

(WES), protože varianty spojené s onemocněním jsou v kódujících oblastech významně nadměrně zastoupeny. DNA je extrahována z periferní krve standardními metodami. Příprava knihovny se provádí komerčními panely nebo custom panely. Sekvenování knihoven se nejčastěji provádí na NextSeq 550/550Dx společnosti Illumina s použitím 151 bp čtení párového konce. U všech zahrnutých vzorků musí být dosaženo cílového průměrného pokrytí alespoň 30x.

## 2. NGS a analýza dat

Analýzu dat provádíme podle standardních osvědčených postupů pomocí informačního systému Genovesa a sekvence se porovnávají s lidským referenčním genomem (GRCh38/hg38). Vytvořili jsme si workflow, které zahrnuje kontrolu kvality FASTQ souborů a jejich filtraci (Phred Qual nižší jak 20), filtraci krátkých readů (< 30), filtraci adapterové sekvence, mapování k referenční sekvenci hg38, odstranění PCR duplikátu, kontrola kvality pokrytí (min coverage 20X), analýzu výpadku regionu. Výpočet uniformity, median coverage, on/off target regionu. Hledání variant s frekvencí 25 % (INDELS 10 %), minimální pokrytí 20X, kvalita Phred 20, Mapping kvalita 1, fázování variant, normalizace a SNPů do MNVs, anotace variant Ensembl VEP 107, dbNSFP.

## 3. Validace variant

K ověřování variant detekovaných pomocí NGS používáme 3 nezávislé techniky genotypizace, jmenovitě (1) alelickou diskriminaci TaqMan; a (2) Sangerovo sekvenování; a (3) restriční analýzu. Primery jsou navrženy pomocí softwaru Primer3. Pro zajištění kvality Sangerova sekvenování jsou amplikony navrženy tak, aby měly hranici přibližně 100 bp od varianty. Sekvence jsou porovnávány s referenční sekvencí v NCBI. Všechny nalezené varianty v kódujících oblastech jsou tímto ověřeny a potvrzeny.

## 4. Interpretace dat

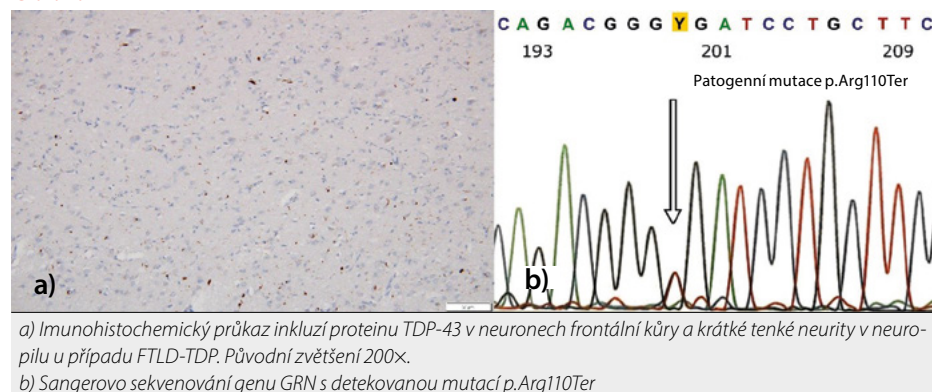
Všechny klinicky relevantní varianty dichotomizujeme od variant s nejistým významem pomocí našeho integrovaného vlastního pracovního postupu bioinformatiky. Obecně postupujeme podle pokynů pro interpretaci sekvenčních variant navržených American College

of Medical Genetics and Genomics a Association for Molecular Pathology (Richards et al., 2015) a vycházíme ze zkušeností spolupracujícího pracoviště Centra pro molekulární neurologii Univerzity v Antverpách. Vyšetřujeme varianty, které byly v naší studii považovány za varianty s MAF < 1 % na základě 1 000 genomů, NHLBI Exome Sequencing Project a databází ExAC. Varianty jsou také hodnoceny in silico pomocí kompilace predikčních programů: PolyPhen-2, SIFT a CADD. HGMD a ClinVar používáme určení genetické variace se specifickým chorobným stavem.

## Studovaná kohorta

Na našem pracovišti byly v letech 2007 až 2023 vyšetřeny vzorky DNA od více než 1 200 jedinců postižených různými neurodegenerativními onemocněními, nejčastěji s diagnózou AD, FTD, ALS a CJD. Všichni pacienti měli klinicky prokázané neurodegenerativní onemocnění, u velké části byla klinická diagnóza potvrzena autoptickým vyšetřením mozku. Tam, kde to bylo možné, byly vzorky DNA získány od postižených a zdravých příbuzných. Pro praktickou ilustraci významu neurogenetického vyšetření uvádíme zajímavé případy, u kterých byla objevena mutace, která v konečném důsledku vysvětlovala neurologické potíže u pacienta a korelovala s neuropatologickým obrazem postižení mozku. Ve studovaných genech jsme identifikovali varianty nesynonymní, synonymní, intronické a UTR a i několik indelů (kódujících a intronických). Po filtraci variant a ověření bylo mezi geny objeveno celkem 27 jednoznačně patogenních missense mutací a několik variant neznámé klinické significance.

Obr. 1.



## Ilustrativní kazuistiky 5 zajímavých případů

### Případ č. 1 Patogenní mutace p. Arg110Ter v genu GRN

**Neurologický náález:** u probanda přetrvávající neurologické potíže zhruba 4 roky, nerozumí mluvenému slovu, prakticky nemluví. Byl přijat na neurologické oddělení pro progredující kognitivní deficit. Veden jako Alzheimerova nemoc s časným nástupem. Sestra probanda měla podobné neurologické potíže.

**Neuropatologický náález:** Neurodegenerativní onemocnění spadající mezi frontotemporální lobární degenerace (FTLD) s fosfoTDP-43 pozitivními inkluzemi (FTLD-TDP) s převahou znaků typu A v harmonizované klasifikaci dle Mackenzieho (Mackenzie et al., 2019).

**Genetický náález:** V kódující sekvenci genu GRN (NM\_002087) byla nalezena varianta p. Arg110Ter (c.328C>T). Nalezená varianta je popsána u jedinců s autozomálně dominantní frontotemporální demencí (Van Deerlin et al., 2007; Jin et al., 2012) a také byla detekována u jedince s klinickou diagnózou zadní kortikální atrofie se zrakovým deficitem, apercepční zrakovou agnozií a okcipitální kortikální atrofii (Caroppo et al., 2015). Stejný náález je popsán i u sestry probanda (Obr. 1).

**Definitivní náález:** FTLT-DTP s detekovanou patogenní variací genu GRN p. Arg110Ter. Vzhledem k nálezu identické mutace u sestry jde o genetickou formu postižení. Následně bylo postižení mozku sestry neuropatologicky verifikováno.

### Případ č. 2 Patogenní mutace Asp40del v genu PSEN1

**Neurologický náález:** v rodině je pozitivní anamnéza s velkou genetickou zátěží.