji, S., Le Ber, I., Brice, A., Drepper, C., Williams, N., Kirby, J., Shaw, P., Hardy, J., Tienari, P. J., Heutink, P., Morris, H. R., Pickering-Brown, S. & Traynor, B. J. 2012b. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology*, 11, 323-330.
- Mann, D. M., Rollinson, S., Robinson, A., Bennion Callister, J., Thompson, J. C., Snowden, J. S., Gendron, T., Petrucelli, L., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M. Davidson, Y., & Pickering-Brown, S. 2013. Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta neuropathologica communications*, 1.
- Mariani, L. L., Tesson, C., Charles, P., Cazeneuve, C., Hahn, V., Youssov, K., Freeman, L., Grabli, D., Roze, E., Noel, S., Peuvion, J. N., Bachoud-Levi, A. C., Brice, A., Stevanin, G. & Durr, A. 2016. Expanding the Spectrum of Genes Involved in Huntington Disease Using a Combined Clinical and Genetic Approach. *JAMA Neurol*, 73, 1105-14.
- Marin, B., Boumediene, F., Logroscino, G., Couratier, P., Babron, M. C., Leutenegger, A. L., Copetti, M., Preux, P. M. & Beghi, E. 2017. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*, 46, 57-74.
- Marjanovic, I. V., Selak-Djokic, B., Peric, S., Jankovic, M., Arsenijevic, V., Basta, I., Lavrnica, D., Stefanova, E. & Stevic, Z. 2017. Comparison of the clinical and cognitive features of genetically positive ALS patients from the largest tertiary center in Serbia. *J Neurol*, 264, 1091-1098.
- Marogianni, C., Rikos, D., Provas, A., Dadouli, K., Ntellas, P., Tsitsi, P., Patrinos, G., Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G. & Xiromerisiou, G. 2019. The role of C9orf72 in neurodegenerative disorders: a systematic review, an updated meta-analysis, and the creation of an online database. *Neurobiol Aging*, 84, 238 e25-238 e34.
- Martins, J., Damasio, J., Mendes, A., Vila-Cha, N., Alves, J. E., Ramos, C., Cavaco, S., Silva, J., Alonso, I. & Magalhaes, M. 2018. Clinical spectrum of C9orf72 expansion in a cohort of Huntington's disease phenocopies. *Neurol Sci*, 39, 741-744.
- 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., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R. & Kawakami, H. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 465, 223-6.
- Mathis, S., Goizet, C., Soulages, A., Vallat, J. M. & Masson, G. L. 2019. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. *J Neurol Sci*, 399, 217-226.
- McFarland, N. R. 2016. Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 22, 1117-1142.

- McGoldrick, P., Zhang, M., van Blitterswijk, M., Sato, C., Moreno, D., Xiao, S., Zhang, A. B., McKeever, P. M., Weichert, A., Schneider, R., Keith, J., Petrucelli, L., Rademakers, R., Zinman, L., Robertson, J. & Rogaeva, E. 2018. Unaffected mosaic C9orf72 case: RNA foci, dipeptide proteins, but upregulated C9orf72 expression. *Neurology*, 90, e323-e331.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E. M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34, 939-44.
- McKhann, G. M., Albert, M. S., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., Trojanowski, J. Q. & Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. 2001. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol*, 58, 1803-9.
- 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. *Alzheimers Dement*, 7, 263-9.
- Mehrabian, S., Thonberg, H., Raycheva, M., Lilius, L., Stoyanova, K., Forsell, C., Cavallin, L., Nesheva, D., Westman, E., Toncheva, D., Traykov, L., Winblad, B. & Graff, C. 2018. Phenotypic variability and neuropsychological findings associated with C9orf72 repeat expansions in a Bulgarian dementia cohort. *PLoS One*, 13, e0208383.
- Meloni, M., Farris, R., Solla, P., Mascia, M. M., Marrosu, F. & Cannas, A. 2017. C9ORF72 Intermediate Repeat Expansion in a Patient With Psychiatric Disorders and Progressive Cerebellar Ataxia. *Neurologist*, 22, 245-246.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16, 1215.
- Mizielinska, S., Gronke, S., Niccoli, T., Ridler, C. E., Clayton, E. L., Devoy, A., Moens, T., Norona, F. E., Woollacott, I. O. C., Pietrzyk, J., Cleverley, K., Nicoll, A. J., Pickering-Brown, S., Dols, J., Cabecinha, M., Hendrich, O., Fratta, P., Fisher, E. M. C., Partridge, L. & Isaacs, A. M. 2014. C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science*, 345, 1192-1194.
- Mizielinska, S., Lashley, T., Norona, F. E., Clayton, E. L., Ridler, C. E., Fratta, P. & Isaacs, A. M. 2013. C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta Neuropathol*, 126, 845-57.
- Mok, K., Traynor, B. J., Schymick, J., Tienari, P. J., Laaksovirta, H., Peuralinna, T., Myllykangas, L., Chio, A., Shatunov, A., Boeve, B. F., Boxer, A. L., DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Waite, A., Williams, N., Morris, H. R., Simon-Sanchez, J., van Swieten, J. C., Heutink, P., Restagno, G., Mora, G., Morrison, K. E., Shaw, P. J., Rollinson, P. S., Al-Chalabi, A., Rademakers, R., Pickering-Brown, S., Orrell, R. W., Nalls, M. A. & Hardy, J. 2012a. Chromosome 9 ALS and FTD locus is probably derived from a single founder. *Neurobiol Aging*, 33, 209 e3-8.
- Mok, K. Y., Koutsis, G., Schottlaender, L. V., Polke, J., Panas, M. & Houlden, H. 2012b. High frequency of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat in familial and sporadic Greek ALS patients. *Neurobiol Aging*, 33, 1851 e1-5.
- Mori, K., Arzberger, T., Grasser, F. A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S. M., Schludi, M. H., van der Zee, J., Cruys, M., van Broeckhoven, C., Kremmer, E., Kretschmar, H. A., Haass, C. & Edbauer, D. 2013a. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol*, 126, 881-93.
- Mori, K., Weng, S. M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretschmar, H. A., Cruys, M., van Broeckhoven, C. & Haass, C., & Edbauer, D. 2013b.

- The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLN/ALS. *Science*, 339, 1335-8.
- Morita, M., Al-Chalabi, A., Andersen, P. M., Hosler, B., Sapp, P., Englund, E., Mitchell, J. E., Habgood, J. J., De Bellerocche, J., Xi, J., Jongjaroenprasert, W., Horvitz, H. R., Gunnarsson, L. G. & Brown, R. H. J. 2006. A locus on chromosome 9p confers susceptibility to ALS and frontotemporal dementia. *Neurology*, 66, 839-44.
- Morris, H., Vaughan, J., Datta, S., Bandopadhyay, R., Rohan De Silva, H., Schrag, A., Cairns, N., Burn, D., Nath, U., Lantos, P., Daniel, S., Lees, A., Quinn, N. & Wood, N. 2000. Multiple system atrophy/progressive supranuclear palsy: alpha-Synuclein, synphilin, tau, and APOE. *Neurology*, 55, 1918-20.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51, 263-73.
- Multiple-System Atrophy Research Collaboration. 2013. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med*, 369, 233-44.
- Murphy, N. A., Arthur, K. C., Tienari, P. J., Houlden, H., Chio, A. & Traynor, B. J. 2017. Age-related penetrance of the C9orf72 repeat expansion. *Sci Rep*, 7, 2116.
- Nakamura, K., Jeong, S. Y., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S. & Kanazawa, I. 2001. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum Mol Genet*, 10, 1441-8.
- Neary, D., Snowden, J. & Mann, D. 2005. Frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 4, 771-780.
- Neu, S. C., Pa, J., Kukull, W., Beekly, D., Kuzma, A., Gangadharan, P., Wang, L. S., Romero, K., Arneric, S. P., Redolfi, A., Orlandi, D., Frisoni, G. B., Au, R., Devine, S., Auerbach, S., Espinosa, A., Boada, M., Ruiz, A., Johnson, S. C., Kosciak, R., Wang, J. J., Hsu, W. C., Chen, Y. L. & Toga, A. W. 2017. Apolipoprotein E Genotype and Sex Risk Factors for Alzheimer Disease: A Meta-analysis. *JAMA Neurol*, 74, 1178-1189.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314, 130-3.
- Ng, A. & Tan, E. 2017. Intermediate C9orf72 alleles in neurological disorders: does size really matter? *J Med Genet*, 54, 591-597.
- Ng, T. P., Feng, L., Nyunt, M. S., Feng, L., Gao, Q., Lim, M. L., Collinson, S. L., Chong, M. S., Lim, W. S., Lee, T. S., Yap, P. & Yap, K. B. 2016. Metabolic Syndrome and the Risk of Mild Cognitive Impairment and Progression to Dementia: Follow-up of the Singapore Longitudinal Ageing Study Cohort. *JAMA Neurol*, 73, 456-63.
- Nicholl, D., Bennett, P., Hiller, L., Bonifati, V., Vanacore, N., Fabbrini, G., Marconi, R., Colosimo, C., Lamberti, P., Stocchi, F., Bonuccelli, U., Vieregge, P., Ramsden, D., Meco, G. & Williams, A. 1999. A study of five candidate genes in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. European Study Group on Atypical Parkinsonism. *Neurology*, 53, 1415-21.
- Nicholl, D. J., Greenstone, M. A., Clarke, C. E., Rizzu, P., Crooks, D., Crowe, A., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. & Heutink, P. 2003. An English kindred with a novel recessive tauopathy and respiratory failure. *Ann Neurol*, 54, 682-6.
- Nordin, A., Akimoto, C., Wuolikainen, A., Alstermark, H., Jonsson, P., Birve, A., Marklund, S. L., Graffmo, K. S., Forsberg, K., Brannstrom, T. & Andersen, P. M. 2015. Extensive size variability of the GGGGCC expansion in C9orf72 in both neuronal and non-neuronal tissues in 18 patients with ALS or FTD. *Hum Mol Genet*, 24, 3133-42.

- Nuytemans, K., Bademci, G., Kohli, M. M., Beecham, G. W., Wang, L., Young, J. I., Nahab, F., Martin, E. R., Gilbert, J. R., Benatar, M., Haines, J. L., Scott, W. K., Zuchner, S., Pericak-Vance, M. A. & Vance, J. M. 2013. C9ORF72 intermediate repeat copies are a significant risk factor for Parkinson disease. *Ann Hum Genet*, 77, 351-63.
- Nuytemans, K., Inchausti, V., Beecham, G. W., Wang, L., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Mash, D. C., Frosch, M. P., Foroud, T. M., Honig, L. S., Montine, T. J., Dawson, T. M., Martin, E. R., Scott, W. K. & Vance, J. M. 2014. Absence of C9ORF72 expanded or intermediate repeats in autopsy-confirmed Parkinson's disease. *Mov Disord*, 29, 827-30.
- O'Brien, M., Burke, T., Heverin, M., Vajda, A., McLaughlin, R., Gibbons, J., Byrne, S., Pinto-Grau, M., Elamin, M., Pender, N. & Hardiman, O. 2017. Clustering of Neuropsychiatric Disease in First-Degree and Second-Degree Relatives of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*, 74, 1425-1430.
- O'Rourke, J. G., Bogdanik, L., Yanez, A., Lall, D., Wolf, A. J., Muhammad, A. K., Ho, R., Carmona, S., Vit, J. P., Zarrow, J., Kim, K. J., Bell, S., Harms, M. B., Miller, T. M., Dangler, C. A., Underhill, D. M., Goodridge, H. S., Lutz, C. M. & Baloh, R. H. 2016. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*, 351, 1324-9.
- Ogaki, K., Li, Y., Takanashi, M., Ishikawa, K., Kobayashi, T., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kishi, M., Yoshino, H., Funayama, M., Tsukamoto, T., Shioya, K., Yokochi, M., Imai, H., Sasaki, R., Kokubo, Y., Kuzuhara, S., Motoi, Y., Tomiyama, H. & Hattori, N. 2013. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTLD, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord*, 19, 15-20.
- 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 Dis Assoc Disord*, 21, S23-30.
- Origone, P., Verdiani, S., Ciotti, P., Gulli, R., Bellone, E., Marchese, R., Abbruzzese, G. & Mandich, P. 2013. Enlarging the clinical spectrum associated with C9orf 72 repeat expansions: findings in an Italian cohort of patients with parkinsonian syndromes and relevance for genetic counselling. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14, 479-80.
- Owens, E., Josephs, K. A., Savica, R., Hassan, A., Klassen, B., Bower, J., Maraganore, D., Matsumoto, J. & Ahlskog, J. E. 2016. The clinical spectrum and natural history of pure akinesia with gait freezing. *J Neurol*, 263, 2419-2423.
- Ozawa, T., Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., Ahmadi, K. R., Quinn, N., Lees, A. J., Shaw, K., Wullner, U., Berciano, J., Moller, J. C., Kamm, C., Burk, K., Josephs, K. A., Barone, P., Tolosa, E., Goldstein, D. B., Wenning, G., Geser, F., Holton, J. L., Gasser, T., Revesz, T., Wood, N. W. & European MSA study group. 2006. The alpha-synuclein gene in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 77, 464-7.
- Ozawa, T., Takano, H., Onodera, O., Kobayashi, H., Ikeuchi, T., Koide, R., Okuizumi, K., Shimohata, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H. & Tsuji, S. 1999. No mutation in the entire coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Neurosci Lett*, 270, 110-2.
- Padovani, A., Agosti, C., Premi, E., Bellelli, G. & Borroni, B. 2007. Extrapiramidal symptoms in Frontotemporal Dementia: prevalence and clinical correlations. *Neurosci Lett*, 422, 39-42.
- Pamphlett, R., Cheong, P. L., Trent, R. J. & Yu, B. 2012. Transmission of C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an Australian trio study. *Neuroreport*, 23, 556-9.
- Papp, M. I., Kahn, J. E. & Lantos, P. L. 1989. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci*, 94, 79-100.
- Petersen, R. 1998. Clinical subtypes of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 9, 16-24.
- Petersen, R. 2004. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*, 256, 183-94.

- Petersen, R. C., Roberts, R. O., Knopman, D. S., Geda, Y. E., Cha, R. H., Pankratz, V. S., Boeve, B. F., Tangalos, E. G., Ivnik, R. J. & Rocca, W. A. 2010. Prevalence of mild cognitive impairment is higher in men. The Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology*, 75, 889-97.
- Petersen, R. C., Smith, G. E., Waring, S. C., Ivnik, R. J., Tangalos, E. G. & Kokmen, E. 1999. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol.*, 56, 303-8.
- Phukan, J., Elamin, M., Bede, P., Jordan, N., Gallagher, L., Byrne, S., Lynch, C., Pender, N. & Hardiman, O. 2012. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83, 102-8.
- Pinto, S. & De Carvalho, M. 2017. Health Status Perspectives in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis*, 17, 323-329.
- Poorkaj, P., Muma, N. A., Zhukareva, V., Cochran, E. J., Shannon, K. M., Hurtig, H., Koller, W. C., Bird, T. D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. & Schellenberg, G. D. 2002. An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol*, 52, 511-6.
- 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., Murray, M. E., Dickson, D. W. & Rademakers, R. 2015. Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta Neuropathol*, 130, 77-92.
- Raaphorst, J., Beeldman, E., De Visser, M., De Haan, R. J. & Schmand, B. 2012. A systematic review of behavioural changes in motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler*, 13, 493-501.
- Rademakers, R., Baker, M., Nicholson, A. M., Rutherford, N. J., Finch, N., Soto-Ortolaza, A., Lash, J., Wider, C., Wojtas, A., DeJesus-Hernandez, M., Adamson, J., Kouri, N., Sundal, C., Shuster, E. A., Aasly, J., Mackenzie, J., Roeber, S., Kretschmar, H. A., Boeve, B. F., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Cairns, N. J., Ghetti, B., Spina, S., Garbern, J., Tselis, A. C., Uitti, R., Das, P., van Gerpen, J. A., Meschia, J. F., Levy, S., Broderick, D. F., Graff-Radford, N., Ross, O. A., Miller, B. B., Swerdlow, R. H., Dickson, D. W. & Wszolek, Z. K. 2011. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat Genet*, 44, 200-5.
- Ramos, E. M., Dokuru, D. R., van Berlo, V., Wojta, K., Wang, Q., Huang, A. Y., Deverasetty, S., Qin, Y., van Blitterswijk, M., Jackson, J., Appleby, B., Bordelon, Y., Brannelly, P., Brushaber, D. E., Dickerson, B., Dickinson, S., Domoto-Reilly, K., Faber, K., Fields, J., Fong, J., Foroud, T., Forsberg, L. K., Gavriloiva, R., Ghoshal, N., Goldman, J., Graff-Radford, J., Graff-Radford, N., Grant, I., Grossman, M., Heuer, H. W., Hsiung, G. R., Huey, E., Irwin, D., Kantarci, K., Karydas, A., Kaufer, D., Kerwin, D., Knopman, D., Kornak, J., Kramer, J. H., Kremers, W., Kukull, W., Litvan, I., Ljubenkov, P., Lungu, C., Mackenzie, I., Mendez, M. F., Miller, B. L., Onyike, C., Pantelyat, A., Pearlman, R., Petrucelli, L., Potter, M., Rankin, K. P., Rascovsky, K., Roberson, E. D., Rogalski, E., Shaw, L., Syrjanen, J., Tartaglia, M. C., Tatton, N., Taylor, J., Toga, A., Trojanowski, J. Q., Weintraub, S., Wong, B., Wszolek, Z., Rademakers, R., Boeve, B. F., Rosen, H. J., Boxer, A. L., ARTFL/LEFFTDS Consortium, A. L. & Coppola, G. 2020. Genetic screening of a large series of North American sporadic and familial frontotemporal dementia cases. *Alzheimers Dement*, 16, 118-130.
- 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., Lee, A., Kipps, C. M., Lillo, P., Piguet, O., Rohrer, J. D., Rossor, M. N., Warren, J. D., Fox, N. C., Galasko, D., Salmon, D. P., Black, S. E., Mesulam, M., Weintraub, S., Dickerson, B. C., Diehl-Schmid, J., Pasquier, F., Deramecourt,

- V., Lebert, F., Pijnenburg, Y., Chow, T. W., Manes, F., Grafman, J., Cappa, S. F., Freedman, M., Grossman, M. & Miller, B. L. 2011. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain*, 134, 2456-77.
- Ratti, A., Corrado, L., Castellotti, B., Del Bo, R., Fogh, I., Cereda, C., Tiloca, C., D'Ascenzo, C., Bagarotti, A., Pensato, V., Ranieri, M., Gagliardi, S., Calini, D., Mazzini, L., Taroni, F., Corti, S., Ceroni, M., Oggioni, G. D., Lin, K., Powell, J. F., Soraru, G., Ticozzi, N., Comi, G. P., D'Alfonso, S., Gellera, C., Silani, V. & SLAGEN Consortium, S. 2012. C9ORF72 repeat expansion in a large Italian ALS cohort: evidence of a founder effect. *Neurobiol Aging*, 33, 2528 e7-14.
- Ravaglia, G., Forti, P., Montesi, F., Lucicesare, A., Pisacane, N., Rietti, E., Dalmonte, E., Bianchin, M. & Mecocci, P. 2008. Mild cognitive impairment: epidemiology and dementia risk in an elderly Italian population. *J Am Geriatr Soc*, 56, 51-8.
- Reddy, K., Zamiri, B., Stanley, S. Y., Macgregor, R. B., Jr. & Pearson, C. E. 2013. The disease-associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J Biol Chem*, 288, 9860-6.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, 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., Johnson, J. O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R. J., Orrell, R. W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I. E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J. B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M. A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V. M., Kaivorinne, A. L., Holtta-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chio, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M., ITALSGEN Consortium, Heckerman, D., Rogava, E., Zinman, L., Rothstein, J. D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E. E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S. D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N. M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H. R., Tienari, P. J. & Traynor, B. J. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72, 257-68.
- 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, 586-90.
- Roberts, R. O., Geda, Y. E., Knopman, D. S., Cha, R. H., Pankratz, V. S., Boeve, B. F., Tangalos, E. G., Ivnik, R. J., Rocca, W. A. & Petersen, R. C. 2012. The incidence of MCI differs by subtype and is higher in men: the Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology*, 78, 342-51.
- Roberts, R. O., Knopman, D. S., Mielke, M. M., Cha, R. H., Pankratz, V. S., Christianson, T. J., Geda, Y. E., Boeve, B. F., Ivnik, R. J., Tangalos, E. G., Rocca, W. A. & Petersen, R. C. 2014. Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal. *Neurology*, 82, 317-25.
- Rohrer, J. D., Paviour, D., Bronstein, A. M., O'Sullivan, S. S., Lees, A. & Warren, J. D. 2010. Progressive supranuclear palsy syndrome presenting as progressive nonfluent aphasia: a neuropsychological and neuroimaging analysis. *Mov Disord*, 25, 179-188.
- Rollinson, S., Bennion Callister, J., Young, K., Ryan, S. J., Drueh, R., Rohrer, J. D., Snowden, J., Richardson, A., Jones, M., Harris, J., Davidson, Y., Robinson, A., Ealing, J., Johnson, J. O., Traynor, B., Mead, S., Mann, D. & Pickering-Brown, S. M. 2015. Small deletion in C9orf72 hides a proportion of expansion carriers in FTL. *Neurobiol Aging*, 36, 1601 e1-5.
- Rollinson, S., Halliwell, N., Young, K., Callister, J. B., Toulson, G., Gibbons, L., Davidson, Y. S., Robinson, A. C., Gerhard, A., Richardson, A., Neary, D., Snowden, J. & Mann, D. M., & Pickering-Brown, S. M. 2012. Analysis of the hexanucleotide repeat in C9ORF72 in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 33, 1846.e5-6.
- Ros, R., Thobois, S., Streichenberger, N., Kopp, N., Sánchez, M. P., Pérez, M., Hoenicka, J., Avila, J., Honnorat, J. & De Yébenes, J. G. 2005. A new mutation of the tau gene, G303V, in early-onset familial progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol*, 62, 1444-50.

- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J. O'Regan, J. P., Deng, H. X., et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59–62.
- Ross, O. A., Whittle, A. J., Cobb, S. A., Hulihan, M. M., Lincoln, S. J., Toft, M., Farrer, M. J. & Dickson, D. W. 2006. Lrrk2 R1441 substitution and progressive supranuclear palsy. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 32, 23-5.
- Rossi, G., Gasparoli, E., Pasquali, C., Di Fede, G., Testa, D., Albanese, A., Bracco, F. & Tagliavini, F. 2004. Progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease in a family with a new mutation in the tau gene. *Ann Neurol*, 55, 448.
- Rubino, E., Rainero, I., Chiò, A., Rogaeva, E., Galimberti, D., Fenoglio, P., Grinberg, Y., Isaia, G., Calvo, A., Gentile, S., Bruni, A. C., St George-Hyslop, P. H., Scarpini, E., Gallone, S. Pinessi, & TODEM Study Group 2012. SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 79, 1556-62.
- Russ, J., Liu, E. Y., Wu, K., Neal, D., Suh, E., Irwin, D. J., McMillan, C. T., Harms, M. B., Cairns, N. J., Wood, E. M., Xie, S. X., Elman, L., McCluskey, L., Grossman, M., van Deerlin, V. M. & Lee, E. B. 2015. Hypermethylation of repeat expanded C9orf72 is a clinical and molecular disease modifier. *Acta Neuropathol*, 129, 39-52.
- Rutherford, N. J., Dejesus-Hernandez, M., Baker, M. C., Kryston, T. B., Brown, P. E., Lomen-Hoerth, C., Boylan, K. Wszolek, Z. K., & Rademakers, R. 2012a. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions in patients with ALS from the Coriell Cell Repository. *Neurology*, 79, 482–483.
- Rutherford, N. J., Heckman, M. G., Dejesus-Hernandez, M., Baker, M. C., Soto-Ortolaza, A. I., Rayaprolu, S., Stewart, H., Finger, E., Volkening, K., Seeley, W. W., Hatanpaa, K. J., Lomen-Hoerth, C., Kertesz, A., Bigio, E. H., Lippa, C., Knopman, D. S., Kretschmar, H. A., Neumann, M., Caselli, R. J., White, C. L., 3rd, Mackenzie, I. R., Petersen, R. C., Strong, M. J., Miller, B. L., Boeve, B. F., Uitti, R. J., Boylan, K. B., Wszolek, Z. K., Graff-Radford, N. R., Dickson, D. W., Ross, O. A. & Rademakers, R. 2012b. Length of normal alleles of C9ORF72 GGGGCC repeat do not influence disease phenotype. *Neurobiol Aging*, 33, 2950 e5-7.
- Ryan, M., Heverin, M., Doherty, M. A., Davis, N., Corr, E. M., Vajda, A., Pender, N., McLaughlin, R. & Hardiman, O. 2018. Determining the incidence of familiarity in ALS: A study of temporal trends in Ireland from 1994 to 2016. *Neurol Genet*, 4, e239.
- Sailer, A., Scholz, S., Nalls, M., Schulte, C., Federoff, M., Price, T., Lees, A., Ross, O., Dickson, D., Mok, K., Mencacci, N., Schottlaender, L., Chelban, V., Ling, H., O'Sullivan, S., Wood, N., Traynor, B., Ferrucci, L., Federoff, H., Mhyre, T., Morris, H., Deuschl, G., Quinn, N., Widner, H., Albanese, A., Infante, J., Bhatia, K., Poewe, W., Oertel, W., Höglinger, G., Wüllner, U., Goldwurm, S., Pellecchia, M., Ferreira, J., Tolosa, E., Bloem, B., Rascol, O., Meissner, W., Hardy, J., Revesz, T., Holton, J., Gasser, T., Wenning, G., Singleton, A., Houlden, H. & European Multiple System Atrophy Study Group and the UK Multiple System Atrophy Study Group. 2016. A genome-wide association study in multiple system atrophy. *Neurology*, 87, 1591-1598.
- Sanchez-Contreras, M. Y., Kouri, N., Cook, C. N., Serie, D. J., Heckman, M. G., Finch, N. A., Caselli, R. J., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Graff-Radford, N., Petrucelli, L., Wang, L. S., Schellenberg, G. D., Dickson, D. W., Rademakers, R. & Ross, O. A. 2018. Replication of progressive supranuclear palsy genome-wide association study identifies SLCO1A2 and DUSP10 as new susceptibility loci. *Mol Neurodegener*, 13, 37.
- Sanders, P., Ewing, I. & Ahmad, K. 2016. C9orf72 expansion presenting as an eating disorder. *J Clin Neurosci*, 25, 157-9.
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-Maclachlan, D. R., Alberts, M. J. & et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, 1467-72.

- Scholz, S. W., Houlden, H., Schulte, C., Sharma, M., Li, A., Berg, D., Melchers, A., Paudel, R., Gibbs, J. R., Simon-Sanchez, J., Paisan-Ruiz, C., Bras, J., Ding, J., Chen, H., Traynor, B. J., Arepalli, S., Zonozi, R. R., Revesz, T., Holton, J., Wood, N., Lees, A., Oertel, W., Wullner, U., Goldwurm, S., Pellecchia, M. T., Illig, T., Riess, O., Fernandez, H. H., Rodriguez, R. L., Okun, M. S., Poewe, W., Wenning, G. K., Hardy, J. A., Singleton, A. B., Del Sorbo, F., Schneider, S., Bhatia, K. P. & Gasser, T. 2009. SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *Ann Neurol*, 65, 610-4.
- Scholz, S. W., Majounie, E., Revesz, T., Holton, J. L., Okun, M. S., Houlden, H. & Singleton, A. B. 2015. Multiple system atrophy is not caused by C9orf72 hexanucleotide repeat expansions. *Neurobiol Aging*, 36, 1223 e1-2.
- Schottlaender, L. V. & Houlden, H. 2014. Multiple-System Atrophy (MSA) Brain Bank Collaboration. Mutant COQ2 in Multiple-System Atrophy. *New England Journal of Medicine*, 371, 80-83.
- Schottlaender, L. V., Polke, J. M., Ling, H., Macdoanld, N. D., Tucci, A., Nanji, T., Pittman, A., De Silva, R., Holton, J. L., Revesz, T., Sweeney, M. G., Singleton, A. B., Lees, A. J., Bhatia, K. P. & Houlden, H. 2015. Analysis of C9orf72 repeat expansions in a large series of clinically and pathologically diagnosed cases with atypical parkinsonism. *Neurobiol Aging*, 36, 1221 e1-6.
- Schrag, A., Ben-Shlomo, Y. & Quinn, N. P. 1999. Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *The Lancet*, 354, 1771-1775.
- Sebastià, J., Kieran, D., Breen, B., King, M. A., Netteland, D. F., Joyce, D., Fitzpatrick, S. F. Taylor, C. T., & Prehn, J. H. 2009. Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell death and differentiation*, 16, 1238–1247.
- Seelaar, H., Schelhaas, H. J., Azmani, A., Kusters, B., Rosso, S., Majoor-Krakauer, D., De Rijk, M. C., Rizzu, P., Ten Brummelhuis, M., van Doorn, P. A., Kamphorst, W., Willemsen, R. & van Swieten, J. C. 2007. TDP-43 pathology in familial frontotemporal dementia and motor neuron disease without Progranulin mutations. *Brain*, 130, 1375-85.
- Serpente, M., Fenoglio, C., Arighi, A., Fumagalli, G. G., Arcaro, M., Sorrentino, F., Visconte, C., Scarpini, E. & Galimberti, D. 2021. Analysis of C9orf72 Intermediate Alleles in a Retrospective Cohort of Neurological Patients: Risk Factors for Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis*, 81, 1445-1451.
- Sha, S. J., Takada, L. T., Rankin, K. P., Yokoyama, J. S., Rutherford, N. J., Fong, J. C., Khan, B., Karydas, A., Baker, M. C., DeJesus-Hernandez, M., Pribadi, M., Coppola, G., Geschwind, D. H., Rademakers, R., Lee, S. E., Seeley, W. Miller, B. L., & Boxer, A. L. 2012. Frontotemporal dementia due to C9ORF72 mutations: clinical and imaging features. *Neurology*, 79, 1002–1011.
- Shatunov, A., Mok, K., Newhouse, S., Weale, M. E., Smith, B., Vance, C., Johnson, L., Veldink, J. H., van Es, M. A., van den Berg, L. H., Robberecht, W., van Damme, P., Hardiman, O., Farmer, A. E., Lewis, C. M., Butler, A. W., Abel, O., Andersen, P. M., Fogh, I., Silani, V., Chiò, A., Traynor, B. J., Melki, J., Meininger, V., Landers, J. E., McGuffin, P., Glass, J. D., Pall, H., Leigh, P. N., Hardy, J., Brown, R. H., Powell, J. F., Orrell, R. W., Morrison, K. E., Shaw, P. J., Shaw, C. E. & Al-Chalabi, A. 2010. Chromosome 9p21 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the UK and seven other countries: a genome-wide association study. *The Lancet Neurology*, 9, 986-994.
- Shu, L., Sun, Q., Zhang, Y., Xu, Q., Guo, J., Yan, X. & Tang, B. 2016. The Association between C9orf72 Repeats and Risk of Alzheimer's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *Parkinsons Dis*, 2016, 5731734.
- Simon-Sanchez, J., Dopper, E. G., Cohn-Hokke, P. E., Hukema, R. K., Nicolaou, N., Seelaar, H., De Graaf, J. R., De Koning, I., van Schoor, N. M., Deeg, D. J., Smits, M., Raaphorst, J., van den Berg, L. H., Schelhaas, H. J., De Die-Smulders, C. E., Majoor-Krakauer, D., Rozemuller, A. J., Willemsen, R., Pijnenburg, Y. A., Heutink, P. & van Swieten, J. C. 2012.

- The clinical and pathological phenotype of C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions. *Brain*, 135, 723-35.
- Singh, B., Mielke, M. M., Parsaik, A. K., Cha, R. H., Roberts, R. O., Scanlon, P. D., Geda, Y. E., Christianson, T. J., Pankratz, V. S. & Petersen, R. C. 2014. A prospective study of chronic obstructive pulmonary disease and the risk for mild cognitive impairment. *JAMA Neurol*, 71, 581-8.
- Sivadasan, R., Hornburg, D., Drepper, C., Frank, N., Jablonka, S., Hansel, A., Lojewski, X., Sternecker, J., Hermann, A., Shaw, P. J., Ince, P. G., Mann, M., Meissner, F. & Sendtner, M. 2016. C9ORF72 interaction with cofilin modulates actin dynamics in motor neurons. *Nat Neurosci*, 19, 1610-1618.
- 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., Sorensen, S. A., Gydesen, S., Fisher, E. M. & Collinge, J. 2005. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*, 37, 806-8.
- Smith, B. N., Newhouse, S., Shatunov, A., Vance, C., Topp, S., Johnson, L., Miller, J., Lee, Y., Troakes, C., Scott, K. M., Jones, A., Gray, I., Wright, J., Hortobagyi, T., Al-Sarraj, S., Rogelj, B., Powell, J., Lupton, M., Lovestone, S., Sapp, P. C., Weber, M., Nestor, P. J., Schelhaas, H. J., Asbroek, A. A., Silani, V., Gellera, C., Taroni, F., Ticozzi, N., van den Berg, L., Veldink, J., van Damme, P., Robberecht, W., Shaw, P. J., Kirby, J., Pall, H., Morrison, K. E., Morris, A., De Belleruche, J., Vianney De Jong, J. M., Baas, F., Andersen, P. M., Landers, J., Brown, R. H., Jr., Weale, M. E., Al-Chalabi, A. & Shaw, C. E. 2013. The C9ORF72 expansion mutation is a common cause of ALS+/-FTD in Europe and has a single founder. *Eur J Hum Genet*, 21, 102-8.
- Smits, L. L., Pijnenburg, Y. A., van der Vlies, A. E., Koedam, E. L., Bouwman, F. H., Reuling, I. E., Scheltens, P. & van der Flier, W. M. 2015. Early onset APOE E4-negative Alzheimer's disease patients show faster cognitive decline on non-memory domains. *Eur Neuropsychopharmacol*, 25, 1010-7.
- Snowden, J. S., Neary, D. & Mann, D. M. 2002. Frontotemporal dementia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 180.
- Snowden, J. S., Rollinson, S., Lafon, C., Harris, J., Thompson, J., Richardson, A. M., Jones, M., Gerhard, A., Neary, D., Mann, D. M. & Pickering-Brown, S. 2012a. Psychosis, C9ORF72 and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83, 1031-2.
- 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. 2012b. Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with C9ORF72 mutations. *Brain*, 135, 693-708.
- Spanaki, C., Latsoudis, H. & Plaitakis, A. 2006. LRRK2 mutations on Crete: R1441H associated with PD evolving to PSP. *Neurology*, 67, 1518-9.
- Spillantini, M., Bird, T. & Ghetti, B. 1998a. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol*, 8, 387-402.
- Spillantini, M. & Goedert, M. 1998. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 21, 428-33.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Cairns, N. J., Lantos, P. L. & Goedert, M. 1998b. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 251, 205-8.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R. & Goedert, M. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-40.
- Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Baralle, F., De Belleruche, J., Mitchell, J. D., Leigh, P. N.,

- Al-Chalabi, A., Miller, C. C., Nicholson, G. & Shaw, C. E. 2008. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, 319, 1668-1672.
- Stanford, P. M., Halliday, G. M., Brooks, W. S., Kwok, J. B., Storey, C. E., Creasey, H., Morris, J. G., Fulham, M. J. & Schofield, P. R. 2000. Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations. *Brain*, 123, 880-93.
- Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S. T., Abeyasinghe, S., Krawczak, M. & Cooper, D. N. 2003. Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update. *Human Mutation*, 21, 577-581.
- Stevic, Z., Kostic-Dedic, S., Peric, S., Dedic, V., Basta, I., Rakocevic-Stojanovic, V. & Lavrnic, D. 2016. Prognostic factors and survival of ALS patients from Belgrade, Serbia. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 17, 508-514.
- Stewart, H., Rutherford, N. J., Briemberg, H., Krieger, C., Cashman, N., Fabros, M., Baker, M., Fok, A., DeJesus-Hernandez, M., Eisen, A., Rademakers, R. & Mackenzie, I. R. 2012. Clinical and pathological features of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutation in the C9ORF72 gene on chromosome 9p. *Acta Neuropathol*, 123, 409-17.
- Strong, M. J., Abrahams, S., Goldstein, L. H., Woolley, S., McLaughlin, P., Snowden, J., Mioshi, E., Roberts-South, A., Benatar, M., Hortobagyi, T., Rosenfeld, J., Silani, V., Ince, P. G. & Turner, M. R. 2017. Amyotrophic lateral sclerosis - frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 18, 153-174.
- Suh, E., Lee, E. B., Neal, D., Wood, E. M., Toledo, J. B., Rennert, L., Irwin, D. J., McMillan, C. T., Krock, B., Elman, L. B., McCluskey, L. F., Grossman, M., Xie, S. X., Trojanowski, J. Q. & van Deerlin, V. M. 2015. Semi-automated quantification of C9orf72 expansion size reveals inverse correlation between hexanucleotide repeat number and disease duration in frontotemporal degeneration. *Acta Neuropathol*, 130, 363-72.
- Sun, Z., Jiang, H., Jiao, B., Hou, X., Shen, L., Xia, K. & Tang, B. 2015. C9orf72 hexanucleotide expansion analysis in Chinese patients with multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord*, 21, 811-2.
- Suzuki, N., Aoki, M., Warita, H., Kato, M., Mizuno, H., Shimakura, N., Akiyama, T., Furuya, H., Hokonohara, T., Iwaki, A., Togashi, S., Konno, H. & Itoyama, Y. 2010. FALS with FUS mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. *Journal of Human Genetics*, 55, 252-254.
- Swinnen, B., Bento-Abreu, A., Gendron, T. F., Boeynaems, S., Bogaert, E., Nuyts, R., Timmers, M., Scheveneels, W., Hersmus, N., Wang, J., Mizielińska, S., Isaacs, A. M., Petrucelli, L., Lemmens, R., van Damme, P., van den Bosch, L. & Robberecht, W. 2018. A zebrafish model for C9orf72 ALS reveals RNA toxicity as a pathogenic mechanism. *Acta Neuropathol*, 135, 427-443.
- Talbott, E. O., Malek, A. M. & Lacomis, D. 2016. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Handb Clin Neurol*, 138, 225-38.
- Taylor, J. P., Brown, R. H., Jr. & Cleveland, D. W. 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*, 539, 197-206.
- Tazelaar, G. H. P., Boeynaems, S., De Decker, M., van Vugt, J., Kool, L., Goedee, H. S., McLaughlin, R. L., Sproviero, W., Iacoangeli, A., Moisse, M., Jacquemyn, M., Daelemans, D., Dekker, A. M., van der Spek, R. A., Westeneng, H. J., Kenna, K. P., Assialioui, A., Da Silva, N., Project MinE ALS Sequencing Consortium, Povedano, M., Pardina, J. S. M., Hardiman, O., Salachas, F., Millecamps, S., Vourc'h, P., Corcia, P., Couratier, P., Morrison, K. E., Shaw, P. J., Shaw, C. E., Pasterkamp, R. J., Landers, J. E., van den Bosch, L., Robberecht, W., Al-Chalabi, A., van den Berg, L. H., van Damme, P., Veldink, J. H. & van Es, M. A. 2020. ATXN1 repeat expansions confer risk for amyotrophic lateral sclerosis and contribute to TDP-43 mislocalization. *Brain Commun*, 2, fcaa064.

- Testa, D., Lovati, R., Ferrarini, M., Salmoiraghi, F. & Filippini, G. 2004. Survival of 793 patients with amyotrophic lateral sclerosis diagnosed over a 28-year period. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 5, 208-12.
- Therrien, M., Rouleau, G. A., Dion, P. A. & Parker, J. A. 2013. Deletion of C9ORF72 results in motor neuron degeneration and stress sensitivity in *C. elegans*. *PLoS One*, 8, e83450.
- Theuns, J., Verstraeten, A., Sleegers, K., Wauters, E., Gijselinck, I., Smolders, S., Crosiers, D., Corsmit, E., Elinck, E., Sharma, M., Krüger, R., Lesage, S., Brice, A., Chung, S., Kim, M., Kim, Y., Ross, O., Wszolek, Z., Rogaeva, E., Xi, Z., Lang, A., Klein, C., Weissbach, A., Mellick, G., Silburn, P., Hadjigeorgiou, G., Dardiotis, E., Hattori, N., Ogaki, K., Tan, E., Y., Z., Aasly, J., Valente, E., Petrucci, S., Annesi, G., Quattrone, A., Ferrarese C, Brighina, L., Deutschländer, A., Puschmann, A., Nilsson, C., Garraux, G., Ledoux, M., Pfeiffer, R., Boczarska-Jedynak, M., Opala, G., Maraganore D.,M., Engelborghs, S., De Deyn, P., Cras, P., Cruts, M., van Broeckhoven, C. & GEO-PD Consortium. 2014. Global investigation and meta-analysis of the C9orf72 (G4C2)_n repeat in Parkinson disease. *Neurology*, 83, 1906-13.
- Ticozzi, N., Tiloca, C., Calini, D., Gagliardi, S., Altieri, A., Colombrita, C., Cereda, C., Ratti, A., Pezzoli, G., Borroni, B., Goldwurm, S., Padovani, A. & Silani, V. 2014. C9orf72 repeat expansions are restricted to the ALS-FTD spectrum. *Neurobiol Aging*, 35, 936 e13-7.
- Tison, F., Yekhelef, F., Chrysostome, V. & Sourgen, C. 2000. Prevalence of multiple system atrophy. *The Lancet*, 355, 495-496.
- Turgut, N., Varol Saracoglu, G., Kat, S., Balci, K., GÜldiken, B., Birgili, O. & Kabayel, L. 2019. An epidemiologic investigation of amyotrophic lateral sclerosis in Thrace, Turkey, 2006-2010. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 20, 100-106.
- Umoh, M. E., Fournier, C., Li, Y., Polak, M., Shaw, L., Landers, J. E., Hu, W. Gearing, M., & Glass, J. D. 2016. Comparative analysis of C9orf72 and sporadic disease in an ALS clinic population. *Neurology*, 87, 1024-30.
- Ungaro, C., Sprovieri, T., Morello, G., Perrone, B., Spampinato, A. G., Simone, I. L., Trojsi, F., Monsurro, M. R., Spataro, R., La Bella, V., Ando, S., Cavallaro, S. & Conforti, F. L. 2021. Genetic investigation of amyotrophic lateral sclerosis patients in south Italy: a two-decade analysis. *Neurobiol Aging*, 99, 99 e7-99 e14.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40, e115.
- Valdmanis, P. N., Dupre, N., Bouchard, J. P., Camu, W., Salachas, F., Meininger, V., Strong, M. & Rouleau, G. A. 2007. Three families with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia with evidence of linkage to chromosome 9p. *Arch Neurol.*, 64, 240-5.
- van Blitterswijk, M., Dejesus-Hernandez, M., Niemantsverdriet, E., Murray, M. E., Heckman, M. G., Diehl, N. N., Brown, P. H., Baker, M. C., Finch, N. A., Bauer, P. O., Serrano, G., Beach, T. G., Josephs, K. A., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Boeve, B. F., Graff-Radford, N. R., Boylan, K. B., Petrucelli, L., Dickson, D. W. & Rademakers, R. 2013. Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. *The Lancet Neurology*, 12, 978-988.
- van Blitterswijk, M., Mullen, B., Heckman, M. G., Baker, M. C., Dejesus-Hernandez, M., Brown, P. H., Murray, M. E., Hsiung, G. Y., Stewart, H., Karydas, A. M., Finger, E., Kertesz, A., Bigio, E. H., Weintraub, S., Mesulam, M., Hatanpaa, K. J., White, C. L., 3rd, Neumann, M., Strong, M. J., Beach, T. G., Wszolek, Z. K., Lippa, C., Caselli, R., Petrucelli, L., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Mackenzie, I. R., Seeley, W. W., Grinberg, L. T., Miller, B. L., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., Boeve, B. F., Dickson, D. W. & Rademakers, R. 2014a. Ataxin-2 as potential disease modifier in C9ORF72 expansion carriers. *Neurobiol Aging*, 35, 2421 e13-7.
- van Blitterswijk, M., Mullen, B., Nicholson, A. M., Bieniek, K. F., Heckman, M. G., Baker, M. C., Dejesus-Hernandez, M., Finch, N. A., Brown, P. H., Murray, M. E., Hsiung, G. Y., Stewart, H., Karydas, A. M., Finger, E., Kertesz, A., Bigio, E. H., Weintraub, S., Mesulam, M.,

- Hatanpaa, K. J., White, C. L., 3rd, Strong, M. J., Beach, T. G., Wszolek, Z. K., Lipka, C., Caselli, R., Petrucelli, L., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Mackenzie, I. R., Seeley, W. W., Grinberg, L. T., Miller, B. L., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., Boeve, B. F., Dickson, D. W. & Rademakers, R. 2014b. TMEM106B protects C9ORF72 expansion carriers against frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*, 127, 397-406.
- van Blitterswijk, M., Mullen, B., Wojtas, A., Heckman, M. G., Diehl, N. N., Baker, M. C., DeJesus-Hernandez, M., Brown, P. H., Murray, M. E., Hsiung, G. Y., Stewart, H., Karydas, A. M., Finger, E., Kertesz, A., Bigio, E. H., Weintraub, S., Mesulam, M., Hatanpaa, K. J., White, C. L. R., Neumann, M., Strong, M. J., Beach, T. G., Wszolek, Z. K., Lipka, C., Caselli, R., Petrucelli, L., Josephs, K. A., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Mackenzie, I. R., Seeley, W. W., Grinberg, L. T., Miller, B. L., Boylan, K. B., Graff-Radford, N. R., Boeve, B. F., Dickson, D. W. & Rademakers, R. 2014c. Genetic modifiers in carriers of repeat expansions in the C9ORF72 gene. *Mol Neurodegener.*, 9.
- van Blitterswijk, M., van Es, M. A., Hennekam, E. A. M., Dooijes, D., van Rheenen, W., Medic, J., Bourque, P. R., Schelhaas, H. J., van der Kooij, A. J., De Visser, M., De Bakker, P. I. W., Veldink, J. H. & van den Berg, L. H. 2012. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 21, 3776-3784.
- Van Deerlin, V. M., Sleiman, P. M., Martinez-Lage, M., Chen-Plotkin, A., Wang, L. S., Graff-Radford, N. R., Dickson, D. W., Rademakers, R., Boeve, B. F., Grossman, M., Arnold, S. E., Mann, D. M., Pickering-Brown, S. M., Seelaar, H., Heutink, P., van Swieten, J. C., Murrell, J. R., Ghetti, B., Spina, S., Grafman, J., Hodges, J., Spillantini, M. G., Gilman, S., Lieberman, A. P., Kaye, J. A., Woltjer, R. L., Bigio, E. H., Mesulam, M., Al-Sarraj, S., Troakes, C., Rosenberg, R. N., White, C. L., 3rd, Ferrer, I., Llado, A., Neumann, M., Kretschmar, H. A., Hulette, C. M., Welsh-Bohmer, K. A., Miller, B. L., Alzualde, A., Lopez De Munain, A., McKee, A. C., Gearing, M., Levey, A. I., Lah, J. J., Hardy, J., Rohrer, J. D., Lashley, T., Mackenzie, I. R., Feldman, H. H., Hamilton, R. L., Dekosky, S. T., van der Zee, J., Kumar-Singh, S., van Broeckhoven, C., Mayeux, R., Vonsattel, J. P., Troncoso, J. C., Kril, J. J., Kwok, J. B., Halliday, G. M., Bird, T. D., Ince, P. G., Shaw, P. J., Cairns, N. J., Morris, J. C., McLean, C. A., Decarli, C., Ellis, W. G., Freeman, S. H., Frosch, M. P., Growdon, J. H., Perl, D. P., Sano, M., Bennett, D. A., Schneider, J. A., Beach, T. G., Reiman, E. M., Woodruff, B. K., Cummings, J., Vinters, H. V., Miller, C. A., Chui, H. C., Alafuzoff, I., Hartikainen, P., Seilhean, D., Galasko, D., Masliah, E., Cotman, C. W., Tunon, M. T., Martinez, M. C., Munoz, D. G., Carroll, S. L., Marson, D., Riederer, P. F., Bogdanovic, N., Schellenberg, G. D., Hakonarson, H., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. 2010. Common variants at 7p21 are associated with frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions. *Nat Genet*, 42, 234-9.
- van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., van Langenhove, T., Theuns, J., Engelborghs, S., Philtjens, S., Vandenbulcke, M., Slegers, K., Sieben, A., Baumer, V., Maes, G., Corsmit, E., Borroni, B., Padovani, A., Archetti, S., Pernecky, R., Diehl-Schmid, J., De Mendonca, A., Miltenberger-Miltenyi, G., Pereira, S., Pimentel, J., Nacmias, B., Bagnoli, S., Sorbi, S., Graff, C., Chiang, H. H., Westerlund, M., Sanchez-Valle, R., Llado, A., Gelpi, E., Santana, I., Almeida, M. R., Santiago, B., Frisoni, G., Zanetti, O., Bonvicini, C., Synofzik, M., Maetzler, W., vom Hagen, J. M., Schols, L., Heneka, M. T., Jessen, F., Matej, R., Parobkova, E., Kovacs, G. G., Strobel, T., Sarafov, S., Tournev, I., Jordanova, A., Danek, A., Arzberger, T., Fabrizi, G. M., Testi, S., Salmon, E., Santens, P., Martin, J. J., Cras, P., VandenberghE, R., De Deyn, P. P., Cruts, M., van Broeckhoven, C., van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., van Langenhove, T., Theuns, J., Philtjens, S., Slegers, K., Baumer, V., Maes, G., Corsmit, E., Cruts, M., van Broeckhoven, C., van der Zee, J., Gijssels, I., Dillen, L., van Langenhove, T., Philtjens, S., Theuns, J., Slegers, K., Baumer, V., Maes, G., Cruts, M., van Broeckhoven, C., Engelborghs, S., De Deyn, P. P., Cras, P., Engelborghs, S., De Deyn, P. P., Vandenbulcke, M., Vandenbulcke, M., Borroni,

- B., Padovani, A., Archetti, S., Pernecky, R., Diehl-Schmid, J., Synofzik, M., Maetzler, W., Muller Vom Hagen, J., et al. 2013. A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTLT: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Hum Mutat*, 34, 363-73.
- van der Zee, J., Pirici, D., van Langenhove, T., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Hoffmann, M., Pusswald, G., van den Broeck, M., Peeters, K., Mattheijssens, M., Martin, J. J., De Deyn, P. P., Cruts, M., Haubenberger, D., Kumar-Singh, S., Zimprich, A. & van Broeckhoven, C. 2009. Clinical heterogeneity in 3 unrelated families linked to VCP p.Arg159His. *Neurology*, 73, 626-32.
- van Es, M. A., Diekstra, F. P., Veldink, J. H., Baas, F., Bourque, P. R., Schelhaas, H. J., Strengman, E., Hennekam, E. A., Lindhout, D. & Ophoff, R. A., & van den Berg, L. H. 2009a. A case of ALS-FTD in a large FALS pedigree with a K17I ANG mutation. *Neurology*, 72, 287-288.
- van Es, M. A., Veldink, J. H., Saris, C. G., Blauw, H. M., van Vught, P. W., Birve, A., Lemmens, R., Schelhaas, H. J., Groen, E. J., Huisman, M. H., van der Kooi, A. J., De Visser, M., Dahlberg, C., Estrada, K., Rivadeneira, F., Hofman, A., Zwarts, M. J., van Doormaal, P. T., Rujescu, D., Strengman, E., Giegling, I., Muglia, P., Tomik, B., Slowik, A., Uitterlinden, A. G., Hendrich, C., Waibel, S., Meyer, T., Ludolph, A. C., Glass, J. D., Purcell, S., Cichon, S., Nothen, M. M., Wichmann, H. E., Schreiber, S., Vermeulen, S. H., Kiemeny, L. A., Wokke, J. H., Cronin, S., McLaughlin, R. L., Hardiman, O., Fumoto, K., Pasterkamp, R. J., Meininger, V., Melki, J., Leigh, P. N., Shaw, C. E., Landers, J. E., Al-Chalabi, A., Brown, R. H., Jr., Robberecht, W., Andersen, P. M., Ophoff, R. A. & van den Berg, L. H. 2009b. Genome-wide association study identifies 19p13.3 (UNC13A) and 9p21.2 as susceptibility loci for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 41, 1083-7.
- Van Langenhove, T., van der Zee, J., Gijssels, I., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., Vandenbulcke, M., De Bleecker, J., Sieben, A., Versijpt, J., Ivanoiu, A., Deryck, O., Willems, C., Dillen, L., Philtjens, S., Maes, G., Baumer, V., van den Broeck, M., Mattheijssens, M., Peeters, K., Martin, J. J., Michotte, A., Santens, P., De Jonghe, P., Cras, P., De Deyn, P. P., Cruts, M. & van Broeckhoven, C. 2013. Distinct clinical characteristics of C9orf72 expansion carriers compared with GRN, MAPT, and nonmutation carriers in a Flanders-Belgian FTLT cohort. *JAMA Neurol*, 70, 365-73.
- Van Mossevelde, S., van der Zee, J., Cruts, M. & van Broeckhoven, C. 2017a. Relationship between C9orf72 repeat size and clinical phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, 44, 117-124.
- Van Mossevelde, S., van der Zee, J., Gijssels, I., Slegers, K., De Bleecker, J., Sieben, A., Vandenberghe, R., van Langenhove, T., Baets, J., Deryck, O., Santens, P., Ivanoiu, A., Willems, C., Baumer, V., van den Broeck, M., Peeters, K., Mattheijssens, M., De Jonghe, P., Cras, P., Martin, J. J., Cruts, M., De Deyn, P. P., Engelborghs, S., van Broeckhoven, C. & Belgian Neurology Consortium. 2017b. Clinical Evidence of Disease Anticipation in Families Segregating a C9orf72 Repeat Expansion. *JAMA Neurol*, 74, 445-452.
- van Rheenen, W., van Blitterswijk, M., Huisman, M. H., Vlam, L., van Doormaal, P. T., Seelen, M., Medic, J., Dooijes, D., De Visser, M., van der Kooi, A. J., Raaphorst, J., Schelhaas, H. J., van der Pol, W. L. & Veldink, J. H., & van den Berg, L. H. 2012. Hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 in the spectrum of motor neuron diseases. *Neurology*, 79, 878-882.
- Vance, C., Al-Chalabi, A., Ruddy, D., Smith, B. N., Hu, X., Sreedharan, J., Siddique, T., Schelhaas, H. J., Kusters, B., Troost, D., Baas, F., De Jong, V. & Shaw, C. E. 2006. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain*, 129, 868-76.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., De Belleruche, J., Gallo, J. M., Miller, C. C. & Shaw, C. E. 2009. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, 323, 1208-1211.

- Verghese, J., Levalley, A., Derby, C., Kuslansky, G., Katz, M., Hall, C., Buschke, H. & Lipton, R. B. 2006. Leisure activities and the risk of amnesic mild cognitive impairment in the elderly. *Neurology*, 66, 821-7.
- Waite, A. J., Baumer, D., East, S., Neal, J., Morris, H. R., Ansorge, O. & Blake, D. J. 2014. Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurobiol Aging*, 35, 1779 e5-1779 e13.
- Walker, R. H., Gatto, E. M., Bustamante, M. L., Bernal-Pacheco, O., Cardoso, F., Castilhos, R. M., Chana-Cuevas, P., Cornejo-Olivas, M., Estrada-Bellmann, I., Jardim, L. B., Lopez-Castellanos, R., Lopez-Contreras, R., Maia, D. P., Mazzetti, P., Miranda, M., Rodriguez-Violante, M., Teive, H. & Tumas, V. 2018. Huntington's disease-like disorders in Latin America and the Caribbean. *Parkinsonism Relat Disord*, 53, 10-20.
- Ward, A., Arrighi, H. M., Michels, S. & Cedarbaum, J. M. 2012. Mild cognitive impairment: disparity of incidence and prevalence estimates. *Alzheimers Dement*, 8, 14-21.
- Warner, J. P., Barron, L. H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D. R. & Brock, D. J. 1996. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*, 33, 1022-6.
- 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. *Nat Genet*, 36, 377-81.
- Wen, X., Tan, W., Westergard, T., Krishnamurthy, K., Markandaiah, S. S., Shi, Y., Lin, S., Shneider, N. A., Monaghan, J., Pandey, U. B., Pasinelli, P., Ichida, J. K. & Trotti, D. 2014. Antisense proline-arginine RAN dipeptides linked to C9ORF72-ALS/FTD form toxic nuclear aggregates that initiate in vitro and in vivo neuronal death. *Neuron*, 84, 1213-25.
- Wenning, G. K., Geser, F., Stampfer-Kountchev, M. & Tison, F. 2003. Multiple System Atrophy: An Update. *Movement Disorders*, 18, S34-S42.
- Wijesekera, L. C. & Leigh, P. N. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 3.
- Wild, E. J., Mudanohwo, E. E., Sweeney, M. G., Schneider, S. A., Beck, J., Bhatia, K. P., Rossor, M. N., Davis, M. B. & Tabrizi, S. J. 2008. Huntington's disease phenocopies are clinically and genetically heterogeneous. *Mov Disord*, 23, 716-20.
- Wild, E. J. & Tabrizi, S. J. 2007. Huntington's disease phenocopy syndromes. *Curr Opin Neurol*, 20, 681-7.
- Wilke, C., Pomper, J. K., Biskup, S., Puskas, C., Berg, D. & Synofzik, M. 2016. Atypical parkinsonism in C9orf72 expansions: a case report and systematic review of 45 cases from the literature. *J Neurol*, 263, 558-74.
- Williams, D. R., De Silva, R., Paviour, D. C., Pittman, A., Watt, H. C., Kilford, L., Holton, J. L., Revesz, T. & Lees, A. J. 2005. Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism. *Brain*, 128, 1247-58.
- Wojtas, A., Heggeli, K. A., Finch, N., Baker, M., Dejesus-Hernandez, M., Younkin, S. G., Dickson, D. W. & Graff-Radford, N. R., & Rademakers, R 2012. C9ORF72 repeat expansions and other FTD gene mutations in a clinical AD patient series from Mayo Clinic. *American journal of neurodegenerative disease*, 1, 107-118.
- Wu, D., Yu, W., Kishikawa, H., Folkerth, R. D., Iafrate, A. J., Shen, Y., Xin, W., Sims, K. & Hu, G.-F. 2007. Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 62, 609-617.
- Xi, Z., Rainero, I., Rubino, E., Pinessi, L., Bruni, A. C., Maletta, R. G., Nacmias, B., Sorbi, S., Galimberti, D., Surace, E. I., Zheng, Y., Moreno, D., Sato, C., Liang, Y., Zhou, Y., Robertson, J., Zinman, L., Tartaglia, M. C., St George-Hyslop, P. & Rogaeva, E. 2014a. Hypermethylation of the CpG-island near the C9orf72 G(4)C(2)-repeat expansion in FTLD patients. *Hum Mol Genet*, 23, 5630-7.

- Xi, Z., van Blitterswijk, M., Zhang, M., McGoldrick, P., McLean, J. R., Yunusova, Y., Knock, E., Moreno, D., Sato, C., McKeever, P. M., Schneider, R., Keith, J., Petrescu, N., Fraser, P., Tartaglia, M. C., Baker, M. C., Graff-Radford, N. R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Mackenzie, I. R., Rademakers, R., Robertson, J., Zinman, L. & Rogaeva, E. 2015a. Jump from pre-mutation to pathologic expansion in C9orf72. *Am J Hum Genet*, 96, 962-70.
- Xi, Z., Yunusova, Y., van Blitterswijk, M., Dib, S., Ghani, M., Moreno, D., Sato, C., Liang, Y., Singleton, A., Robertson, J., Rademakers, R., Zinman, L. & Rogaeva, E. 2014b. Identical twins with the C9orf72 repeat expansion are discordant for ALS. *Neurology*, 83, 1476-8.
- Xi, Z., Zhang, M., Bruni, A. C., Maletta, R. G., Colao, R., Fratta, P., Polke, J. M., Sweeney, M. G., Mudanohwo, E., Nacmias, B., Sorbi, S., Tartaglia, M. C., Rainero, I., Rubino, E., Pinessi, L., Galimberti, D., Surace, E. I., McGoldrick, P., McKeever, P., Moreno, D., Sato, C., Liang, Y., Keith, J., Zinman, L., Robertson, J. & Rogaeva, E. 2015b. The C9orf72 repeat expansion itself is methylated in ALS and FTLN patients. *Acta Neuropathol*, 129, 715-27.
- Xi, Z., Zinman, L., Grinberg, Y., Moreno, D., Sato, C., Bilbao, J. M., Ghani, M., Hernandez, I., Ruiz, A., Boada, M., Moron, F. J., Lang, A. E., Marras, C., Bruni, A., Colao, R., Maletta, R. G., Puccio, G., Rainero, I., Pinessi, L., Galimberti, D., Morrison, K. E., Moorby, C., Stockton, J. D., Masellis, M., Black, S. E., Hazrati, L. N., Liang, Y., van Haersma De With, J., Fornazzari, L., Villagra, R., Rojas-Garcia, R., Clarimon, J., Mayeux, R., Robertson, J., St George-Hyslop, P. & Rogaeva, E. 2012. Investigation of c9orf72 in 4 neurodegenerative disorders. *Arch Neurol*, 69, 1583-90.
- Xi, Z., Zinman, L., Moreno, D., Schymick, J., Liang, Y., Sato, C., Zheng, Y., Ghani, M., Dib, S., Keith, J., Robertson, J. & Rogaeva, E. 2013. Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *Am J Hum Genet*, 92, 981-9.
- Xiao, S., Macnair, L., McGoldrick, P., McKeever, P. M., McLean, J. R., Zhang, M., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E. & Robertson, J. 2015. Isoform-specific antibodies reveal distinct subcellular localizations of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 78, 568-83.
- Yamakawa, M., Ito, D., Honda, T., Kubo, K., Noda, M., Nakajima, K. & Suzuki, N. 2015. Characterization of the dipeptide repeat protein in the molecular pathogenesis of c9FTD/ALS. *Hum Mol Genet.*, 24, 1630-45.
- Yeh, T. H., Lai, S. C., Weng, Y. H., Kuo, H. C., Wu-Chou, Y. H., Huang, C. L., Chen, R. S., Chang, H. C., Traynor, B. & Lu, C. S. 2013. Screening for C9orf72 repeat expansions in parkinsonian syndromes. *Neurobiol Aging*, 34, 1311 e3-4.
- Zhang, D., Iyer, L. M., He, F. & Aravind, L. 2012. Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Front Genet*, 3, 283.
- Zhang, M., Xi, Z., Misquitta, K., Sato, C., Moreno, D., Liang, Y., Slow, E., Rogaeva, E. & Tartaglia, M. C. 2017. C9orf72 and ATXN2 repeat expansions coexist in a family with ataxia, dementia, and parkinsonism. *Mov Disord*, 32, 158-162.
- Zhang, Y.-J., Guo, L., Gonzales, P. K., Gendron, T. F., Wu, Y., Jansen-West, K., O'Raw, A. D., Pickles, S. R., Prudencio, M., Carlomagno, Y., Gachechiladze, M. A., Ludwig, C., Tian, R., Chew, J., Deture, M., Lin, W.-L., Tong, J., Daugherty, L. M., Yue, M., Song, Y., Andersen, J. W., Castanedes-Casey, M., Kurti, A., Datta, A., Antognetti, G., McCampbell, A., Rademakers, R., Oskarsson, B., Dickson, D. W., Kampmann, M., Ward, M. E., Fryer, J. D., Link, C. D., Shorter, J. & Petrucelli, L. 2019. Heterochromatin anomalies and double-stranded RNA accumulation underlie C9orf72 poly(PR) toxicity. *Science*, 363, eaav2606.
- Zhang, Y. J., Gendron, T. F., Ebbert, M. T. W., O'Raw, A. D., Yue, M., Jansen-West, K., Zhang, X., Prudencio, M., Chew, J., Cook, C. N., Daugherty, L. M., Tong, J., Song, Y., Pickles, S. R., Castanedes-Casey, M., Kurti, A., Rademakers, R., Oskarsson, B., Dickson, D. W., Hu, W., Gitler, A. D., Fryer, J. D. & Petrucelli, L. 2018. Poly(GR) impairs protein translation and stress granule dynamics in C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med*, 24, 1136-1142.

- Zhang, Y. J., Gendron, T. F., Grima, J. C., Sasaguri, H., Jansen-West, K., Xu, Y. F., Katzman, R. B., Gass, J., Murray, M. E., Shinohara, M., Lin, W. L., Garrett, A., Stankowski, J. N., Daugherty, L., Tong, J., Perkerson, E. A., Yue, M., Chew, J., Castanedes-Casey, M., Kurti, A., Wang, Z. S., Liesinger, A. M., Baker, J. D., Jiang, J., Lagier-Tourenne, C., Edbauer, D., Cleveland, D. W., Rademakers, R., Boylan, K. B., Bu, G., Link, C. D., Dickey, C. A., Rothstein, J. D., Dickson, D. W., Fryer, J. D. & Petrucelli, L. 2016. C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nat Neurosci*, 19, 668-677.
- Zhang, Y. J., Jansen-West, K., Xu, Y. F., Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Lin, W. L., Sasaguri, H., Caulfield, T., Hubbard, J., Daugherty, L., Chew, J., Belzil, V. V., Prudencio, M., Stankowski, J. N., Castanedes-Casey, M., Whitelaw, E., Ash, P. E., Deture, M., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W. & Petrucelli, L. 2014. Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress. *Acta Neuropathol*, 128, 505-24.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., Strom, T. M., Wszolek, Z. K. & Gasser, T. 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44, 601-7.
- Zou, Z. Y., Zhou, Z. R., Che, C. H., Liu, C. Y., He, R. L. & Huang, H. P. 2017. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88, 540-549.
- Zu, T., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Reid, T., Pletnikova, O., Lewis, J., Miller, T. M., Harms, M. B., Falchook, A. E., Subramony, S. H., Ostrow, L. W., Rothstein, J. D., Troncoso, J. C. & Ranum, L. P. 2013. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E4968-77.

8. PRILOZI

8.1 Prilog 1-Dozvola Etičkog odbora Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije



КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР

СРБИЈЕ

**11000 БЕОГРАД; ПАСТЕРОВА 2,
РЕПУБЛИКА СРБИЈА**

ЕТИЧКИ ОДБОР

11000 Београд, Пастерова 2
011 366-2080, 264-4850, Факс 011 306-7180

Број: 402/5

Дана: 30.01.2020. године

На основу одредаба Закона здравственој заштити Републике Србије („Службени гласник РС“ бр. 25/2019), Закона о лековима и медицинским средствима Републике Србије („Службени гласник РС“ бр. 30/2010, 107/2012, 105/2017 и 113/2017), Закона о правима пацијената („Сл. гласник РС“, бр. 45/13), Закона о заштити података о личности „Сл. гласник РС“, бр. 97/2008, 104/2009, идр. Закон), Закона о здравственој документацији и евиденцијима у области здравства („Сл. гласник РС“, бр. 123/2014, 106/2015, 105/2017, поступајући у складу са Смјерницама Добре клиничке праксе у клиничком испитивању (GCP)- („Сл. гласник РС“, бр. 108/2017), Пословника о раду Етичког одбора Клиничког центра Србије бр. 3098/39 од 26.04.2012. год., Етички одбор Клиничког центра Србије у саставу: Проф. др Андрија Богдановић – председник, Проф. др Бранислава Милenkовић- заменик председника, Проф. др Марина Светел, Проф. др Александра Перич- Попадић, Др sci med Дијана Сефер - клинички фармаколог, Проф. др Александра Јотић и Doc. др Данијел Галун – лекари специјалисти сви запослени у Клиничком центру Србије, одлучујући о захтеву Проф. др Elke Stefanove, на својој 3. седници одржаној дана 30.01.2020. године, doneo је следећу

ОДЛУКУ

Одобрава се спровођење клиничког испитивања под називом: „Анализа значаја хексануклеотидних поновака у некодирajuћем региону gena C9orf72 код neurodegenerativних болести“.

Главни истраживач је Проф. др Elka Stefanova.

Чланови истраживачког тима су: Проф. др Владимир Костић и Проф. др Зорца Stević.

Истраживачи сарадници су: Проф. др Ivana Novaković и Ana Marjanović.

Испитивање ће бити спроведено на Клиници за neurologiju Клиничког центра Србије у сарадњи са Медицинским факултетом Универзитета у Београду.

Резултати испитивања биће коришћени за израду докторске дисертације (Ana Marjanović). Mentor докторске дисертације је Проф. др Ivana Novaković.

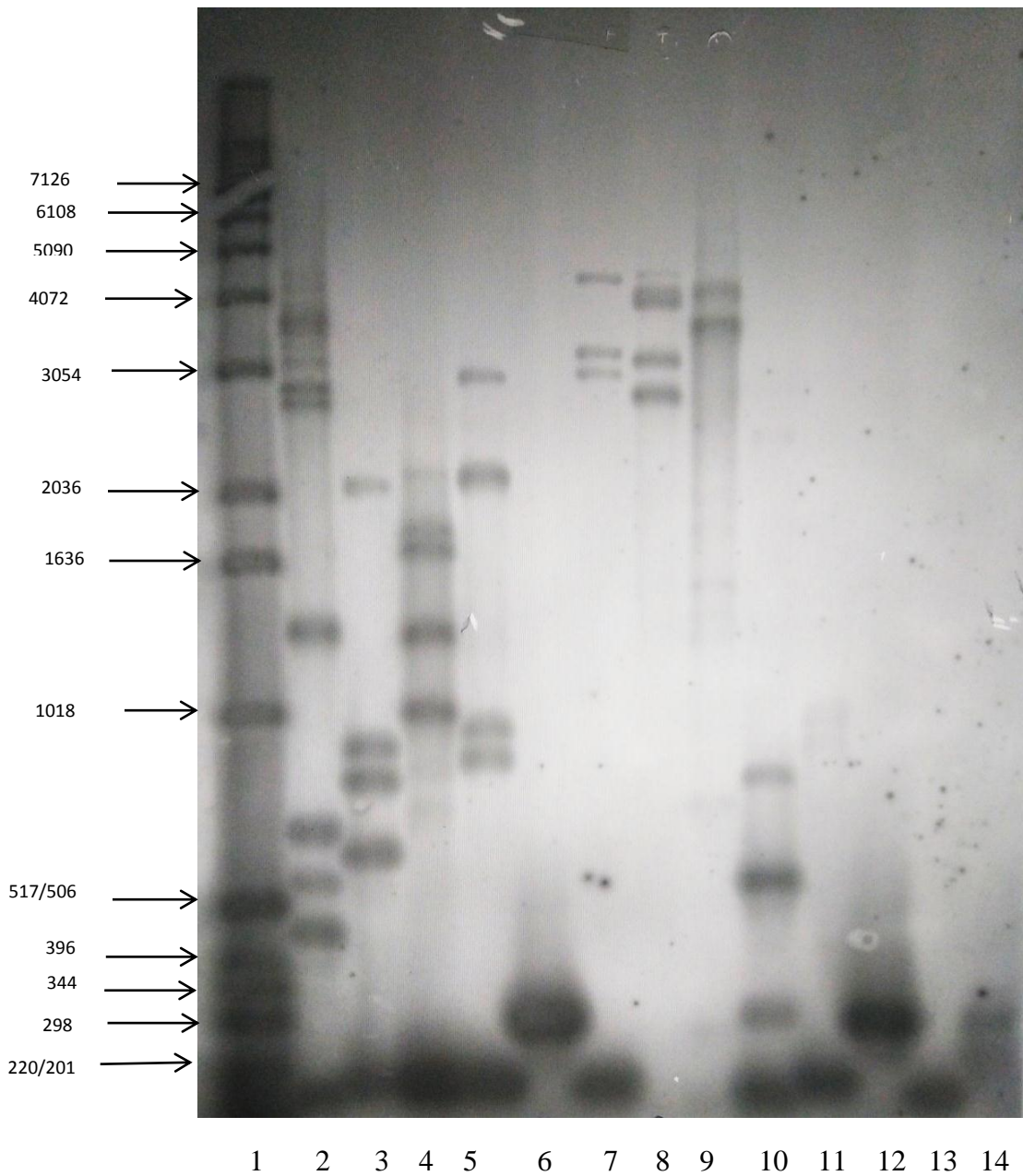
Прilikом доношења ове одлуке, Етички одбор је разматрао следећу документацију:

- 1). Пропратно писмо/Обрасци за одобрење академског клиничког испитивања поднети Етичком одбору KCS,
- 2). Сагласност стручног КOLEGIЈУМА Клинике за neurologiju KCS бр. 23/26 од 15.01.2020. године,
- 3). Протокол /plan испитивања,
- 4). Образложење докторске тезе,
- 5). Информација за пацијента са обрасцем за давање писаног пристанка,
- 6). Пријемни лист-генетске анализе и
- 7). Биографија главног истраживача и истраживача сарадника.

PREDSEDNIK ETICKOG ODBORA

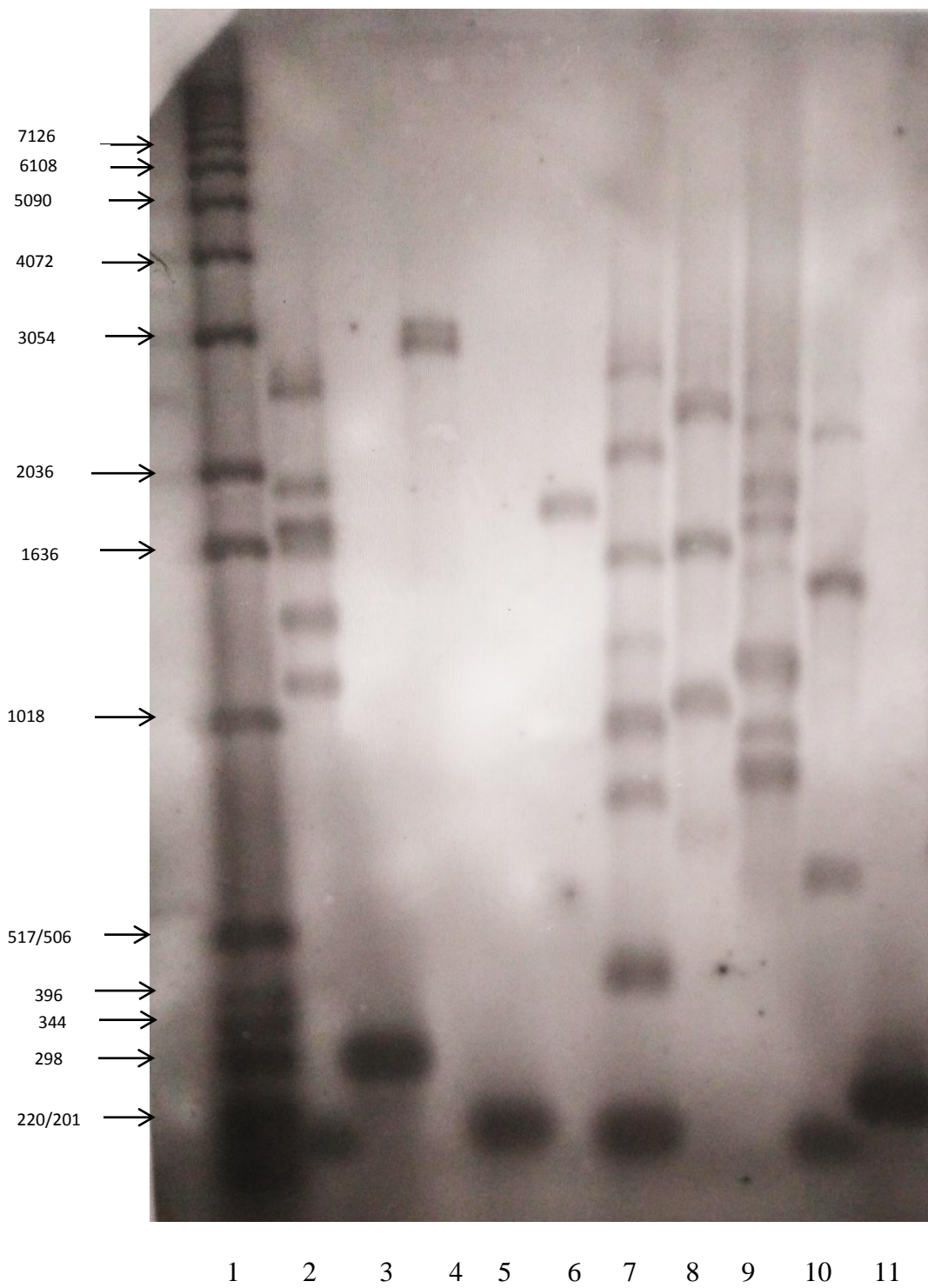
Prof. dr Andrija Bogdanović

8.2 Prilog 2-Prikazi somatske nestabilnosti ekspanzije u genu *C9orf72* dobijene Southern blot metodom



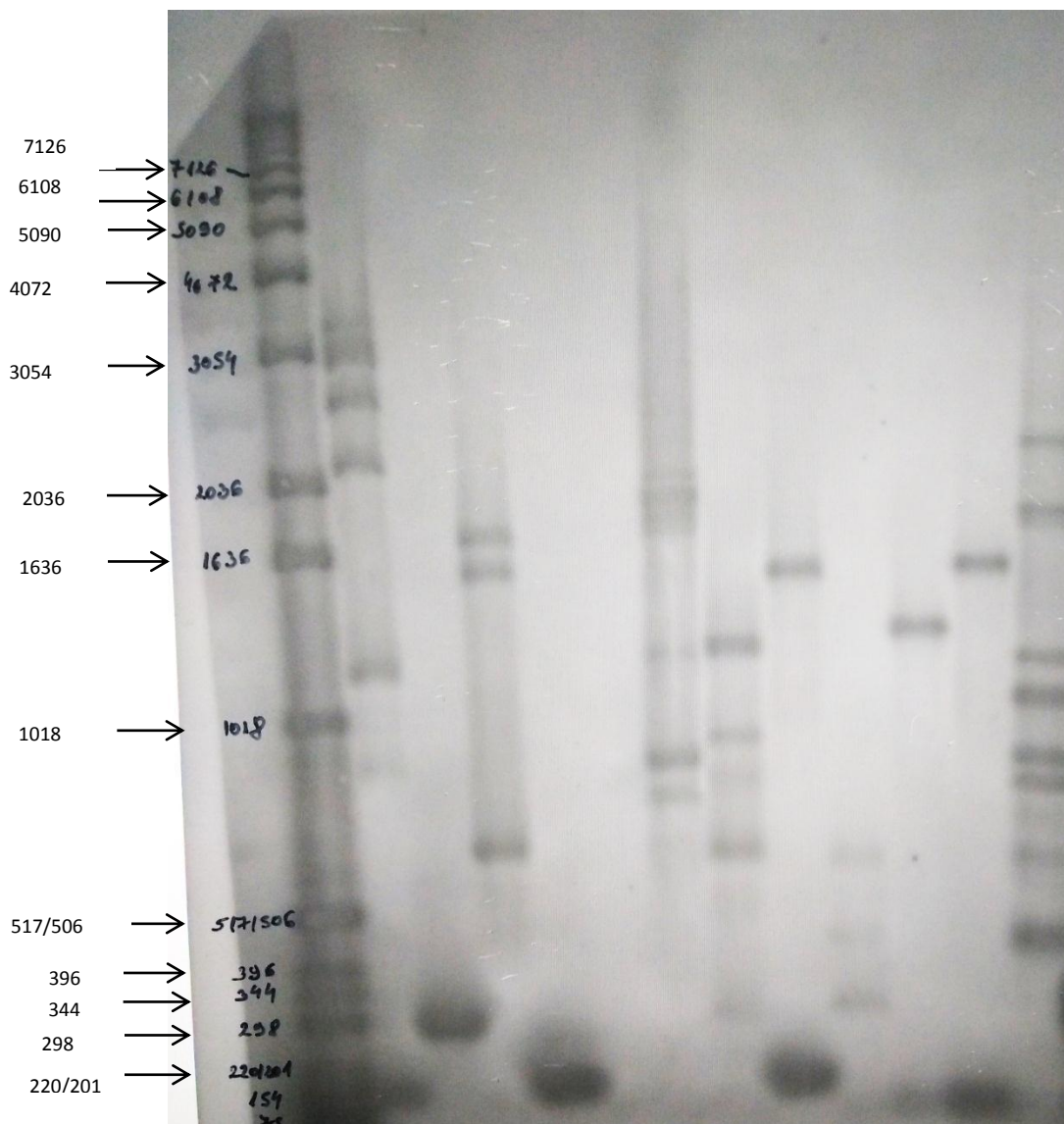
1-MX
2-FTD9-PC
3-ALS148
4-ALS148
5-ALS148
6-NC
7-FTD196
8-FTD21
9-FTD46 (21)
10-FTD9
11-ALS148

12-NC
13-FTD9
14-NC



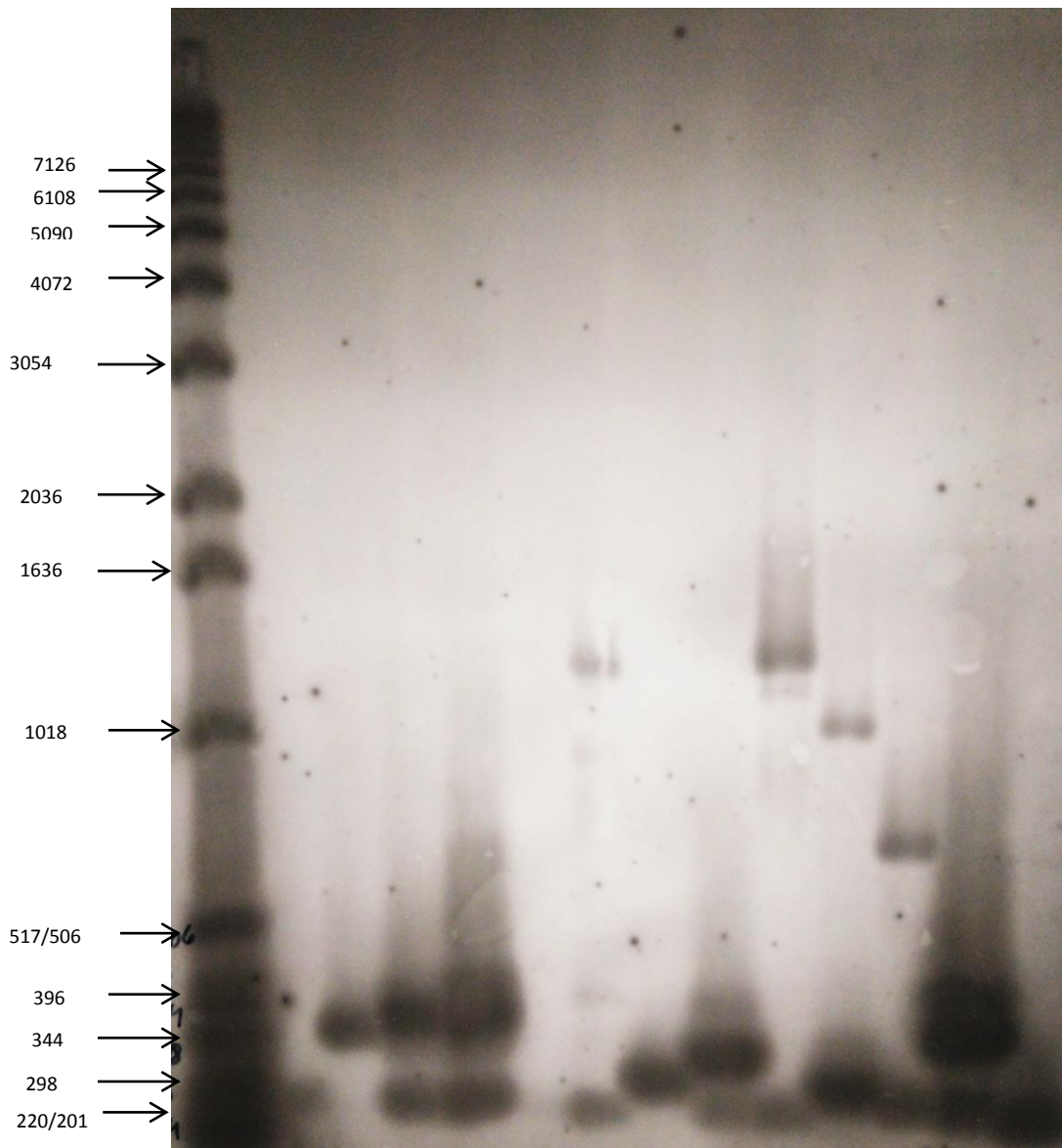
1-MX
2-FTD9-PC
3-NC
4-AD219
5-/
6-ALS208

7-FTD196
8-FTD46 (21)
9-FTD162
10-ALS61
11-/



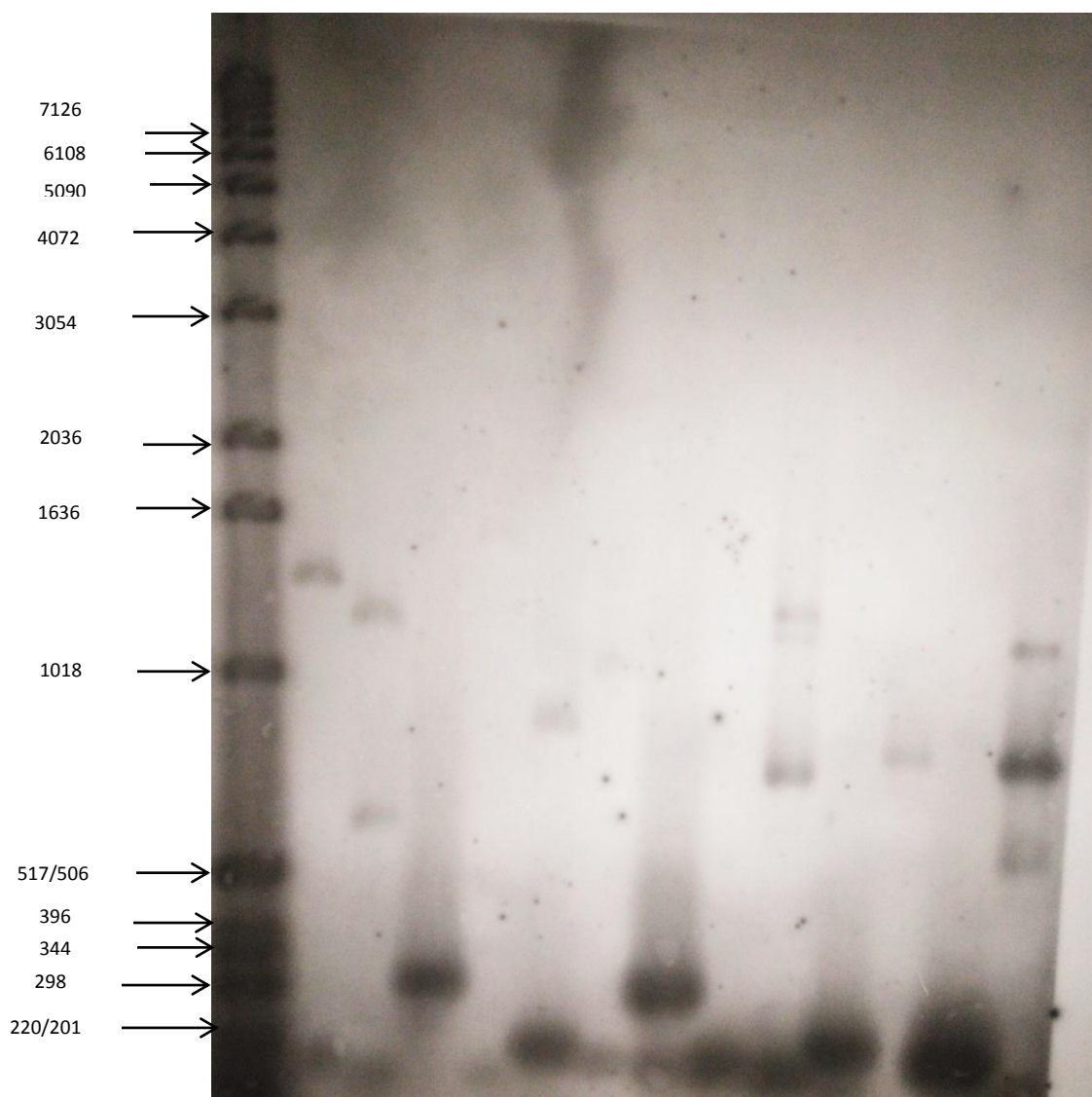
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

- 1-MX
- 2-FTD9-PC
- 3-NC
- 4-AD219
- 5- /
- 6-ALS208
- 7-ALS5
- 8-FTD30
- 9-ALS13
- 10-ALS64
- 11-ALS56
- 12-ALS71
- 13-ALS89



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

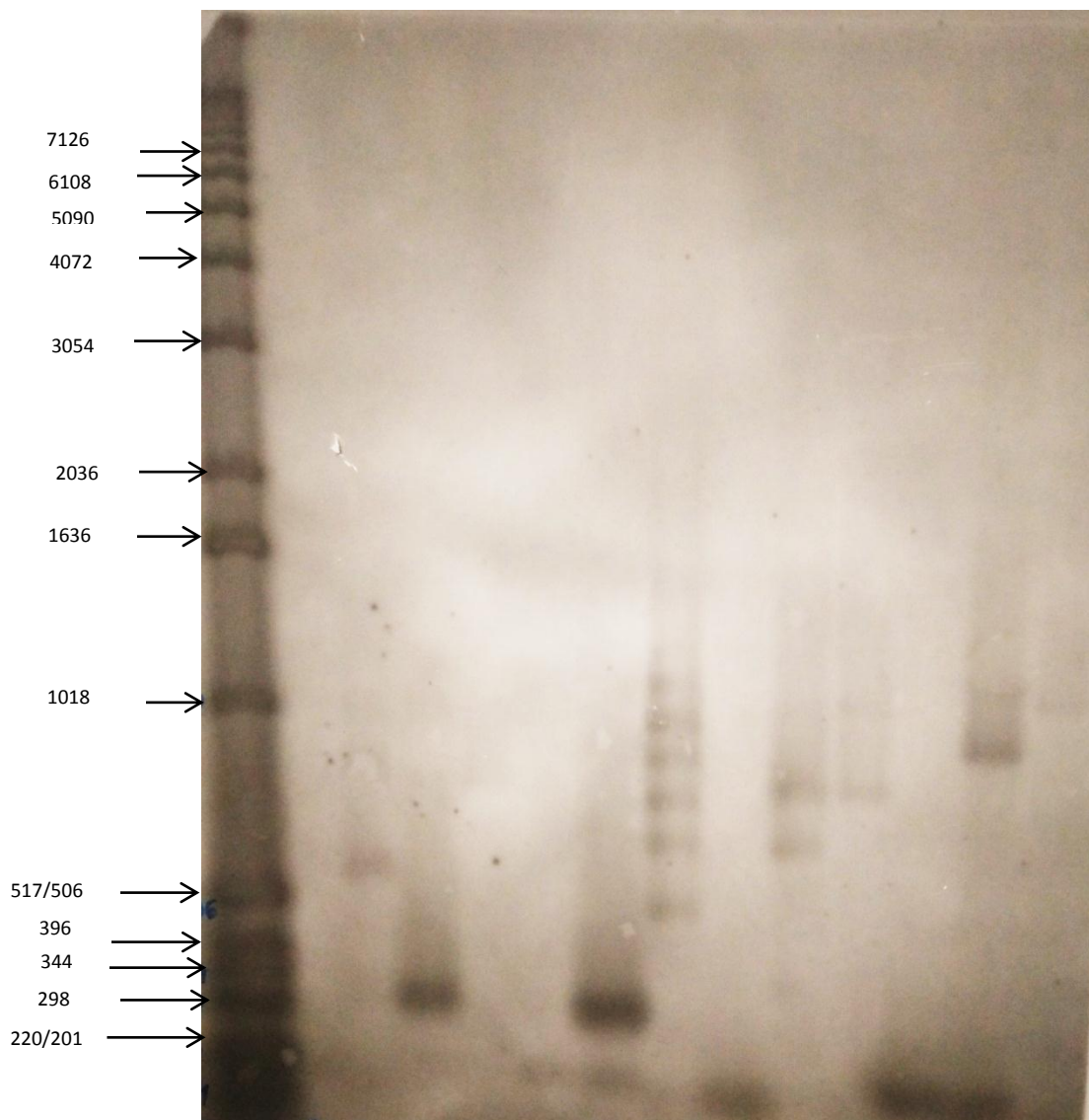
| | |
|-----------|-------|
| 1-MX | 13-/- |
| 2-FTD9-PC | 14-/- |
| 3-NC | |
| 4-/- | |
| 5-/- | |
| 6-ALS208 | |
| 7-ALS208 | |
| 8-ALS13 | |
| 9-/- | |
| 10-ALS131 | |
| 11-ALS139 | |
| 12-ALS150 | |



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1-MX
 2-FT9-PC
 3-ALS89-PC
 4-NC
 5-ALS131
 6-ALS139
 7-ALS150
 8-/
 9-ALS177
 10-ALS193
 11-/
 12-ALS244
 13-/

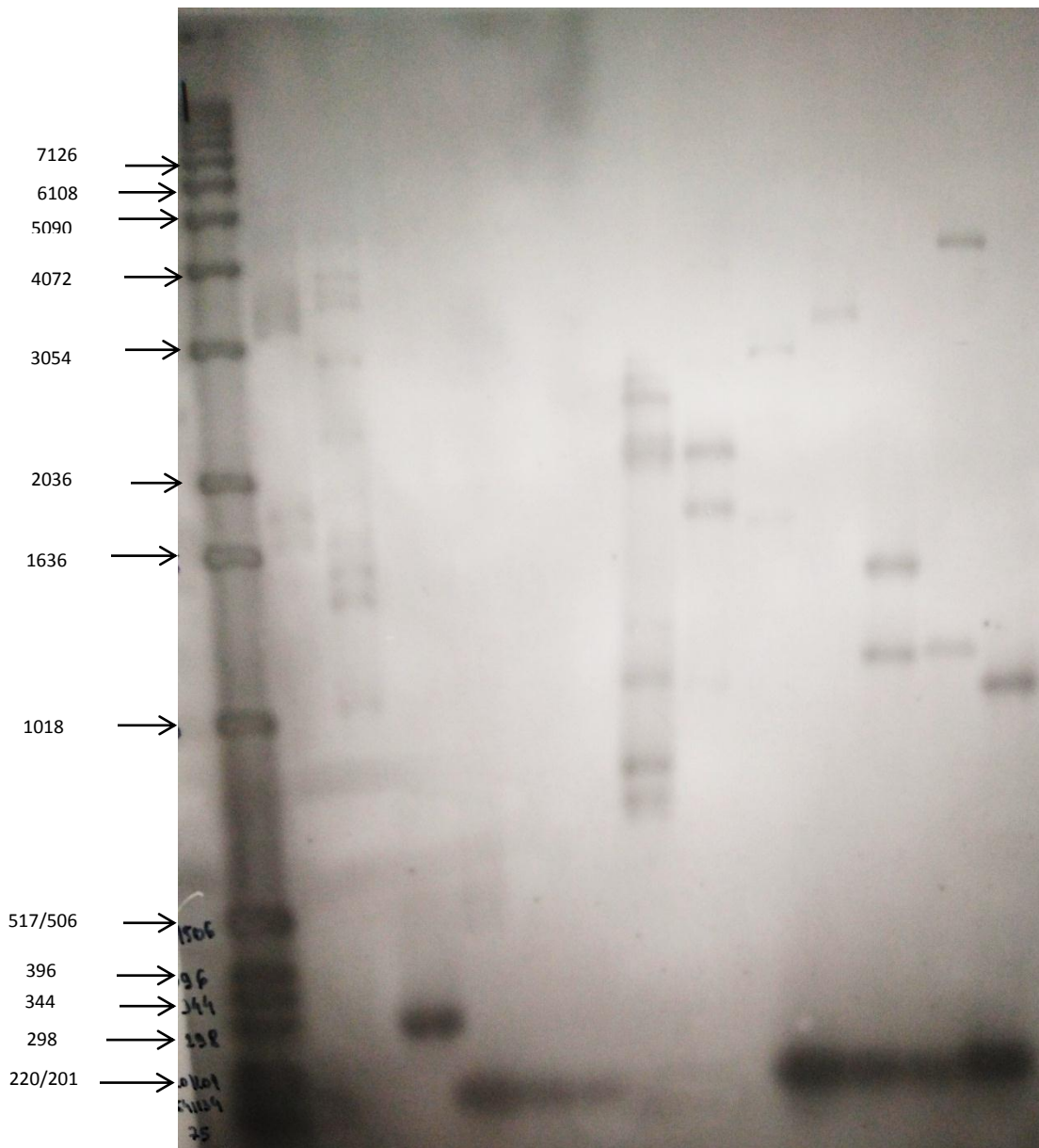
14-ALS259



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1-MX
 2-FTD9-PC
 3-ALS89-PC
 4-NC
 5-ALS131
 6-ALS150
 7-/
 8-ALS277
 9-/
 10-ALS298
 11-ALS306
 12-ALS320
 13-ALS325

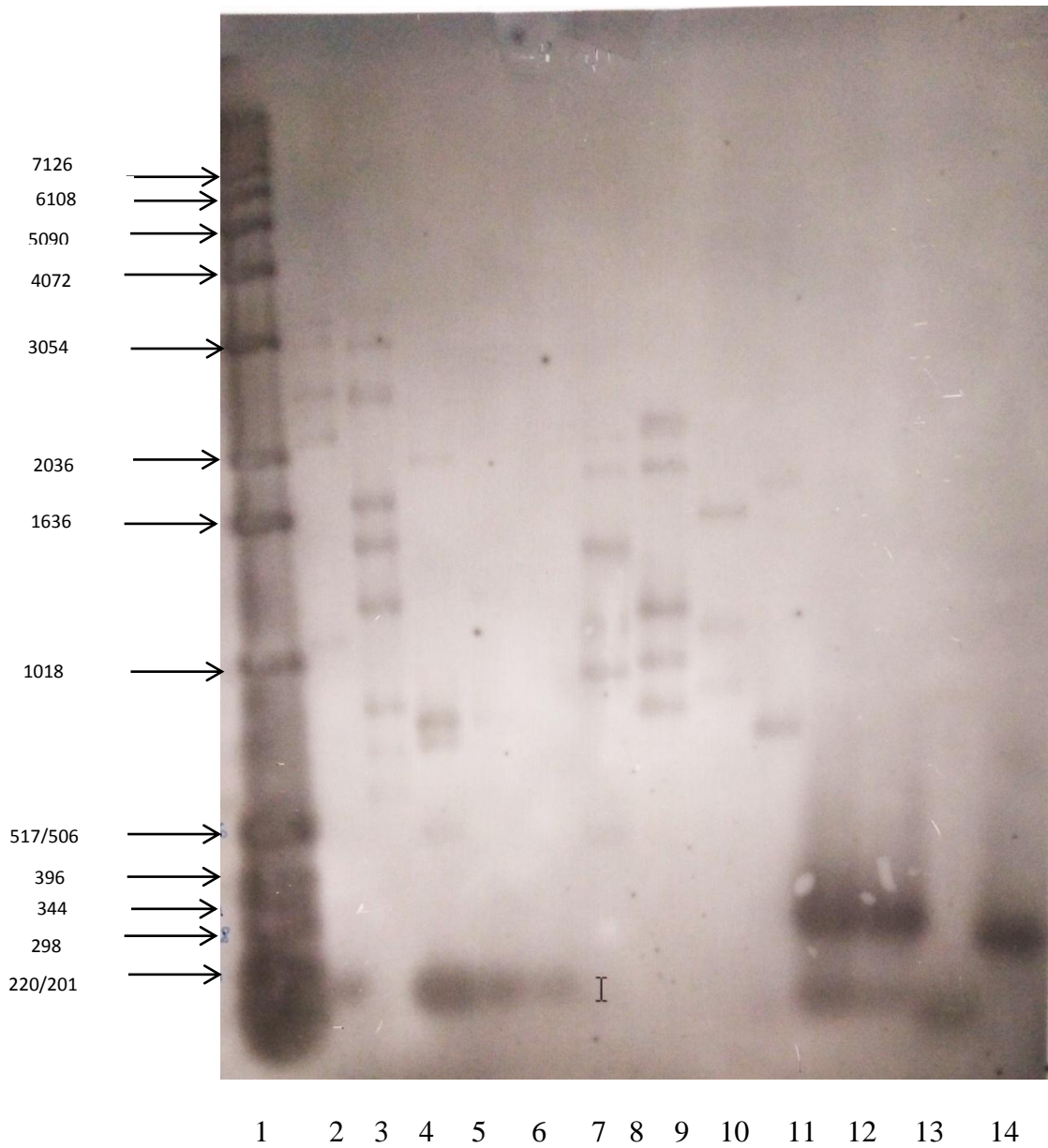
14-ALS354



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

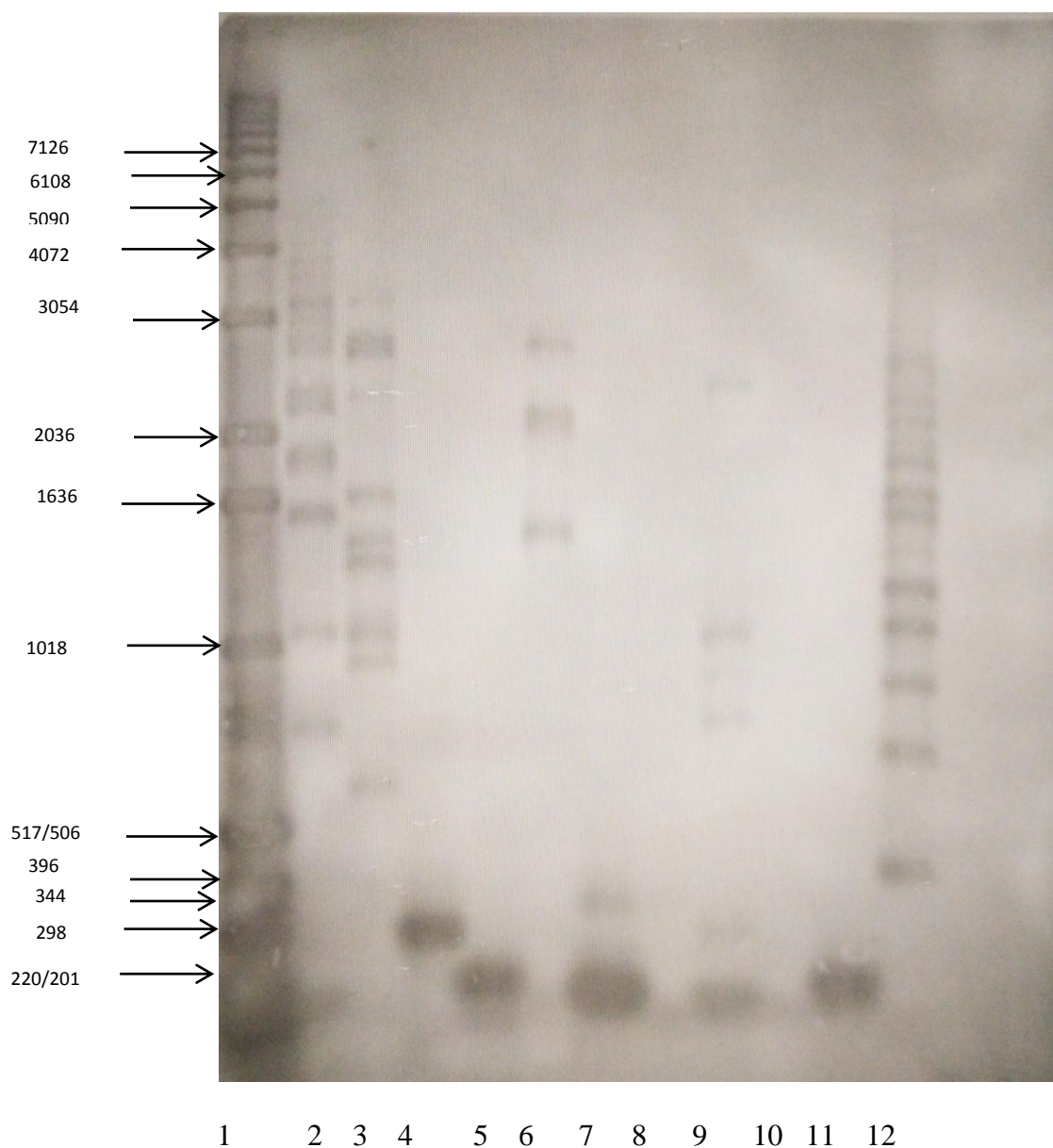
1-MX
 2-FTD9-PC
 3-ALS89-PC
 4-NC
 5-ALS350
 6-ALS350
 7-ALS350
 8-ALS354
 9-ALS354
 10-ALS354

11-FTD279
 12-FTD279
 13-FTD279
 14-ALS188

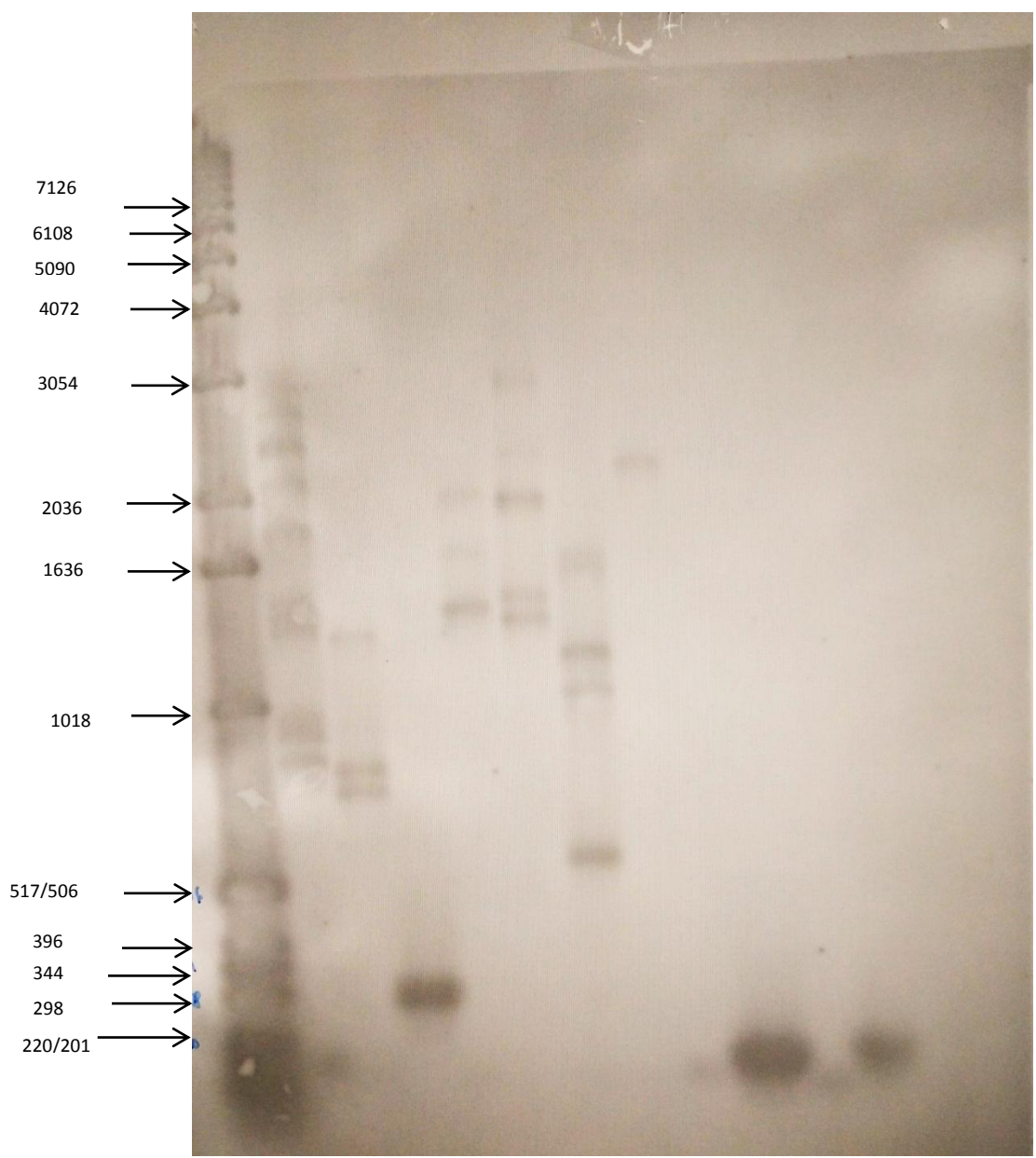


1-MX
2-FTD9-PC
3-ALS89-PC
4-ALS350
5-ALS350
6-ALS350
7-FTD280
8-FTD280
9-FTD280
10-ALS306
11-/
12-/

13-/
14-NC

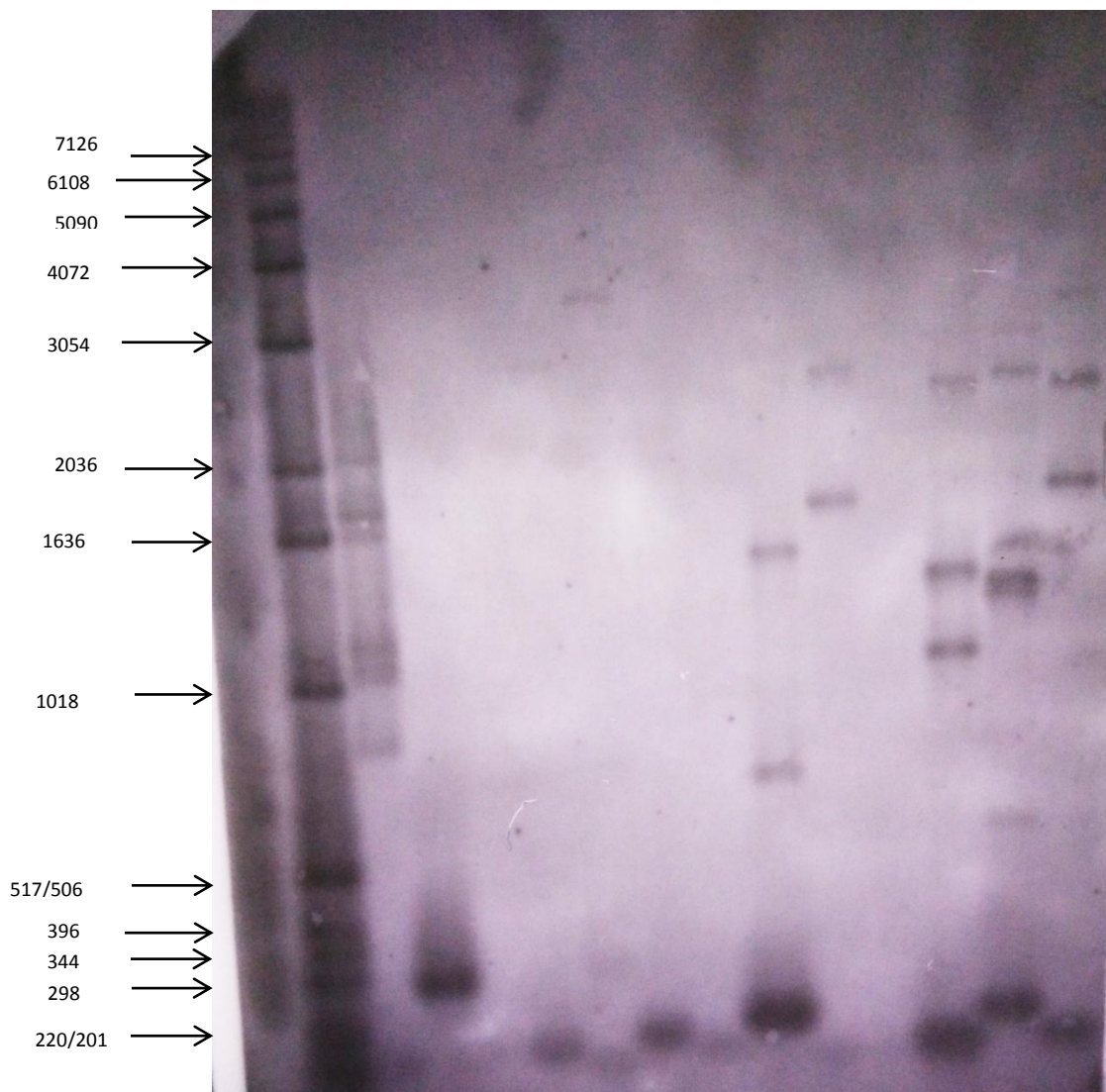


- 1-MX
- 2-FTD9-PC
- 3-ALS89-PC
- 4-NC
- 5-/
- 6-ALS177
- 7-/
- 8-/
- 9-ALS320
- 10-/
- 11-/
- 12-FTD30



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1-MX 11-/
 2-FTD9-PC 12-/
 3-FTD30
 4-NC
 5-ALS429
 6-ALS429
 7-ALS436
 8-ALS436
 9-/
 10-/



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

- 1-MX
- 2-ALS89-PC
- 3-NC
- 4-ALS56
- 5-ALS71
- 6-ALS131
- 7-ALS139
- 8-ALS150
- 9-ALS188
- 10-ALS208
- 11-ALS244
- 12-ALS325
- 13-ALS272
- 14-FTD260

Biografija autora

Ana S. Marjanović rođena je 2. novembra 1985. godine u Valjevu, Srbija. Nakon završene srednje medicinske škole „dr Miša Pantić“ u Valjevu, školske 2004/05 upisala je Biološki fakultet u Beogradu, smer biologija. Osnovne studije na Biološkom fakultetu na smeru Genetika završila je 2011. godine odbranom diplomskog rada Biologija i ponašanje jedinki roda *Triops* u veštačkim uslovima.

Od marta 2014. godine započinje volonterski rad u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti na Klinici za neurologiju, UKCS. Školske 2015/16 upisuje doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Genetika. U januaru 2017. godine zasniva radni odnos sa Medicinskim fakultetom Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja 175090 „Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma: kliničke, morfološke i molekularno-genetičke korelacije“ čiji je rukovodilac Akademik prof. dr Vladimir Kostić. U zvanje istraživač saradnik na Medicinskom fakultetu izabrana je u septembru 2020. godine.

Član je Društva genetičara Srbije, Društva za neuronauke Srbije i Federation of European Neurosciences. Tokom dosadašnjeg rada autor je i koautor na 25 naučnih publikacija u međunarodnim časopisima M20 kategorije kao i 41 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана С. Марјановић

број индекса Б3022/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Заступљеност експанзија хексануклеотидних поновака у некодирајућем региону гена *C9orf72*

код различитих неуродегенеративних болести

- 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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана С. Марјановић

Број индекса Б3022/2015

Студијски програм Биологија

Наслов рада Заступљеност експанзија хексануклеотидних поновака у некодирајућем региону гена *C9orf72* код различитих неуродегенеративних болести

Ментор проф. др Ивана Новаковић, др Милица Кецкаревић Марковић

Потписани/а Ана С. Марјановић

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Заступљеност експанзија хексануклеотидних поновака у некодирајућем региону
гена *C9orf72* код различитих неуродегенеративних болести

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.