

Tab. 1. Nejčastější formy familiárních specifických proteinopatií

Forma neurodegenerace	Mutovaný gen	Proteinová depozita
Alzheimerova nemoc	APP, PSEN1, PSEN2	Amyloid β, tau
Frontotemporální demence	MAPT, GRN, C9ORF72	Tau, TDP-43
Amyotrofická laterální skleróza	TDP-43, C9ORF72	TDP-43
Parkinsonova nemoc	SNCA, LRRK2	α-Synuklein
Huntingtonova nemoc	HTT	Huntingtin
Prionové nemoci	PRNP	Prionový protein

Úvod

Nejrozšířenější technikou masivního paralelního sekvenování – NGS (next-generation sequencing) pro genetickou diagnostiku je WES, který zachycuje všechny známé kódující exony a hranice exon/intron v genomu. „Exom“ představuje všechny exony v lidském genomu, zahrnuje přibližně 180 000 exonů, což je 1 % lidského genomu o velikosti 30 Mb (Ng et al., 2009). Odhaduje se, že 85 % mutací způsobujících onemocnění leží v oblastech kódujících proteiny (Giau et al., 2018). WES byl tedy zaveden jako účinná strategie k identifikaci nových genů spojených se vzácnými mendelovskými poruchami. V současné době se WGS, tedy sekvenování celého genomu, nepoužívá tak široce jako WES kvůli vyšším nákladům a velikosti získaných dat, které mají vysoké nároky na jejich interpretaci, a to především v případech náhodných potenciálně rizikových nálezů (Fan et al., 2020). Nicméně stále více důkazů naznačuje, že nekódující varianty mohou způsobit nebo zvýšit riziko mnoha neurodegenerativních onemocnění. Protože WGS poskytuje mnohem komplexnější pokrytí než WES, bude mít v budoucnu rozhodně rozsáhlejší aplikace (García et Bustos, 2018a).

Na našem pracovišti se molekulární diagnostikou neurodegenerativních chorob zabýváme od roku 2005 (Matej et Rusina, 2019). V počátcích jsme využívali techniku přímého, tzv. Sangerova sekvenování. S postupem času, kdy stoupal zájem ze stran neurologů analyzovat více genů, sehrály klíčovou roli NGS technologie.

Centrum pro diagnostiku a studium neurodegenerativních onemocnění a Národní referenční laboratoř pro diagnostiku lidských prionových onemocnění (NRL CJN) se dlouhodobě věnuje vývoji a aplikacím moderních metod sekvenování a analýzy DNA u neurodegenerací (Matej et Rusina, 2019). Identifikovat genetické příčiny je v mnoha případech neurodegenerací klíčové pro stanovení správné diagnózy vzhledem k vysoké heterogenitě vzácných nemocí

a umožňuje poskytnutí genetického poradenství v rodinách pacientů. Včasné odhalení genetické příčiny řady patologií bývá nezbytné pro zařazení pacienta do vhodné klinické studie nebo přímo podmiňuje úspěšnost a samotnou aplikaci potenciální léčby. V neposlední řadě, díky porozumění patofyziologických mechanismů vzácných nemocí na molekulární úrovni, může být iniciován vývoj kauzální léčby. Předpokládá se, že až 10–15 % specifických proteinopatií má familiární výskyt se známými primárními geny (Giau et al., 2018).

Bylo popsáno několik typů genetických neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy choroby (AD), Parkinsonovy choroby (PD), frontotemporální demence (FTD), amyotrofické laterální sklerózy (ALS), prionových onemocnění a Huntingtonovy choroby, které mohou sdílet klinické a patologické rysy (Wolfe, 2018). Společným rysem neurodegenerativních onemocnění jsou abnormální proteinové agregáty v centrálním nervovém systému (Santiago et al., 2017). U mnoha onemocnění jsou patrné klinické a patologické podobnosti (Ng et al., 2009), které jsou způsobeny překrývajícími se neurodegenerativními entitami se spolupodílem různých genetických faktorů (Lill et Bertram, 2011; Santiago et al., 2017). Navíc k rutinní diagnostice, protože tato onemocnění mají komplexní genetické pozadí, je genetické profilování nezbytné pro přesnou diagnózu a pro odhad budoucího rizika potomků vyšetřeného probanda (Prince et al., 2013).

Koncept molekulárně genetického testování

Koncept, jakým by se mělo genetické testování neurodegenerativních chorob ubírat, jsme vytvořili po diskuzích s odborníky na neurodegenerativní onemocnění a s genetiky.

Pacienti indikovaní k molekulárně genetickému testování se podrobí podrobnému klinicko-genetickému poradenství, a to před i po laboratorním genetickém vyšetření.

Vyšetření v současné době indukuje klinický genetik v úzké spolupráci s kognitivním neurologem (Parobková et al., 2019). Rozhodující roli pro genetické testování má pozitivní rodinná anamnéza, nicméně v případech atypického klinického průběhu onemocnění může být přínosné provést molekulárně genetické vyšetření i přes falešnou „negativitu“ rodinné anamnézy (García et Bustos, 2018 b). V mnoha případech u pacientů s prokázanou kauzální mutací nemusí být příznačná pozitivní rodinná anamnéza, neboť informace mohou být mnohdy zavádějící či neúplné. Kromě toho se patogenní mutace nemusí pouze dědit, ale může i vznikat de novo, potomci takto postižených jedinců pak už dědí nově získanou mutaci standardním způsobem. K posouzení rentability genetického vyšetřování je pak vhodné konzultovat specializované centrum, které má zkušenosti s daným typem onemocnění a úzce spolupracuje s klinickým genetikem

NGS se používá při diagnostice neurodegenerativních onemocnění po odběru biologického materiálu a extrakci DNA za účelem identifikace genetických variant spojených s onemocněním (Jiang et al., 2014). Stanovení správné diagnózy vzácných neurodegenerativních nemocí je klíčové pro možnou iniciaci vývoje kauzální léčby. Genová terapie cílí na neurodegenerativní nemoc je ve 3. fázi klinických studií (Thompson, 2024).

1. Design panelu

Více než sto osmnáct genů bylo vybráno na základě jejich role v monogenních formách neurodegenerativních onemocnění včetně AD, FTD, ALS. Zaměřujeme se na varianty, které mění aminokyseliny; nebo které spadají do sestřihových donorových/akceptorových míst; v oblastech sestřihu nebo v 5' nebo 3' nepřeložených oblastech. Pro každý studovaný gen způsobující onemocnění byla provedena rešerše v literatuře, aby se identifikovaly dříve publikované patogenní mutace uvedené v databázích Varsome a Clinvar. Frekvence populačních variant byla stanovena pomocí gnomAD (v2.1). Navržený sekvenční panel obsahuje dostatečné množství genů, které mohou vést k odhalení varianty, která by vysvětlovala neurologické potíže u pacienta. Dalším krokem v případě, že není detekovaná varianta způsobující onemocnění, doporučujeme sekvenování celého exomu