



AALBORG UNIVERSITET
STUDENTERRAPPORT

Genetisk udredning af patienter med ataksi: Outcome 2018-2022 og fremtidige perspektiver for forbedret diagnostik

Kandidatspeciale, Forskningssemester E23

Julie Vogel Kolte

Stud. med. Aalborg Universitet

Studienummer: 2016-4196

Projektnummer: 21e23au5

Hovedvejleder: Anja Lisbeth Frederiksen, Overlæge, Klinisk professor,

Klinisk Genetisk Afdeling, Aalborg Universitetshospital

Medvejledere: Tue Diemer, Afdelingslæge,

Klinisk Genetisk Afdeling, Aalborg Universitetshospital

Thomas Blauenfeldt, Molekylærbiolog, ph.d.

Afdeling for Molekylærdiagnostik, Aalborg Universitetshospital

Antal ord: 4993

Efterår 2023

1 Resumé

Baggrund: Arvelige former for ataksi, hereditær ataksi (HA), udviser en heterogen fæno- og genotype, hvilket kan vanskeliggøre genetisk udredning. Molekylærgenetisk skyldes HA hyppigst short tandem repeats (STR), single nucleotid variation (SNV) eller copy number variation (CNV). Trods genetisk screening med specifikke konventionelle og omfattende analyser ('Next Generation Sequencing', NGS) forbliver en anseelig andel med mistænkt monogenetisk ætiologi uden påvist molekylærgenetisk diagnose. Nuværende teknikker er begrænset i detektering af STR og formodes derfor at underdiagnosticere HA.

Metoder: Studiet er todelt. Del 1 var et retrospektiv single-center kohortestudie med 68 patienter henvist til Klinisk Genetisk Afdeling (KGA), Aalborg Universitetshospital (AAUH) for mistænkt HA (N=41) eller bærertilstand (N=19), i perioden 01-01-2018 - 31-12-2022. Der blev foretaget kvalitativ gennemgang af patientkarakteristika og vurdering af eventuelle tidligere genetiske analyser. Del 2 var et systematisk litteraturstudie af nuværende og nye molekylærgenetiske metoder med særligt fokus på STR. Disse metoder blev vurderet i forhold til muligheder og begrænsninger ved screening af HA.

Resultater: Blandt patienter med ataksi forekom en divers fænotype og en diagnostic yielld (DY) på 36,83% ved de anvendte genetiske metoder. Den mest udbredte screeningsstrategi var analyse af de hyppigste typer STR-HA med konventionelle metoder efterfulgt af targeteret NGS (TP). Whole Genome Sequencing (srWGS) blev efter introduktion i 2022 anvendt i stigende grad. Halvdelen af patienterne blev screenet uden påvisning af molekylærgenetisk diagnose, herunder fire med fortsat mistanke om monogenetisk STR-ætiologi, grundet positiv familieanamnese og symptomdebutalder <50 år. De nuværende metoder kan detektere de hyppigste typer STR-HA, de fleste SNV og CNV samt korte STR (<150 bp), men er utilstrækkelig til kvantificering af STR >150 bp. En ny metode til detektering af STR, Long-Read Sequencing (LRS), er under eksperimentel testning og kan kvantificere lange STR med højere præcision end srWGS, men der mangler klinisk evidens om metodens brugbarhed. Afdeling for Molekylær Diagnostik (AfMD), AAUH, tester på nuværende tidspunkt et targeteret repeat-panel (T-LRS).

Konklusion: Dette studie finder, at der forekommer tidligere udredte udiagnosticerede patienter med HA, og at andelen af patienter med påvist monogenetisk ætiologi er i overensstemmelse med tidligere fund. Med LRS-analyse er der indikation for en diagnostisk merværdi ved screening af HA, men forbedret diagnostik med LRS af HA forudsætter 1) forbedret erkendelse af fænotypen, 2) mere viden om tilstandens genetiske basis samt 3) valide referencegenomer. Udvidelse af spektret af flere fænotyper med relation til STR er derfor oplagt for videre studier.

2 Introduktion

Bevægeforstyrrelser dækker over en bred vifte af neurologiske tilstande, hvoraf en andel har genetisk baggrund [1]. Ved dysfunktion af cerebellum forekommer symptomkomplekset ataksi, hvilket kan skyldes monogenetisk ætiologi, benævnt hereditær ataksi (HA) [2]. HA er forårsaget af enten ekspansioner af gentagende korte nukleotidsekvenser (short tandem repeats, STR) , variation af et enkelt basepar (single nucleotide variation, SNV) eller variation i antallet af større DNA-segmenter (copy number variation, CNV) i et gen[3].

Ataksi kan opstå på baggrund af erhvervede, sporadiske eller genetisk betingede årsager [4]. Definitorisk er ataksi kendetegnet ved koordinationsproblemer af den voluntære muskulatur med symptomer som balanceusikkerhed, gangbesvær og koordinationsforstyrrelser, samt varierende grader af nystagmus, intentionstremor, dysmetri, dysdiadokinese og dysartri [2], og billeddiagnostisk kan cerebellumatrofi ofte påvises [5]. Når erhvervede og potentielt reversible årsager er udelukket kan der, hos yngre/midaldrende individer med et langsomt progredierende eller episodisk forløb mistænkes genetisk årsag. Familiemedlemmer med lignende symptomer [6] eller indgiftede forældre understøtter genetisk ætiologi [7]. Mistænkes monogenetisk årsag, iværksættes genetisk udredning.

HA klassificeres efter arvegangene med hhv. autosomal dominant (AD-HA), autosomal recessiv(AR-HA) og i sjældne tilfælde X-bunden eller mitokondriel [5]. Hvis der påvises monogenetisk årsag, kan tilstanden yderligere opdeles i genetisk ætiologi, dvs. forårsaget af STR eller ikke-STR (SNV/CNV) [3]. AD-HA benævnes spinocerebellar ataksi (SCA), hvoraf 14 typer skyldes STR, hyppigst nukleotiderne CAG. Introduktion af NGS har medført opdagelse af nye ikke-STR SCA-typer, og på nuværende tidspunkt er 44 forskellige typer SCA klassificeret [8]. På såvel verdensplan som i Europa er de hyppigste SCA3, SCA1 og SCA2 [9, 10], men der forekommer store geografiske forskelle, selv inden for landegrænser [10]. Det formodes at skyldes en "founder effekt", dvs. en enkelt hyppigt forekommende variant i et geografisk område, hvor befolkningen stammer fra en lille gruppe med en bestemt genotype [11].

AR-HA, til tider benævnt autosomal recessiv spinocerebellar ataksi (SCAR), udviser en divers fæno- og genotype med næsten 100 forskellige tilstande med ataksi og AR-arvegang identificeret (i 2028) [12]. AR-HA kan forårsages af STR [13] ved eks. CANVAS (Cerebellar ataksi, neuropati og vestibulær areflesi-syndrom) [3], men er hyppigere ikke-STR varianter.

Det fænotypiske billede ved HA er meget heterogent, og der ses fæno- og genotypisk overlap med andre bevægeforstyrrelser [1, 6]. Gennemsnitsalderen ved symptomdebut er 30 til 40 år [13]. Ved STR-HA ses ofte positiv familieanamnese, såkaldt anticipation, hvor antallet af STR forøges gennem generationer. Det medfører en gradvis lavere debutalder og/eller forværret symptombillede [14]. Hos ataktiske individer med negativ familiehistorie for ataksi ses hyppigere AR-HA uden ekspansioner, men sammenhængen mellem den formodede arvegang og genotypen er ikke entydig [13]. Ud over de klassiske genvarianter med en STR, SNV eller CNV indikeres, at

genetikken ofte er langt mere kompleks [8], hvilket gør det vanskeligt at prædiktere genotypen ud fra patientens klinik og formodede arvegang.

Den genetiske screeningsstrategi er i dag tilrettelagt ud fra den kliniske præsentation. Konventionelle metoder kan detektere de få hyppigste former for STR-HA [13], mens NGS kan sekventere SNV og CNV [15]. Inden for NGS benyttes targeterede genpaneler (TP), heleksomsekventering (Whole Exome Sequencing, WES) og nyligst helgenomsekventering (Whole Genome Sequencing, WGS)[16]. Ved TP analyseres et udvalgt antal foruddefinerede HA-relaterede kandidatgener, mens ved WES undersøges alle de kodende dele af genomet (exons), svarende til ca. 85% af kendte patogene mutationer [17]. Med WGS inkluderes analyse af ikke-kodende- (introns) og regulatoriske regioner [16]. Endnu er kun tolkning af en lille del af intronvarianterne mulig [18], og ingen af NGS-analyse kan detektere STR sufficient [16].

Grundet det heterogene symptombillede, ofte ikke-klassiske arvegeange, dårlige fæno-/genotype-korrelation og kompleks genetik kan det være vanskeligt at vælge den rette screeningsstrategi [11, 3]. De fundamentale begrænsninger ved NGS til detektion af STR gør det yderligere vanskeligt [14]. I dag påvises en molekylærgenetisk diagnose ved under 50 % af ataktiske patienter mistænkt for genetiske ætiologi [7]. Det er uvist, om en vis andel af disse patienter har varianter i nye gener eller uerkendt STR i et gen, som de nuværende metoder ikke kan detektere.

En ny metode, der kombinerer den omfattende analyse ved WGS med måling af lange ekspansioner (>150 bp), såkaldt Long-Read (Long-Read-Sequencing, LRS), er under udvikling [14]. LRS virker derfor oplagt at bruge ved mistanke om STR-HA. Klinisk genetisk afdeling (KGA) på Aalborg Universitetshospital udreder patienter og slægtninge henvist med mistænkt HA med genetiske analyser udført enten af den lokalt tilknyttede Afdeling for Molekylær Diagnostik (AfMD) eller rekvireret fra diverse laboratorier i ind- og udland. AfMD har netop fået PacBio Revio (nyeste sequencer fra PacBio), samt et speciallavet Repeat-panel til LRS og dermed mulighed for at teste anvendeligheden ved udredning af HA.

Symptomerne ved HA kan på nuværende tidspunkt lindres med understøttende behandling [19], men der forskes i målrettet terapi mod specifikke HA-typer, samt interventioner til bærere af HA-varianter [8]. Det er derfor essentielt at stille den korrekte molekylærgenetiske diagnose ved ataksi.

Det er uafklaret, i hvor høj grad lave diagnostic yield (DY) ved HA skyldes vanskeligheder ved at erkende fænotypen eller de nuværende molekylærgenetiske metoders begrænsning. Formålet med dette kvalitets- og litteraturstudie er derfor at undersøge, om der blandt udiagnosticerede ataktiske patienter er indikation for screening med LRS.

3 Design og metoder

3.1 Studiedesign

Del 1 er et retrospektivt single-center kohortestudie. Del 2 er et litteraturstudie af litteratur fra Jan 2018 til Dec 2023 omhandlende nuværende og nye molekulærgenetiske metoder til screening af HA mhp. gennemgang af styrker og begrænsninger.

3.2 Metoder del 1

3.2.1 Patienter og lokation

Liste over alle patienter henvist til genetisk udredning på Klinisk Genetisk Afdeling (KGA), Aalborg Universitetshospital i perioden 01-01-2018 - 31-12-2022 under henvisningsdiagnoserne "SCA", "ataksi", "ataxi", "spinocerebellar ataksi" samt "spinocerebellar ataxi". KGA's optageområde er borgere besiddende i Region Nordjylland (594.000 indbyggere i 2022 [20]). Henvisende indstanser er andre afdelinger i det sekundære sundhedsvæsen samt almen praksis. Patienter henvist til udredning for anden ikke ataksi-relateret genetisk tilstand, men med samme bogstavkombinationer (fx pancreaSCAncer), samt patienter henvist inden 31-12-2022, men indkaldt til indledende samtale i 2023, ekskluderet. Genhenviste patienter under selvstændige forløb (sagsnumre) er sammenlagt, så antal (N) dækker antal unikke individer.

3.2.2 Begrebsdefinitioner

Klinisk ataksi er defineret som objektivt observeret bredsporet gang og/eller koordinationsforstyrrelser med evt. dysartri, nystagmus, tremor og kognitiv påvirkning [6]. MR-cerebrum er ligeledes brugt til at understøtte diagnosen. Da fænotypen ved HA er heterogen [2], er kun individer helt uden bevægeforstyrrelser defineret som asymptomatiske. Positiv familieanamnese er defineret som anamnestisk anført oplysninger som bevægelsesforstyrrelser i familien og dækker tre generationer, samt søskende og forældres søskende. Indekspatienter er defineret som ataktiske individer uden kendt HA i familien, og slægtninge som asymptomatiske individer med kendt familie-variant.

3.2.3 Datakilder og dataindsamling

Information vedrørende symptomer og kliniske fund er indhentet via patientens primære sundhedsjournal. Region Nordjylland overgik fra journalsystemet Clinical Suite til Nord-EPJ i 2022, hvorfor notater er indhentet fra Clinical Suite og Sundhedsjournalen 01-01-2018 til 25-03-2022 og Nord-EPJ 26-02-2022 til 31-12-2022. Stamtræer indtegnet i PASS Client er anvendt til at indhente informationer om familieanamnesen, og Langved Data A/S (LDB) er benyttet til at identificere patientens CPR-nummer samt opnå overblik over, hvorvidt øvrige familiemedlemmer har været henvist til udredning på KGA i Aalborg.

Der er foretaget journalopslag og gennemgang, herunder vurdering af evt. genetiske analyser. Ved journalopslag er specifikt undersøgt for alder ved debut, køn, ataksirelaterede symptomer, familieanamnese samt resultat af MR-cerebrum (mhp. cerebellumatrofi). Inkluderede genanalyser er svar afgivet senest 01-12-2023.

3.2.4 Omklassificering af genvarianter

Alle genvarianter er fra laboratoriet klassificeret ud fra det internationale klassifikationssystem ACMG [21], som overordnet opdeler varianter i fire kategorier: 1) Patogen (C5), 2) formodet patogen (C4), 3) variant af ukendt betydning (VUS) (C3), 4) formodet benign (C2) og 5) benign (C1). Laboratoriet rapporterer alle C5- og C4-varianter og VUS af muligvis klinisk betydning men uafklaret på nuværende tidspunkt. Da klassifikation af de enkelte genvarianter revurderes, i takt med ny viden tilkommer er alle genetiske varianter revurderet i henhold til nyeste klassifikation. Sekundær gennemgang af genvarianterne er primært foretaget via databaserne Franklin [22], ClinVar [23] og OMIM [24]. Ved tvivlstilfælde er genvarianterne konfereret med Thomas Blauenfeldt (molekylærbiolog ved AfMD).

3.2.5 Statistiske metoder

Deskriptiv statistik er foretaget i Microsoft Excel og SPSS Statistics.

3.3 Metoder del 2

3.3.1 Systematisk litteratursøgning

Litteratursøgning er foretaget i databaserne PubMed, Embase og SCOPUS. Der er systematisk søgt litteratur ifa. reviews og systematiske reviews med to søgestrengene mellem 01.01-2018 og 01.12-2023, dog med inkludering af essentielle artikler før denne tidsperiode. To selvstændige søgestrengene var nødvendig for at kunne inkludere litteratur angående metoder specifikt ved HA, såvel som nyeste litteratur inden for molekylærgenetiske teknikker målrettet ekspansioner.

1. søgestreng: "Hereditary ataxia", "Spinocerebellar ataxia", "Inherited ataxia" eller "Short tandem repeat" og "Sequencing", "Genetic test" eller "Diagnosis".

2. søgestreng: "Long read", "Third generation sequencing", "PacBio", "Nanopore" eller "Repeat expansion diagnostic" og "Repeat" eller "Short tandem repeat".

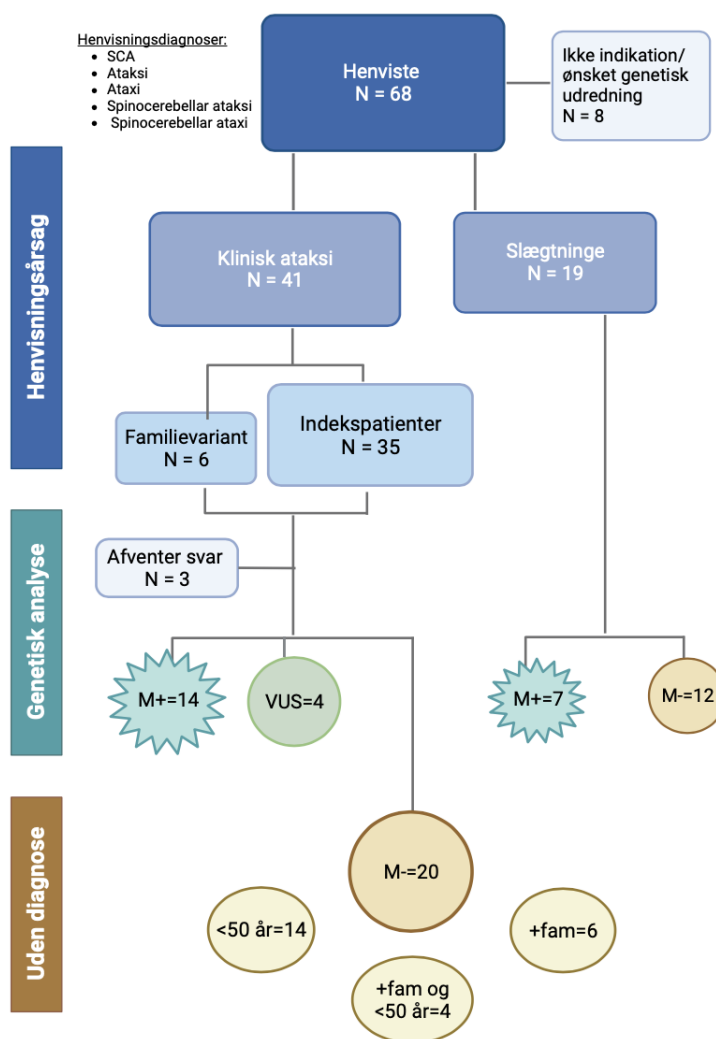
Kæde- og fritekstsøgning er ligeledes benyttet, da begreber og definitioner ved HA divergerer, samt veldefinerede søgeord ved de nyeste metoder mangles. Publicerede studier udgivet efter 2021 er tillagt størst vægt.

4 Resultater

4.1 Resultater del 1

4.1.1 Alle henviste

I perioden 01-01-2018 til 31-12-2022 blev 68 individer henvist til udredning for HA på KGA fordelt i 46 forskellige familier: 2/3 af patienter med klinisk ataksi og 1/3 slægtninge. Flowchart over populationen fremgår af figur 1.



Figur 1: Flowchart over alle henviste til udredning for hereditær ataksi i perioden 2018-2022. Familievariant: Klinisk ataksi og kendt HA-variant i familien. Indekspatienter: Klinisk ataksi. M+: påvist variant. M-: ikke påvist variant. <50 år: Symptomdebutalder under 50 år. +fam: Positiv familieanamnese. VUS: Variant af ukendt betydning jf. ACMG-klassifikationen [21]

4.1.2 Slægtninge

De 23 henviste slægtninge fordelte sig på 16 familier. Syv individer inden for 5 familier fik påvist en bærertilstand af en C5/C4-variant (SCA3, SCA5, Friedrich ataksi (FRDA), SCAR8 og Cokayne syndrom (karakteriseret ved bl.a. mikrocephali, væksthæmning og progressiv neurodegeneration [25]). Tre bærere med en AD-variant hhv. SCA3 (N=2) og SCA5 (N=1) var under 40 år, hvorfor udvikling af ataksi kan forventes.

4.1.3 Klinisk ataktiske individer

Efter indledende samtale fik 41 individer med klinisk ataksi genetisk undersøgelse (figur 1). Fænotypen var meget heterogen med rene cerebellare symptomer (gangataksi, dysatri, nystagmus mm.), samt sensorisk neuropati og diffuse billeder med tilhørende forsinket udvikling eller kognitiv påvirkning mm. Karakteristika fremgår af tabel 1. Hos indekspatienter med symptomdebut <50 år var en ikke-signifikant øget sandsynlighed for påvisning af en C4/C5-genvariant (OR=2,33 (0,24-23,04)). Der var ved positiv familieanamnese inden ingen signifikant øget sandsynlighed for påvisning af en C4/C5-variant (OR=0,55 (0,09-3,37)).

	Indekspatient med C5/C4-HA-variant N=6	Indekspatient med C5/C4 anden variant N=2	C5/C4 variant med familievariant N=6	VUS N=4	Ingen patogen variant N=20	Afventer svar på analyse N=3	I alt N=41
Mænd (%)	50,0	50,0	50,0	25,0	55,0	100	53,7
Symptomdebutalder (IQR) [år]	40 (16,9-63,9)	15 (-)	33 (25,5-40,5)	19 (7,9-30,1)	45 (33,8-56,3)	57 (-)	40 (29,3-50,8)
Debut < 50 år (%) [N]	5 (83,3)	2 (100,0)	6 (100,0)	4 (100,0)	14 (70,0)	1 (33,3)	32 (78,0)
Familieanamnese (%) [N]	2 (33,3)	0 (-)	6 (100,0)	2 (50,0)	6 (30,0)	2 (66,7)	18 (43,9)
Familieanamnese + debut < 50 år (%) [N]	1 (16,7)	0 (-)	6 (100,0)	2 (50,0)	4 (20,0)	0 (-)	13 (31,7)

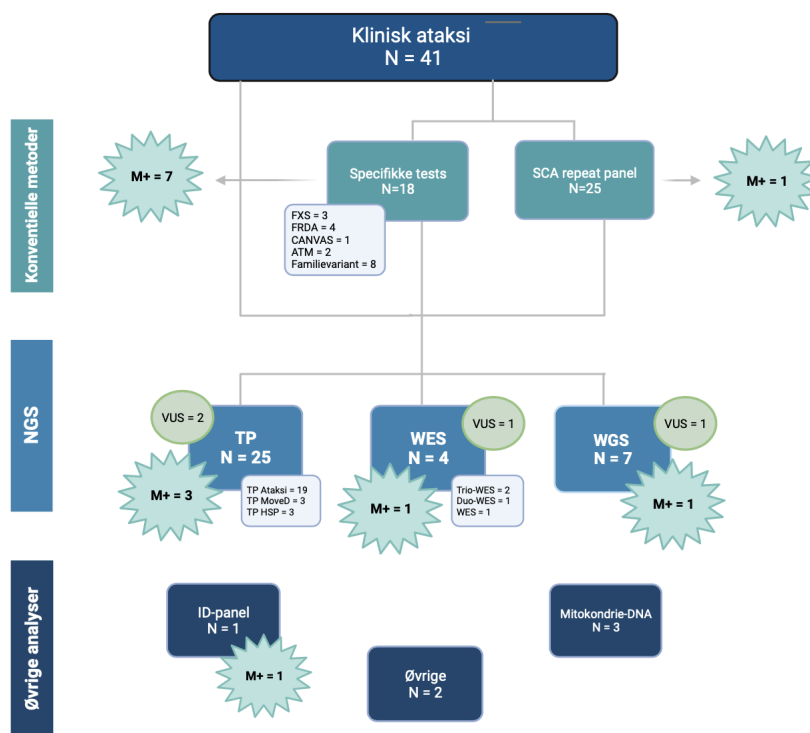
Tabel 1: Karakteristika af patienter med klinisk ataksi (N=41). C5/C4-HA-variant: C5/C4-genvariant relateret til en kendt HA-type. C5/C4 anden variant: C5/C4-variant relateret til anden neurologisk sygdom. VUS: Variant af ukendt betydning. Afventer svar på analyse: Indekspatienter, der afventer svar på genanalyse pr. 01-12-2023.

4.1.4 Anvendte genetiske analyser

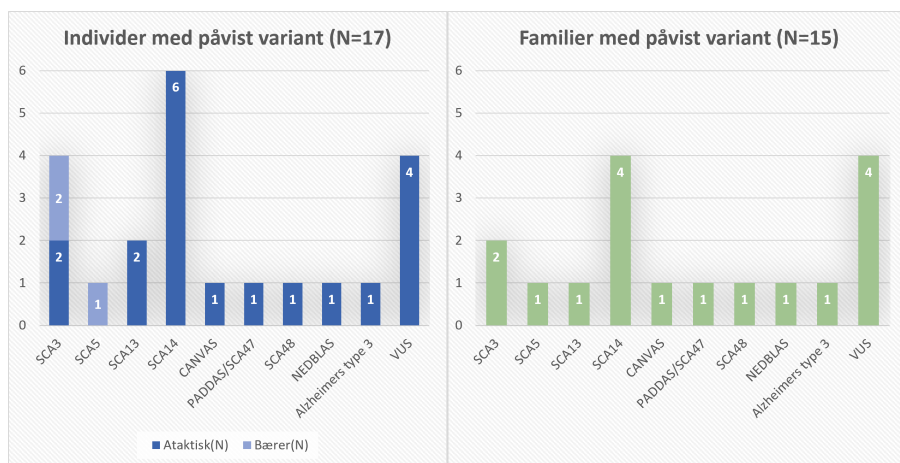
Anvendte genetiske analyser fremgår af figur 2. Fire-tyve personer (58,5%) fik foretaget mere end én analyse, hvor SCA-repeatpanel (45,5%, N=25) og TP (45,5%, N=25) var de hyppigst anvendte analyser. Prædiktiv test for familievariant (N=6), efterfulgt af TP (N=3) var de hyppigste test med påvisning af variant. Antallet af gener inkluderet i panelerne streg overordnet gennem studieperioden. TP og WES blev anvendt gennem hele perioden, og WGS blev efter introduktion i 2022 anvendt i stigende grad.

4.1.5 Påviste varianter

Tolv individer (29,3 %) inden for 10 familier fik påvist en C5/C4-variant svarende til en estimeret prævalens af HA på $2,02/10^5$ (CI 95% 1,04;3,53) af den nordjyske population. Fordeling af HA typer fremgår af figur 3 og påviste varianter af tabel 2). DY for påvisning af C4/C5-variant (både HA og anden sygdom) var 36,84 % (N=14) og yderligere 10,53% (N=4) for påvisning



Figur 2: Udførte og afventende genetiske analyser hos alle individer med klinisk ataksi henvist til KGA i perioden 2018-2022 (afventende: 3 WGS-analyser). SCA repeat-panel indeholder screening af SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 samt DRPLA. TP varerede fra screening af 13-573 gener afhængigt af årstal og laboratorie. FRDA: Friedrichs ataksi. FRAXE: Fragilt X-syndrom. CANVAS: Cerebellar ataksi, neuropati og vestibulær arefleks-syndrom. ATM: Ataxia telangiectasia. TP: Targeteret panel. HSP: Hereditær spastisk paraplegi. WES: Whole Exom Sequencing. WGS: Whole Genome Sequencing



Figur 3: Antal og fordeling af påviste patogene, formodet patogene og varianter af ukendt betydning henvist til KGA i perioden 2018-2022. Medtaget er både individer med klinisk ataksi samt bærere af autosomt dominante varianter. SCA=Spinocerebellar ataksi. CANVAS: Cerebellar ataksi, neuropati og vestibulær arefleks-syndrom. PADDAS/SCA47: Pumilio1-Associated Developmental Disability(OMIM:617931), Ataxia, and Seizure syndrome. NEDBLAS=Neurodevelopmental disorder with language delay and behavioral abnormalities, with or without seizures (OMIM:606228)

af en VUS. SCA14 var den hyppigst forekommende, både på individ- (N=6) og familieniveau (N=4), og to patienter fik påvist en C4-variant relateret til anden neurologisk sygdom. Jf. figur 2 blev SCA repeat-panelet udført i 62% af alle udredningerne (N=26), men kun diagnostisk i ét tilfælde (SCA3). Tre cases initielt screenet med NGS-panel fik påvist genvarianter ved efterfølgende hhv. WES (VUS og anden neurogenetisk sygdom) eller WGS (VUS). Varianten påvist ved WGS blev ikke undersøgt med WES først.

4.1.6 Omklassificerede varianter

Ingen påviste varianter er blevet omklassificeret jf. de overordnede ACMG-grupper. En C4-variant i AGO1 er koblet til navngiven fænotype: Neurodevelopmental disorder with language delay and behavioral abnormalities, with or without seizures (NEDBLAS).

Subtype	Arvegang	Alder, debut	Gen	cDNA variant	Protein variant	Zygositet	Klass.	Påvist ved (Lab., antal gener)
Hereditær cerebellar ataksi								
CANVAS	AD	K, 38	RFC1	AAGGG-ekspansion i intron 2		Funkt.Het	C5	RP-PCR
SCA3	AD	M, 65	ATXN3	14 og >60 CAG-repeats		Comp.Het	C5	SCA-repeat panel
SCA3	AD	K, 40	ATXN3	2 CAG repeats + normal-allel hos sønner. Indeks ikke testet		Het.	C5	PCR og sanger (prædiktiv test)
SCA13	AD	M, 3	KCNC3	c.1268G>A	p.Arg423His	Het	C4	TP Ataksi-panel (RH, 200)
SCA14	AD	K, 25	PRKCG	c.392G>A	p.Cys131Tyr	Het	C4	PCR+Sanger (prædiktiv test)
SCA14	AD	K, 31	PRKCG	c.392G>A	p.Cys131Tyr	Het	C4	Sanger (prædiktiv test)
SCA14	AD	M, 40	PRKCG	c.392G>A	p.Cys131Tyr	Het	C4	Sanger (prædiktiv test)
SCA14	AD	M, 35	PRKCG	c.392G>A	p.Cys131Tyr	Het	C4	Sanger (prædiktiv test)
SCA14	AD	M, 25	PRKCG	c.392G>A	p.Cys131Tyr	Het	C4	TP Ataksi-panel (RH, 81)
SCA14	AD	K, 42	PRKCG	c.424T>G	p.Cys142Gly	Het	C4	Sanger (prædiktiv test)
SCA48	AD	K, 45	STUB1	c.786+1G>A	? (splice donor)	Het	C4	TP Ataksi-panel (Blueprint, 157)
SCA47/PADDAS	AD	M, 0	PUM1	c.3375C>G	p.Tyr1125	Het	C4	TP ID-panel
Anden neurologisk sygdom								
NEDBLAS	AD	M, 0	AGO1	c.569T>A	p.Leu190Gln	Het	C4	Trio-WES
AD3	AD	K, 30	PSEN	c.1141C>T	p.Leu381Phe	Het	C4	TP HSP-panel
Variant af ukendt betydning (VUS)								
VUS	AD	K, 13	CCDC88C	c.3902A>G	p.Asp1301Gly	Het	C3	TP Ataxi-panel (RH, 81 gener)
VUS	AD	K, 23	SPAST	c.1735A>C	p.Asn579His	Het	C3	TP HSP-panel (RH, 81 gener)
VUS	AD	M, 40	RBM4B	c.322_323dup GA	.Asp108Glufs*4	Het	C3	Duo-WES
VUS	AR	K, 15	COQ8A	c.1826T>C	p.Leu609Pro	Hom.	C3	WGS

Tabel 2: Påviste varianter hos individer med ataksi (N=41). C5: Patogen. C4: Formodet patogen. VUS/C3: Variant af ukendt betydning.

4.1.7 Klinisk ataktiske uden forklarende variant

Tyve individer med klinisk ataksi (52,6 % af færdigundersøgte) blev screenet uden fund af forklarende molekulærgenetisk variant. Seks fik påvist tilfældighedsfund ifa. AR-variant i heterozygot form eller variant uden klinisk betydning grundet raske familiemedlemmer med bærer af samme variant. Fire patienter havde en sygdomsdebut <50 år samt en familieanamnese med bevægeforstyrrelser (tabel 3 for karakteristika).

	Køn, alder	Henvissnings-år	Sygdomsdebut	Cerebellum atrofi	Genetiske analyser					Ikke-forklarende rapporterede fund	Klassifikation	Arvegang
					SCA panel	Specifik test	TP (lab, antal gener)	WES	WGS			
Pt1	K, 52	2019	45	Ja	x		x (Kennedy, 200)					
Pt2	K, 55	2022	45	Ja	x		x (Blueprint, 257)					
Pt3	M, 53	2020	45	Nej	x		x (RH, 203)			AARS2: c.1774C>T, p.Arg592Trp i heterozygot form	CS	AR
Pt4	M, 69	2018	48	Nej	x		x (CeCat, 158)			CLCN2: c.1041_1044delGGTG; p.Val348Cysfs*12 i heterozygot form	VUS	AR
										AP451: c.431delG; p.Gly144Aspfs*30 i heterozygot form	VUS	AR

Tabel 3: Individer uden molekulærgenetisk diagnose og sygdomsdebut < 50 år (N=14) samt positiv familieanamnese. RH: Region Hovedstaden.

4.2 Udvikling til molekulærgenetiske metoder målrettet HA

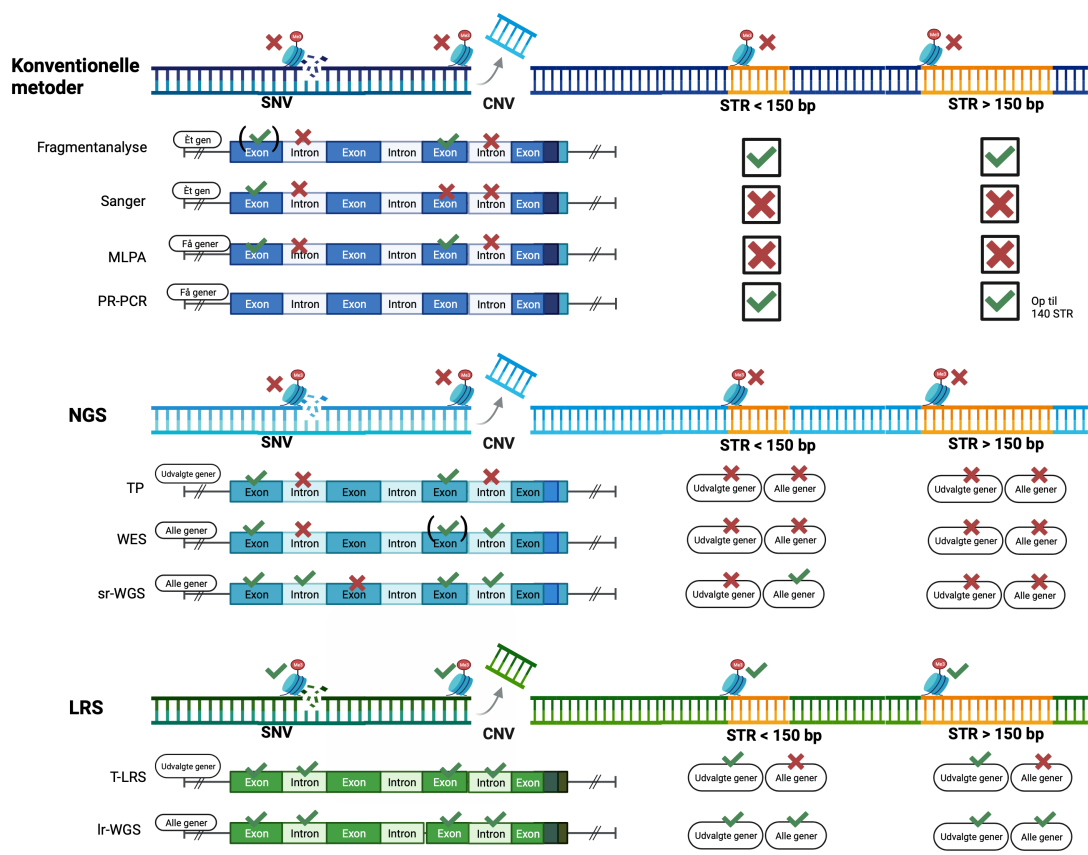
Molekulærgenetiske metoder til anvendelse ved HA har udviklet sig med bredere dækning og præcision [3]. Metoderne kan overordnet opdeles i tre 'generationer', hvor der under hver generation forekommer specifikke metoder. Figur 4 og tabel 4 giver et samlet overblik over 'generationerne', mens tabel 5 sammenligner de forskellige metoders muligheder og begrænsninger. Den største ændring mellem de konventionelle metoder og NGS beror på antallet af gener, der analyseres ad gangen (through-put) [17]. NGS er nu udbredt i klinisk praksis, og særligt short read WGS (sr-WGS) er god til detektering af patogene SNV- og CNV-varianter [14]. Ved brug af specifik software, ExpansionHunter, kan fravær af ekspansioner fastslås samt detekteres ekspansioner op til 150 bp. Antallet af STR ved HA overskrider dog hyppigt denne længde. Med repeatlængde over 150 bp skal analysen altid opfølges af PCR-analyse for at kunne kvantificere repeatlængden [26]. Konventionelle metoder er på nuværende tidspunkt derfor er den eneste sikre måde at detektere STR. Sammenligning af de forskellige NGS-metoder hhv. TP, WES og sr-WGS fremgår af tabel 5b.

Da teknikkerne konstant udvikles, er der på nuværende tidspunkt meget få studier om metodernes anvendelighed ved HA [3]. Den mest hensigtsmæssige screeningsstrategi er derfor vanskelig at fastslægge, men for nuværende er PCR er god til screening af de hyppigste STR-varianter og prædiktiv diagnosticering, hvorimod NGS er førstevalget ved HA ikke forårsaget af ekspansioner (SNV eller CNV) [13].

Den tredje og nyeste 'generation' er LRS, der kombinerer detektering af de lange sekvenser med omfattende genanalyse. LRS kan anvendes enten targeteret (T-LRS) eller som helgenomsanalyse (lrWGS) (tabel 5c). LRS anvendes fortsat alene på eksperimentielt plan, men foreløbige studier viser mulighed for sekventering af STR op til 200 kb (med PacBio) med høj præcision [27]. LRS tillader yderligere mulighed for simultan måling af epigenetiske modifikationer (promotormethyleringer), en endnu uafdækket men formodet genetisk ætiologi for en del af de uafklarede HA [15, 11].

Supplerende metoder til måling af ekspansioner, som kan bruges selvstændigt [18] eller i kombination med LRS, er sideløbende under udvikling [27]. Eksempelvis Optical Genom Mapping

(OGM) som et simplere og mere præcist alternativ til fragmentanalyse (tabel 5a) til visualisering af specifikke lange STR (fx CANVAS med STR i *RFC1*-genet)[28].



Julie Vogel Kolte

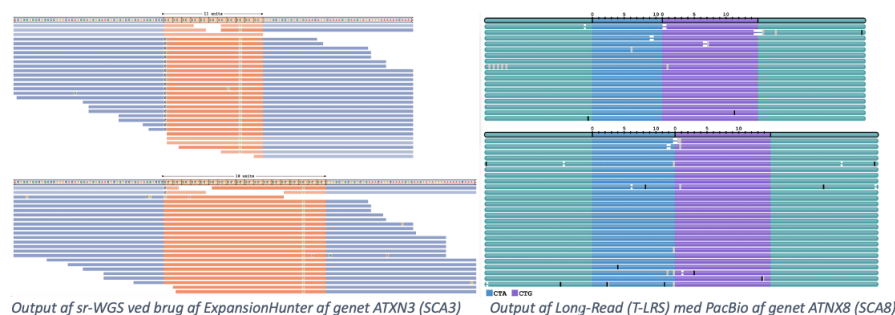
Figur 4: Overblik over molekylærgenetiske metoder til repeats og screening af ikke-repeat hereditær ataksi. MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. RP-PCR: Repeat-Primed Polymerase Chain Reaction. NGS: Next Generation sequencing. TP: Targeteret panel. WES: Whole Exome Sequencing. sr-WGS: Short-read Whole Genome Sequencing. LRS: Long-Read sequencing. T-LRS: Targeteret-Long-Read-Sequencing. lr-WGS: Long-Read Whole Genome Sequencing. SNV: Single-nucleotid-variation. CNV: Copy-Number-Variation. STR: Short tandem repeat. Exon: Kodende regioner af genomet. Introns: Ikke-kodende regioner af genomet.

4.2.1 Visualisering af output med sr-WGS og LRS

Af figur 5 fremgår det visuelle output af hhv. sr-WGS analyser med brug af Expansionhunter og LRS, som tolkes af laboratoriet.

Molekylærgenetiske metoder					
	Metoder	Beskrivelse	Muligheder	Begrænsninger	Anvendelse ved HA
Konventionelle metoder	Fragment-analyse Sanger-sekventering MLPA RP-PCR Se mere 7a	Analyse af en/ flere forudbestemte kandidatgener med manuelle metoder	Høj præcision -Hurtig analyse til lav pris -Integreret i næsten alle genetiske laboratorier	-Kan kun sekventere ét/få veldefinerede kandidatgener -Low-throughput: Tidskrævende og dyrt per prøve i forhold til NGS -Risiko for sekventeringsfejl, især ved lange repeat-sekvenser og med højt CG-indhold -Kan ikke identificere mosaiktilstande -Kan ikke give information om epigenetiske modifikationer	-Screening af de hyppigste former for STR-HA samt DRPLA -Prædiktiv test af familievariant eller segretningsanalyse -Validering af varianter fundet ved NGS
NGS	TP WES sr-WGS Se mere 7b	Massiv parallelsekventering af mange gener samtidigt af sekvenser op til 150 bp	-High-throughput: Kan analysere mange gener samtidigt til lav pris per prøve -Kan detektere SNV, indels, CNV og STR <150 bp i hhv: - TP: Udvalgte gener - WES: Alle exons - WGS: Alle exons og introns	-Kan ikke sekventere STR>150 bp -Kan ikke detektere 'dark regions' fx pseudogener eller komplekse SV'er -Kan ikke give information om epigenetiske modifikationer -Tillader ikke fasing af homologer -Variantfortolkning afhængig af validt referencegenom. Forsat problematisk ved især introns	-Screening for ikke-STR varianter (såsom SNV eller CNV)
LRS	T-LRS lr-WGS Se mere 7c	Massiv parallelsekventering af mange gener samtidigt af sekvenser op til 200 kb	- Kan sekventere DNA-fragmenter >200 kb (med PacBio) -Formodentlig NGS overlegen ift. detektering af SNV, indels og CNV -Kan analysere 'dark regions', fx lange STR, pseudogener og komplekse SV'er -Kan sekventere fragmenter med højt CG-indhold -Giver simultant information om epigenetiske modifikationer -Tillader fasing og kan give information om cis- eller transkonfiguration -Hurtigere analyse end NGS	-Ukendt kliniske relevans: Kun testet eksperimentielt på små, selekterede populationer -Evidens om diagnostiske merværdie ift. øvrige metoder mangles -Validt referencegenom mangles. -Pipelines ændres hurtigt -Dyrere og yderligere omkostningstung ift. databearbejdning end sr-WGS	-Negativt resultat efter SCA repeat-panel og fortsat mistanke om STR (fx pga. ataksi med debut i tidlig alder eller tegn på anticipation i familien) -Grundforskning: Fx opdagelse af nye STR og betydning af methyleringer -Gør muligvis gentagende testning overflødig: Kombination af MPS med detektion af klinisk relevante STR med én enkelt test

Tabel 4: Samlet oversigt over de tre 'generationer' af molekylærgenetiske metoder til repeats og screening af ikke-repeat hereditær ataksi. MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. RP-PCR: Repeat-Primed Polymerase Chain Reaction. NGS: Next Generation sequencing. TP: Targeteret panel. WES: Whole Exome Sequencing. sr-WGS: Short-read Whole Genome Sequencing. LRS: Long-Read sequencing. T-LRS: Targeteret-Long-Read-Sequencing. lr-WGS: Long-Read Whole Genome Sequencing. SNV: Single-nucleotid-variation. CNV: Copy-Number-Variation. Indels: deletioner/insertioner. STR: Short tandem repeat. Exon: Kodende regioner af genomet. Introns: Ikke-kodende regioner af genomet. CG-indhold: Nukleotiderne C og G. DRPLA: Dentatorubral-pallidolysial atrofi. Kilder: [3, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36],



Figur 5: Visuelle output af ekspansionsanalyser med hhv. sr-WGS m. ExpansionHunter og LRS (PacBio). Venstre: Sekventeringsdybden (antallet af reads) og et estimat af repeatlængden med ExpansionHunter-analyse af genet ATXN3 i de to alleler fremgår af det genererede visuelle output. Ved tilstrækkelig dybde kvantificeres repeatlængde (<150 bp) pba. data om repeatlængde og konfidensinterval. Højre: Repeatlængde og sekventeringsdybde med LRS-analyse med PacBio af genet ATXN3 fremgår af det visuelle output til højre. Med LRS kan repeatlængden direkte aflæses af det visuelle output. LRS er fortsat under testning på AfMD, og data er ikke fremkommet.

A: Konventionelle metoder					
Fragment-analyse	Southern Blotting	Kan detektere tilstedeværelsen og længden af en ekspansion/patogen variant i det undersøgte gen	-Kan visualisere længden af den forlængede allel i tilfælde, hvor PR-PCR fejler	-Kræver store mængder af højkvalitets-DNA -Sekventerer ikke. Måler kun tilstedeværelsen af en bestemt sekvens -Meget low-throughput: Omkostningstung og ineffektivt per prøve	-Prædiktiv test af lange repeatekspansioner (fx CANVAS)
Sanger-sekventering	PCR	Sekventerer nukleotiderne i et forudbestemt kandidatgen af kortere længde	-Præcis og effektiv til sekventering af et veldefineret kandidatgen -Mest effektive metode til at verificere en variant	-Kræver amplificering og dermed risiko for sekventeringsfejl, især ved lange sekvenser med højt CG-indhold -Kræver analyse af hvert locus enkeltvis	-Prædiktiv test af kendt familievariant Forældreundersøgelse af en specifik variant (segregationsanalyse) -Prædiktiv test for variant med forudkendt viden om detekt gen (fx pba, biokemisk screening)
MLPA	Multipleks PCR i kombination med probe hybridisering	Detekterer CNV'er i specifikke gener	-Kan identificere deletioner og duplikationer i specifikke regioner -Kan detektere flere loci på én gang	-Kan kun sekventere et lille begrænset antal kandidatgener	-Detektering af HA-varianter forårsaget af CNV fx SCA15 m.fl.
RP-PCR	Specialiseret PCR	Kan detektere og kvantificere repeatekspansioner i det undersøgte gen	-Hurtig og simpel analyse med høj specificitet -Sekventerer længere sekvenser end ved standard fragmentanalyse -Tilstrækkelig og kost-effektiv til detektion af STR i kendte gener	-Kan kun detektere den præcise længde op til 140 STR. Længere kræver fragmentanalyse	-SCA repeat-panel: Screening af de hyppigste former for SCA og DRPLA -Detektering af STR op til ca. 140 repeats
B: 'Next Generation Sequencing'					
TP	Targeteret panel	Sekventerer korte sekvenser i et veldefineret panel	- Kan detektere SNV, indels og CNV -Høj målretning: Bedre gendækning af det undersøgte område end WES/WGS -Hurtigere analyse end ved WES/WGS -Nemmere at variantfortolke end ved WES/WGS	-Risikerer at overse anden monogenetisk ætologi, som ikke er inkluderet i panelet -Gener inkluderet i panelet varierer mellem de enkelte laboratorier -Risikerer at overse væsentlige varianter af betydning for fænotypen, enten monogene eller risikogener	- Ikke STR-varianter inkluderet i specifikke ataksipaneler
WES	Helxom-sekventering	Massiv parallel-sekventering af alle exons	-Kan give god screening af næsten alle gener relateret til kendte patogene varianter -Kræver ikke forudbestemmelse af kandidatgener -Giver mulighed for reanalyse -Mere omkostningseffektiv end sr-WGS	-Svære at variantfortolke end ved TP, især missensevarianter -Begrænset information om CNV -Ingen information om introns og regulatoriske områder -Laboratoriets variantrapportering afhænger af laboratoriets viden om den pågældende fænotype -Kræver længere analysetid end TP	-Fortsat uafklaret efter TP og mistænkt ikke STR-HA -Mistænkt de novo-variant (kræver trioanalyse) -Opdagelse af nye patogene varianter, som ikke er med i TP (bør kombineres med trioanalyse)
Sr-WGS	Helgenom-sekventering af korte sekvenser	Massiv parallel-sekventering af både exons og introns	-Kan i teorien screene alle exons, introns og regulatoriske regioner for patogene varianter -Kan detektere STR og CNV i kodende regioner mere overlegent end WES -Kan troværdigt detektere STR < 150 bp -Undgår gentagne testning med diverse targeterede paneler	-Klinisk tolkning af fleste intronvarianter fortsat begrænset -Større risiko for at overse mosaicisme pga. generelt lavere dækning end ved WES -Problematiske til detektering af 'dark' genes' fx pseudogener og komplekse SV'er -Mere omkostningstung ift. databehandling end ved WES/TP -Dyrere end WES/TP	-Fortsat uafklaret efter WES, fx pga. mistænkt patogen SNV eller CNV i ikke-kodende eller regulatoriske regioner -Ved delvist afklaret svar ved WES (hvor WGS kan give en mere komplet dækning af regionen)
C: 'Long-Read Sequencing'					
T-LRS	Targeteret Long-Read sekventering	Sekventering af sekvenser op til 200 kb i højprioriterede områder (udvalgt med hybridisering eller CRISPRCas9)	-Kan detektere STR >200 kb i kandidatgenerne -Kan screene kandidatgener i 'dark regions' bedre end srWGS -Større sekventeringsdybde end ved Ir-WGS -Billigere end Ir-WGS -Simplere datafortolkning end ved Ir-WGS	-Kræver identifikation kandidatgener, som ønskes undersøgt -Risikerer at overse anden monogenetisk ætologi, som ikke er inkluderet i panelet -Risikerer at overse væsentlige varianter af betydning for fænotypen, enten monogene eller risikogener -Mister muligheden for at analysere (promoter) methyleringsstatus -Meget lange STR er vanskelige at sekventere og aligne korrekt	-Custom-made Repeat-panel til detektion af lange STR i 47 gener relateret til kendt patogen STR-variant (fra PacBio) "Dark genes"-panel, som kan detektere SNV, indels og CNV i 389 problematiske detekterbare gener, som ikke dækkes med NGS
Ir-WGS	Helgenom-sekventering af lange sekvenser	Sekventering af sekvenser op til 200 kb i både introns og exons	-En enkelt analyse, som giver den hidtil mest komplekse dækning af genomet -Kræver ikke identifikation af targets -Giver mulighed for at opdage nye varianter, som ikke er inkluderet i T-LRS	-Dyrere end T-LRS -Meget komplekst ift. databearbejdning -Variantfortolkning meget vanskelig -Stort set ingen evidens om den diagnostiske merværdig	-Identificere nye varianter -Grundforskning: Undersage betydningen af methyleringer og sammenspillet mellem mange præmuterede gener samtidigt (risikogener)

Tabel 5: **A:** Sammenligning af de forskellige konventionelle metoders muligheder og begrænsninger. Tabellen fokuserer på sammenligning af de fire primære metoder anvendt ved screening for og verificering af HA: Fragmentanalyse, Sangersekventering, MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) og RP-PCR (Repeat-Primed Polymerase Chain Reaction). For sammenligning af konventionelle metoder generelt med øvrige metoder henvises til tabel 7. **B:** Sammenligning af de forskellige NGS-metoders muligheder og begrænsninger. Tabellen fokuserer på sammenligning af de tre primære metoder Targeteret panel (TP), Whole Exome Sequencing (WES) og Whole Genome Sequencing (WGS). For sammenligning af NGS generelt med øvrige metoder henvises til tabel 7. Trioanalyse: WES af afficeredes exom med forældrenes exomer som positive kontroller. **C:** Sammenligning af de forskellige LRS-metoders muligheder og begrænsninger. Tabellen fokuserer på sammenligning af de to primære metoder Targeteret-Long-Read-Sequencing (T-LRS) og Long-Read Whole Genome Sequencing (Ir-WGS). For sammenligning af NGS generelt med øvrige metoder henvises til tabel 7. Kilder: [3, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36],

5 Diskussion

Dette retrospektive kohortestudie af patienter med ataksi henvist til udredning for mistænkt monogenetisk ætiologi i perioden 2018-2022 viste en lav DY på 36,83% ved de anvendte genetiske tests. Trods screening med de tilgængelige metoder, forblev halvdelen uden en molekulærgenetisk diagnose. Fire udiagnosticerede individer havde positiv familieanamnese og symptomdebutalder < 50 år, hvorfor der kan mistænkes monogenetisk årsag. Systematisk litteraturgennemgang af molekulærgenetiske metoder i udvikling viste, at LRS formår at kombinere detekteringen af lange ekspansioner (STR) med omfattende genombaserede analyser, som ikke er muligt med de nuværende metoder. Derfor kan LRS formodes at bidrage til en diagnostisk merværdi ved HA.

5.1 Del 1

5.1.1 Prævalens

Den estimerede prævalens af HA på 2,02/100.000 er i overensstemmelse med litteraturen. Et ældre, men eneste systematisk review, om HA-prævalensen fra 2014, fandt en prævalens af AD-HA på gennemsnitligt 2,7/100.000 (1,5–4,0/100.000) og AR-HA 3,3/100.000 (1,8–4,9/100.000), samt at der forekom en lavere prævalens i studier med patienter rekvireret fra genetiske afdelinger (1,6-2,5/100.000) [9]. Studierne stammer dog fra en periode, hvor genetisk screening var mindre udbredt, og mange HA-typer ikke klassificeret. SCA47/PADDAS, SCA48 og CANVAS er fx alle identificeret inden for de seneste fem år [8, 3]. Det bedst samlignelige nordiske studie fra 2019 fastlagde en højere prævalens (6,0/100.000), men sammenligning vanskeliggøres af inklusion af patienter fra både sygehussektor og privatpraktiserende neurologer i studiet [37].

5.1.2 Diagnostic yield, DY

Lav DY ved HA er velkendt, og nyligst publicerede systematiske review med NGS-undersøgte ataksipatienter påviste en overordnet DY på 43% (IQR=9,5-100%)[7]). En lavere DY forekom ved uselekterede kohorter med formodet AD-arvegang (30,5%), samt screening for de hyppigste former for STR-NGS før NGS (37,7%). Det kan indikere, at HA forårsaget af sjældnere former for STR-HA ikke påvises med de nuværende metoder.

I et sammenligneligt studie ift. kohortekarakteristika (køn, alder og symptomer), hvor 377 italienske ataktiske patienter blev undersøgt med TP, var en DY på 33,2% [30]. Væsentlige forskellene er, at Galatolo et al. [30] udelukkende inkluderede symptomatiske indekspatienter og prospektivt analyserede med NGS, mens enkelte patienter her blev undersøgt alene med SCA repeat-panelet. Omvendt er DY i indeværende studie hovedsageligt et resultat af prædiktiv testning, hvilket ikke forekom ved Galatolo et al. [30].

5.1.3 Fænotype, screeningsstrategi og fordeling af HA-typer

Populationen udviste en meget heterogen fænotype med både isoleret ataksi samt symptom- og genotypeoverlap med andre neurologiske sygdomme. Det viser vanskeligheden med at erkende

fænotypen klinisk, som rapporteres i litteraturen [1]. Den mest udbredte screeningsstrategi både i dette og tidligere studier var initiel screening for de hyppigste SCA-typer (med SCA repeat-panel, tabel 5a) og ved negativt resultat opfølgning med mere omfattende NGS-analyser (tabel 5b)[7]. TP blev anvendt langt overvejende og var den hyppigst diagnosestillende analyse, men ikke tilstrækkelig for at stille diagnosen i to tilfælde, hvor hhv. WES/sr-WGS var nødvendig. Ved formodet AD-arvegang blev samtlige screenet med SCA repeat-panel før evt. NGS udrullet. Enkelte patienter med formodet AR-variant blev analyseret med NGS som førstevalg, grundet større sandsynlighed for ikke-STR-variant ved denne arvegang [13]. I dette og lignende studie blev påvist varianter med både AD- og AR-arvegang [30], og flere udiagnosticerede patienter fik påvist en patogen AR-variant i heterozygot form. Der beskrives i litteraturen dårlig sammenhæng mellem formodede arvegang og genotype [8], hvorfor det er problematisk at udvælge metoderne ud den formodede arvegang [13]. STR-HA hos et individ med negativ familieanamnese kan skyldes et præ-muteret antal STR, der gennem anticipation udløser ataksi i næste generation [14],

Forekomsten af de hyppigste typer STR-HA var lav [10, 5], selvom næsten samtlige blev undersøgt med SCA-repeat panelet. Et større studie med 1489 kinesiske ataksipatienter viste en stor andel af disse STR-HA[38], men under halvt så stor i et lignende fransk studie[39]. Det kan indikere, at sensitiviteten af SCA-repeat panelet er høj, men forekomsten lav i den nordjyske population. Der forekom stor genetisk variation blandt ikke-STR-HA typer, og tilstedeværelsen af heterogene genotyper genfindes i en lang række sammenlignelige studier med anvendelse af NGS [30, 7]. Der blev påvist stor andel af flere forholdvis sjældne, fx SCA14, hvilket kan være udtryk for den formodede foundereffekt [8]. På verdensplan udgør SCA14 under 1% [40], men er den hyppigst forekommende variant blandt den nordjyske population, hvilket kan skyldes store familier. SCA14 forekom dog i fire forskellige familier og med to forskellige varianter i *PKKCG*-genet (tabel 3).

Der blev påvist VUS i 10,53%, hvilket er i overensstemmelse med øvrige HA-studier [30]. Inden for neurogenetikken ses en generelt en høj forekomst af VUS, samt at mange gennem de seneste 8 år er blevet omklassificeret [41]. Omfattende genanalyser medfører en indbygget øget sandsynlighed for påvisning af VUS, særligt ved sjældne tilstande som HA [16]. En enkelt variant blev koblet til en ny veldefineret fænotype i OMIM. I takt med nye typer opdages, er jævnlig gennemgang af tidligere påviste VUS relevant [18]. Galatolo et al. [30] supplerede samtlige VUS med undersøgelse af raske slægtninge (trioanalyse med WES som muliggør yderligere filtrering, tabel 5b). Dermed kunne en del af de påviste VUS op- eller nedklassificeres, og andelen faldt fra 24,3% til 15,6%.

5.1.4 Patienter uden påvist molekylærgenetisk diagnose

SCA repeat-panel og TP blev anvendt ved de fire udiagnosticerede patienter med positiv familieanamnese og tidlig symptomdebutalder men ikke fulgt op af ikke-targeteret NGS, hvilket

kan skyldes, at 3/4 af patienterne blev udredt inden WGS var muligt på KGA. En stor andel af patienter med WGS-analyse fik omvendt flere tilfældighedsfund påvist. Hvorvidt disse patienter bør få udført WGS inden evt. LRS bliver mulig, kan der derfor være både argumenter for og imod.

5.1.5 Styrker og svagheder

En af studiets styrker er en uselekeret kohorte med inklusion af alle patienter henvist til KGA Aalborg i perioden 2018-2022 med mistænkt HA, og er det første danske studie over outcome af de molekylærgenetiske udredninger. Udtræk af studiepopulationen pba. henvisningsdiagnoser har skabt den størst mulige sandsynlighed for inddragelse af alle fortsat uforklarede tilfælde, samt at kohorten er uselekeret på tværs af alder og formodet arvegang. Den systematiske opfølgelse af alle anvendte genetiske analyser har gjort det muligt at vurdere outcome af hver enkelt analyse, samt hvordan evt. tidligere udførte analyser overså en bestemt variant. Det giver sammenholdt med viden om nyeste sekventeringsmetoder indtryk af, hvilke screeningsstrategier der kunne være relevante at benytte på KGA.

En væsentlig svaghed er, at studiet ikke inkluderede patienter henvist under anden mistænkt tilstand, men hvor udredningen påviste HA. Det er grundet det store fænotypiske overlap med øvrige neurologiske sygdomme et realistisk scenarie [6]. At gennemgå journaler og analyser på samtlige patienter udredt på KGA med neurologiske symptomer mhp. at finde HA-suspekter beskrivelser er dog uden for dette studiets rammer. Prævalensen er sandsynligvis et underestimat, da studiet kun inkluderer individer henvist til KGA for udredning og ikke samtlige patienter i regionen. Udtræk af patienter på baggrund af ICD-10-diagnosticeret HA på tværs af hele sekundærsektoren kunne imødekomme dette. Endeligt var det grundet den begrænsede tidsperiode ikke muligt at inkludere indekspersonen for alle familier, hvilket hæmmer muligheden for at vurdere screeningsstrategien til fulde.

5.2 Del 2

5.2.1 Nuværende molekylærgenetiske metoder

Diagnosticeringen af HA afhænger af de anvendte genetiske metoder, da ingen af de nuværende molekylærgenetiske analyser selvstændigt er tilstrækkelig til screening for samtlige typer HA (jf. figur 4 og tabel 4). Valget af den/de rette analyser i det enkelte tilfælde derfor essentiel for at kunne stille den rette diagnose.

SCA repeat-panel (tabel 5a) er en hurtig og præcis screening for de hyppigste STR-HA typer, og trods den ofte lave DY er der konsensus om at anvende testen i den initiale genetiske diagnostik [13, 6].

NGS (tabel 5b) kræver et valg mellem TP, WES eller sr-WGS, hvor WGS anvendes i stigende grad frem for TP [18]. Ved screening af HA er valget af metode dog stadig genstand for diskussion [42, 3, 13, 16].

TP har for nuværende en DY på højde med WES [7] og giver en bedre gendækning af de undersøgte område [16]. Omvendt er der større risiko for at overse særligt de-novo og ultra-sjældne varianter end ved WES/WGS. Selvom de-novo-varianter er sjældne [7], forekom de både i dette og tidligere studier [30]. Det enkelte laboratorie definerer generne inkorporeret i panelet, og sufficient brug af TP forudsætter, at panelet opdateres i takt med opdagelsen af nye HA-varianter [17]. Risikoen for at overse anden kausal monogenetisk årsag ikke inkluderet i panelet er ligeledes øget ved brug af TP [16], hvilket kan være problematisk grundet det fænotypiske overlap [1].

WES har fordelen ved at være ikke-targeteret og screener alle kodende regioner for varianter med relation til monogenetisk ætiologi. På nuværende tidspunkt er ved WES opbygget et forholdvis validt referencegenom til fortolkning af mange varianter. Analysen giver yderligere mulighed for reanalyse [18] og trioanalyse, som er effektiv til variantfortolkning ved HA [13] og reklassificering af VUS [41].

WGS udbygger WES med muligheden for at screene genvarianter i introns [16], og analysen er WES overlegen ift. detektering af CNV'er og kortere STR (under 150 bp) i kodende regioner [33, 26]. Den diagnostiske merværdi ved WGS er dog for nuværende begrænset i klinisk praksis, da det er vanskeligt at tolke langt de fleste intronsvarianter [18]. Tiltagende brug af WGA er ved at forbedre variantdatabaserne, men der mangler flere større systematiske studier, der evaluerer brugen af WGS ved HA [3, 7]. Ingen NGS-analyse formår at detektere ekspansioner over 150 bp [14], øvrige svære detekterbare områder, såkaldte "dark regions" (SV'er, pseudogener mm) [29], samt epigenetiske modifikationer [27]. Det er problematisk ved STR-HA [14].

5.2.2 Fremtidige perspektiver for genetisk udredning af HA

Udfordringen med at detektere STR-HA med NGS kan være medvirkende forklaring til, at fire patienter trods mistanke om monogenetisk STR-HA, ikke fik påvist en genetisk ætiologi. Samlet set forblev halvdelen af ataktiske patienter uden molekulærgenetisk diagnose, hvilket på linje med litteraturen indikerer, at en anseelig andel af HA er genetisk udiagnosticeret [3, 7]. Dette kan skyldes flere årsager, og der vurderes at være særligt fire fundamentale udfordringer, som skal forbedres: 1) Vanskeligheder med at erkende af fænotypen, 2) Mangelfuld evidens om den genetiske basis bag HA, 3) Utilstrækkelige metoder til detektion af ekspansioner, 4) Variantfortolkningsproblemer pga. fænotypisk heterogenicitet, komplekse arvegegne og lav prævalens.

1) Bedre erkendelse af fænotypen: De rette tentative diagnoseovervejelser er på nuværende tidspunkt forudsætningen for al diagnostik af HA. En HA-diagnose er tidligere på KGA fremkommet ved screening for anden mistænkt tilstand, og flere patienter med ataksi fik stillet en anden neurologisk diagnose i dette studie. Bedre og mere veldefinerede udredningsalgoritmer i det kliniske undersøgelsesrum er en nødvendighed at kunne erkende fænotypen ved HA og andre neurologiske sygdomme mere sufficient [13]. Om det vil medføre et behov for en helt ny klassifikation af sygdomsgrupper inden for neurologien, vil fremtiden vise.

2) Bedre forståelse for genetikken bag HA: Evidens omkring genotypen ved HA kan fortsat udbygges, og med helgenoms-LRS (lr-WGS, figur 4 og tabel 5c) er det teknisk set muligt at screene for samtlige STR og komplicerede regioner (pseudogener, dark genes og lign.) - også i hidtil ukendte gener [27]. LRS tillader yderligere måling af methyleringsstatus simultant, og eksplorativ brug af lr-WGS kan sandsynligvis bidrage med opdagelse af nye STR-HA typer [34]. STR er ofte hypermethylerede, som kan medføre et manglende/defekt genprodukt[33]. Studier indikerer, at methyleringsstatus målt med LRS muligvis kan bidrage med klinisk merværdi til forklaring af fænotypen [32, 27]. Viden om den kliniske betydning af epigenetiske modifikationer er dog stadig på et grundforskningsstadium[43, 27].

3) Bedre detektering af STR: Nuværende teknikker formodes at underdiagnosticere HA [14], da klinikeren skal vælge specifikke konventionelle tests for de enkelte/få STR med risiko for at overse mange typer STR-HA. En ataktisk patient med negativ sr-WGS analyse fik efterfølgende påvist CANVAS med specifik RP-PCR ifm. genetisk udredning på KGA Aalborg uden for dette studiets kohorte. LRS indikerer lovende resultater til detektion af kendte og nye repeatekspansioner [33] (tabel 4), og med LRS som førstevalg, havde risikoen for at overse tilstanden været elimineret. AfMD er ved at udrulle targeteret LRS (T-LRS, tabel 5c) til STR og udviklet et repeat T-LRS som screener 47 kendte gener relateret til repeattilstande, som det tidligere kun var muligt at kvantificere tilstrækkeligt med PCR [14]. T-LRS formodes at overflødigøre gentagende testning samt minimere risikoen for at overse andre STR-varianter, men som ved TP afhængig af, at panelerne konstant holdes ajour [32]. Andre STR-detekterende metoder som OGM er under udvikling, og der pågår udvikling inden for såkaldt 'multiomic' tilgange, hvor genetisk screening anvendes i kombination med viden om patientens methylo, transkriptom eller metabolisk status [18].

4) Mere validt referencegenom til variantfortolkning: For at få betydning i klinisk praksis, kræves sufficient varianttolkning af den påviste molekyler patogen variant/STR. Manglen på validt referencegenom vurderes på nuværende tidspunkt at være den største begrænsende faktor ved LRS, da der kun er testet på små selekterede populationer, og pipelines konstant ændres[34]. Det giver yderligere udfordringer ved tolkning af VUS og ikke-kodende varianter end tilfældet er med NGS [33]. Store projekter med kortlægning af den normale humane genetiske variation, samt databaser med indberetning af fundne varianter hos syge individer[21] har været forudsætningen for, at variantfortolkningen ved NGS er blevet forbedret [34]. Der er brug for lignende store populationsstudier med raske kontroller og systematisk datadeling af fundne varianter hos afficerede individer til opbygning af et validt referencegenom ved LRS [32, 34, 18]. I dag er langt hovedparten af studier og referencesystemer baseret på individer af vestlig oprindelse[7], og der er brug for store etnisk diverse populationsstudier, så referencesystemerne ikke diskriminerer på etnicitet [34].

5.3 Videre studier

Der er teoretisk basis for en diagnostisk merværdi for screening for HA med introduktion af LRS, men der mangler evidens. Repeatpanelet fra PacBio testes på AfMD med positive kontroller bl.a. fra denne kohorte, men der foreligger ingen endelige resultater. Foreløbig status indikerer, at der kan forekomme problemer med detektion af repeats over 8000 bp, da fragmentlængden ved analysen er kortere end hidtil antaget. I fx CANVAS forekommer en 5 bp-lang repeteret sekvens, hvorved repeatlængden hurtigt kan overskride fragmentlængden og blive et problem i praksis.

For at teste den diagnostiske merværdi ved brug af LRS ved mistænkt monogenetisk STR-ætiologi er der brug for at genundersøge patienternes fænotype samt reanalysere med LRS. Studiepopulationen bør være en stor, uselektet kohorte af ataksipatienter med negativ molekylærgenetisk diagnose efter testning med de nuværende metoder. De fire patienter i dette studie kan indgå, men der er brug for en noget større kohorte for at opnå en valid teststyrke.

Fra klinisk praksis kendes en række andre neurologiske sygdomsgrupper med lignende STR-ætiologi, fx Huntingtons Chorea [44] og frontotemporal demens [11], men størstedelen forbliver udiagnosticerede trods mistanke om monogenetisk ætiologi [14, 16]. Udvidelse af spektret af flere fænotyper med relation til STR er derfor oplagt for videre studier.

Slutteligt kan vanskelighed ved erkendelse af fænotypen med fordel være genstand for yderligere studier. Den rette teststrategi forudsætter som nævnt, at fænotypen opdages klinisk. Retrospektive studier af sammenhængen mellem henvisningsdiagnose, klinik, teststrategi og endelig diagnose kunne forhåbentlig resultere i forbedrede udredningsalgoritmer.

5.4 Konklusion og perspektiver

Studiet konkluderer, at der forekommer udiagnosticerede individer på KGA med mistænkt monogenetisk ætiologi, som muligvis kunne opnå forbedret diagnostik med LRS. Udvidet genetisk testning medfører dog en indbygget øget risiko for påvisning af flere VUS og tilfældighedsfund urelateret til patientens fænotype. Hvorvidt den diagnostiske merværdi også er en merværdi for patienten, er derfor en etisk overvejelse.

Nye målrettede behandlinger er under klinisk testning, både farmakologisk og non-farmakologisk [45], og der pågår forskning i targetet gentterapi mod ekspansionerne, såvel som forebyggende behandling af præ-symptomatiske bærere [8]. De potentielle fremtidige muligheder for evt. kurativ behandlingsmuligheder understreger vigtigheden af, at den korrekte molekylærdiagnostiske diagnose påvises. Fremtiden vil vise, om udrulning af LRS også inden for andre sygdomsgrupper vil kunne forbedre diagnosticeringen af kendte-, samt udvide spektret af, tilstande med mistænkt monogenetisk ætiologi.

Litteratur

- [1] Francesco Gentile, Alessandro Bertini, Alberto Priori, and Tommaso Bocci. Movement disorders and neuropathies: overlaps and mimics in clinical practice. *Journal of neurology.*, 269(9), 2022. ISSN 0340-5354.
- [2] Tetsuo Ashizawa and Guangbin Xia. Ataxia. *Continuum*, 22(4 Movement Disorders), 2016. ISSN 1538-6899.
- [3] Magdalena Krygier and Maria Mazurkiewicz-Beldzińska. Milestones in genetics of cerebellar ataxias. *Neurogenetics.*, 22(4), 2021. ISSN 1364-6753.
- [4] M Hadjivassiliou, J Martindale, P Shanmugarajah, R A Grünewald, P G Sarrigiannis, N Beauchamp, K Garrard, R Warburton, D S Sanders, D Friend, S Duty, J Taylor, and N Hoggard. Causes of progressive cerebellar ataxia: prospective evaluation of 1500 patients. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry.*, 88(4), 2017. ISSN 0022-3050.
- [5] Sheng-Han Kuo. Ataxia. *Continuum*, 25(4), 2019. ISSN 1538-6899.
- [6] Sara Radmard, Theresa A. Zesiewicz, and Sheng-Han Kuo. Evaluation of cerebellar ataxic patients. *Neurologic Clinics*, 41(1):21–44, 2023. ISSN 0733-8619. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2022.05.002>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733861922000421>. Outpatient Neurology.
- [7] Renata Barreto Tenorio, Carlos Henrique F Camargo, Karina Carvalho Donis, Claudia Choma Bettega Almeida, and Hélio A G Teive. Diagnostic yield of ngs tests for hereditary ataxia: a systematic review. *The cerebellum.*, 20231111. ISSN 1473-4222.
- [8] Giulia Coarelli, Marie Coutelier, and Alexandra Durr. Autosomal dominant cerebellar ataxias: new genes and progress towards treatments. *The Lancet neurology.*, 22(8), 2023. ISSN 1474-4422.
- [9] Luis Ruano, Claudia Melo, M Carolina Silva, and Paula Coutinho. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology.*, 42(3), 2014. ISSN 0251-5350.
- [10] Filippo De Mattei, Fabio Ferrandes, Salvatore Gallone, Antonio Canosa, Andrea Calvo, Adriano Chiò, and Rosario Vasta. Epidemiology of spinocerebellar ataxias in europe. *The cerebellum.*, 2023. ISSN 1473-4222.
- [11] Roisin Sullivan, Wai Yan Yau, Emer O'Connor, and Henry Houlden. Spinocerebellar ataxia: an update. *Journal of neurology.*, 266(2), 2019. ISSN 0340-5354.
- [12] Malco Rossi, Mathieu Anheim, Alexandra Durr, Christine Klein, Michel Koenig, Matthis Synofzik, Connie Marras, and Bart P van de Warrenburg. The genetic nomenclature of recessive cerebellar ataxias. *Movement disorders.*, 33(7), 20187. ISSN 1531-8257.
- [13] Giulia Coarelli, Thomas Wirth, Christine Tranchant, Michel Koenig, Alexandra Durr, and Mathieu Anheim. The inherited cerebellar ataxias: an update. *Journal of neurology.*, 270(1), 2023. ISSN 0340-5354.
- [14] Sanjog R Chintalaphani, Sandy S Pineda, Ira W Deveson, and Kishore R Kumar. An update on the neurological short tandem repeat expansion disorders and the emergence of long-read sequencing diagnostics. *Acta Neuropathologica Communications.*, 9(1), 2021. ISSN 2051-5960.
- [15] Taishan Hu, Nilesh Chitnis, Dimitri Monos, and Anh Dinh. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology.*, 82(11), 2021. ISSN 0198-8859.
- [16] Hui Sun, Xiao-Rong Shen, Zi-Bing Fang, Zong-Zhi Jiang, Xiao-Jing Wei, Zi-Yi Wang, and Xue-Fan Yu. Next-generation sequencing technologies and neurogenetic diseases. *Life*, 11(4):361, Apr 2021. ISSN 2075-1729. doi: [10.3390/life11040361](https://doi.org/10.3390/life11040361). URL <http://dx.doi.org/10.3390/life11040361>.
- [17] Xiaoting Ling, Chenghan Wang, Linlin Li, Liqiu Pan, Chaoyu Huang, Caixia Zhang, Yunhua Huang, Yuling Qiu, Faquan Lin, and Yifang Huang. Third-generation sequencing for genetic disease. *Clinica chimica acta.*, 2023. ISSN 0009-8981.

- [18] Monica H Wojcik, Chloe M Reuter, Shruti Marwaha, Medhat Mahmoud, Michael H Duyzend, Hayk Barseghyan, Bo Yuan, Philip M Boone, Emily E Groopman, Emmanuèle C Délot, Deepti Jain, Alba Sanchis-Juan, Lea M Starita, Michael Talkowski, Stephen B Montgomery, Michael J Bamshad, Jessica X Chong, Matthew T Wheeler, Seth I Berger, and Anne O'Donnell-Luria. Beyond the exome: What's next in diagnostic testing for mendelian conditions. *American journal of human genetics.*, 110(8), 2023. ISSN 0002-9297.
- [19] Shaila D Ghanekar, Sheng-Han Kuo, Joseph S Staffetti, and Theresa A Zesiewicz. Current and emerging treatment modalities for spinocerebellar ataxias. *Expert review of neurotherapeutics.*, 22(2), 2022. ISSN 1473-7175.
- [20] Danmarks Statistik. Befolkningstal statistikbanken. 2023. URL <https://www.statistikbanken.dk/FOLK1A>.
- [21] Sue Richards, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W. Grody, Madhuri Hegde, Elaine Lyon, Elaine Spector, Karl Voelkerding, and Heidi L. Rehm. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the american college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5):405–424, 2015. ISSN 1098-3600. doi: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1098360021030318>.
- [22] Genoox. Franklin. 2023.
- [23] NCBI National Center for Biotechnology Information. Clinvar. 2023.
- [24] McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine. Online mendelian inheritance in man, omim. 2023.
- [25] Brian T Wilson, Zornitza Stark, Ruth E Sutton, Sumita Danda, Alka V Ekbote, Solaf M Elsayed, Louise Gibson, Judith A Goodship, Andrew P Jackson, Wee Teik Keng, Mary D King, Emma McCann, Toshino Motojima, Jennifer E Murray, Taku Omata, Daniela Pilz, Kate Pope, Katsuo Sugita, Susan M White, and Ian J Wilson. The cockayne syndrome natural history (cosynh) study: clinical findings in 102 individuals and recommendations for care. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.*, 18(5), 2016. ISSN 1098-3600.
- [26] Kristina Ibañez, James Polke, R Tanner Hagelstrom, Egor Dolzhenko, Dorota Pasko, Ellen Rachel Amy Thomas, Louise C Daugherty, Dalia Kasperaviciute, Katherine R Smith, Zandra C Deans, Sue Hill, Tom Fowler, Richard H Scott, John Hardy, Patrick F Chinnery, Henry Houlden, Augusto Rendon, Mark J Caulfield, Michael A Eberle, and Ryan J Taft. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the uk: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *The Lancet neurology.*, 21(3), 2022. ISSN 1474-4422.
- [27] Erwin L van Dijk, Delphine Naquin, Kévin Gorrichon, Yan Jaszczyszyn, Rania Ouazahrou, Claude Thermes, and Céline Hernandez. Genomics in the long-read sequencing era. *Trends in genetics.*, 39(9), 2023. ISSN 0168-9525.
- [28] Stefano Facchini, Natalia Dominik, Arianna Manini, Stephanie Efthymiou, Riccardo Currò, Bianca Rugginini, Elisa Vegezzi, Ilaria Quartesan, Benedetta Perrone, Shahedah Koya Kutty, Valentina Galassi Deforie, Ricardo P Schnekenberg, Elena Abati, Anna Pichiecchio, Enza Maria Valente, Cristina Tassorelli, Mary M Reilly, Henry Houlden, Enrico Bugiardini, and Andrea Cortese. Optical genome mapping enables detection and accurate sizing of rfc1 repeat expansions. *Biomolecules.*, 13(10), 2023. ISSN 2218-273X.
- [29] Mark T W Ebbert, Tanner D Jensen, Karen Jansen-West, Jonathon P Sens, Joseph S Reddy, Perry G Ridge, John S K Kauwe, Veronique Belzil, Luc Pregent, Minerva M Carrasquillo, Dirk Keene, Eric Larson, Paul Crane, Yan W Asmann, Nilufer Ertekin-Taner, Steven G Younkin, Owen A Ross, Rosa Rademakers, Leonard Petrucelli, and John D Fryer. Systematic analysis of dark and camouflaged genes reveals disease-relevant genes hiding in plain sight. *Genome biology.*, 20(1), 2019. ISSN 1474-7596.
- [30] Daniele Galatolo, Giovanna De Michele, Gabriella Silvestri, Vincenzo Leuzzi, Carlo Casali, Olimpia Musumeci, Antonella Antenora, Guja Astrea, Melissa Barghigiani, Roberta Battini, Carla Battisti, Caterina Caputi, Ettore Cioffi, Giuseppe De Michele, Maria Teresa Dotti, Tommasina Fico, Chiara Fiorillo, Serena Galosi, Maria Lieto, Alessandro Malandrini, and Marina A B Melone. Ngs in hereditary ataxia: When rare becomes frequent. *International journal of molecular sciences.*, 22(16), 2021. ISSN 1661-6596.

- [31] Erwin L van Dijk, Yan Jaszczyszyn, Delphine Naquin, and Claude Thermes. The third revolution in sequencing technology. *Trends in genetics.*, 34(9), 2018. ISSN 0168-9525.
- [32] Danny E Miller, Arvis Sulovari, Tianyun Wang, Hailey Loucks, Kendra Hoekzema, Katherine M Munson, Alexandra P Lewis, Edith P Almanza Fuerte, Catherine R Paschal, Tom Walsh, Jenny Thies, James T Bennett, Ian Glass, Katrina M Dipple, Karynne Patterson, Emily S Bonkowski, Zoe Nelson, Audrey Squire, Megan Sikes, Erika Beckman, and Robin L Bennett. Targeted long-read sequencing identifies missing disease-causing variation. *American journal of human genetics.*, 108(8), 2021. ISSN 0002-9297.
- [33] Shruti Marwaha, Joshua W Knowles, and Euan A Ashley. A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome. *Genome medicine.*, 14(1), 2022. ISSN 1756-994X.
- [34] Francesco Kumara Mastrorosa, Danny E Miller, and Evan E Eichler. Applications of long-read sequencing to mendelian genetics. *Genome medicine.*, 15(1), 2023. ISSN 1756-994X.
- [35] PacBio. Scalable hifi sequencing with twist bioscience long read alliance panels. Technical report, 2023.
- [36] Tina Han, Holly Corbitt, Leonardo Arbiza, Esteban Toro, and Chad Locklear. Long-read capture with twist target enrichment system. *TWIST Bioscience*, 2023.
- [37] Clara Hellberg, Erik Alinder, Daniel Jaraj, and Andreas Puschmann. Nationwide prevalence of primary dystonia, progressive ataxia and hereditary spastic paraplegia. *Parkinsonism and Related Disorders*, 69:79–84, 2019. ISSN 1353-8020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.10.028>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1353802019304717>.
- [38] Zhongbo Chen, Arianna Tucci, Valentina Cipriani, Emil K Gustavsson, Kristina Ibañez, Regina H Reynolds, David Zhang, Letizia Vestito, Alejandro Cisterna García, Siddharth Sethi, Jonathan W Brenton, Sonia García-Ruiz, Aine Fairbrother-Browne, Ana-Luisa Gil-Martinez, Genomics England Research Consortium, Nick Wood, John A Hardy, Damian Smedley, Henry Houlden, Juan Botía, and Mina Ryten. Functional genomics provide key insights to improve the diagnostic yield of hereditary ataxia. *Brain*, 146(7):2869–2884, 01 2023. ISSN 0006-8950. doi: 10.1093/brain/awad009. URL <https://doi.org/10.1093/brain/awad009>.
- [39] Marie Coutelier, Giulia Coarelli, Marie-Lorraine Monin, Juliette Konop, Claire-Sophie Davoine, Christelle Tesson, Rémi Valter, Mathieu Anheim, Anthony Behin, Giovanni Castelnovo, Perrine Charles, Albert David, Claire Ewenczyk, Mélanie Fradin, Cyril Goizet, Didier Hannequin, Pierre Labauge, Florence Riant, Pierre Sarda, Yves Sznajder, and François Tison. A panel study on patients with dominant cerebellar ataxia highlights the frequency of channelopathies. *Brain.*, 140(6), 2017. ISSN 0006-8950.
- [40] Raskind WH Chen DH, Bird TD. Spinocerebellar ataxia type 14. 2005. Downloadet: dags dato.
- [41] Elaine Chen, Flavia M Facio, Kerry W Aradhya, Susan Rojahn, Kathryn E Hatchell, Sienna Aguilar, Karen Ouyang, Sulagna Saitta, Andrea K Hanson-Kwan, Nicole Nakousi Capurro, Eriko Takamine, Saumya Shekhar Jamuar, Dianalee McKnight, Britt Johnson, and Swaroop Aradhya. Rates and classification of variants of uncertain significance in hereditary disease genetic testing. *JAMA network open.*, 6(10), 2023. ISSN 2574-3805.
- [42] Janine Meienberg, Rémy Bruggmann, Konrad Oexle, and Gabor Matyas. Clinical sequencing: is wgs the better wes? *Human genetics.*, 135(3), 2016. ISSN 1432-1203.
- [43] Netanel Loyfer, Judith Magenheimer, Ayelet Peretz, Gordon Cann, Joerg Bredno, Agnes Klochendler, Ilana Fox-Fisher, Sapir Shabi-Porat, Merav Hecht, Tsuria Pelet, Joshua Moss, Zeina Drawshy, Hamed Amini, Patriss Moradi, Sudharani Nagaraju, Dvora Bauman, David Shveiky, Shay Porat, Uri Dior, Gurion Rivkin, and Omer Or. A dna methylation atlas of normal human cell types. *Nature.*, 613(7943), 2023. ISSN 0028-0836.
- [44] Eun Pyo Hong, Marcy E MacDonald, Vanessa C Wheeler, Lesley Jones, Peter Holmans, Michael Orth, Darren G Monckton, Jeffrey D Long, Seung Kwak, James F Gusella, and Jong-Min Lee. Huntington’s disease pathogenesis: Two sequential components. *Journal of Huntington’s disease.*, 10(1), 2021. ISSN 1879-6397.
- [45] Kah Hui Yap, Shahrul Azmin, Jemaima Che Hamzah, Norfazilah Ahmad, Bart van de Warrenburg, and Norlinah Mohamed Ibrahim. Pharmacological and non-pharmacological management of spinocerebellar ataxia: A systematic review. *Journal of neurology.*, 269(5), 2022. ISSN 0340-5354.