

# Sekvenovanie novej generácie a jeho využitie v klinickej genetike

**MUDr. Mária Geryková Bujalková, PhD.<sup>1,2</sup>, RNDr. Regina Lohajová Behulová, PhD.<sup>3</sup>,  
RNDr. Renáta Lukačková<sup>1</sup>, RNDr. Gabriel Minárik, PhD.<sup>4,5,6</sup>, RNDr. Tomáš Szemes, PhD.<sup>4,5</sup>**

<sup>1</sup>Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Bratislava

<sup>2</sup>Ambulancia lekárskej genetiky, Nemocničná, a. s., člen MEDIREX GROUP, Malacky

<sup>3</sup>Klinika lekárskej genetiky LF SZU a UNB, Bratislava

<sup>4</sup>Katedra molekulárnej biológie PriF UK, Bratislava

<sup>5</sup>Geneton, s. r. o., Bratislava

<sup>6</sup>Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

Revolučná metóda sekvenovania novej generácie (NGS) je založená na možnosti realizácie paralelnej sekvenačnej analýzy veľkého množstva DNA fragmentov. Chemický princíp v súčasnosti najpoužívanejších NGS technológií zahŕňa takzvané sekvenovanie počas syntézy alebo ligáciou s následnou detekciou fluorescence, chemiluminiscencie alebo zmeny pH. Obrovské množstvo dát získaných pomocou NGS analýz je nevyhnutné efektívne spracovať a korektne vyhodnotiť pomocou rôznych bioinformatických algoritmov, čo kladie vysoké nároky na infromatickú infraštruktúru laboratória a odborný personál špecializovaný na bioinformatiku. Rutinná klinicko-diagnostická implementácia NGS metód vyžaduje precíznu validáciu jednotlivých testov a štandardizáciu celého analytického procesu. Vzhľadom na rozsah získaných dát prináša genetické testovanie pomocou NGS veľké množstvo výsledkov s rôznou informatívnou hodnotou. V prípade identifikácie patologického variantu (mutácie) v známom géne alebo v géne veľmi pravdepodobne asociovanom s daným ochorením je možné diagnosticky stanoviť príčinu pacientovho fenotypu. Naopak, takzvané náhodné nálezy, ktoré sa identifikujú pri testovaní pomocou exómového alebo celogenómového sekvenovania, so sebou prinášajú interpretačné a etické výzvy a na ich reportovanie musia byť stanovené prísne kritériá. Rôzne aplikácie NGS sa už využívajú nielen v rámci výskumu, ale aj v laboratórnej diagnostike mnohých geneticky podmienených ochorení. Doterajšie niekoľkoročné skúsenosti preukázali jednoznačnú efektivitu panelového a exómového sekvenovania najmä v prípade zriedkavých syndrémov a geneticky heterogénnych ochorení. Je však zrejmé, že postupná integrácia NGS do klinicko-diagnostickej praxe môže perspektívne priniesť „na mieru šitú“ lekársku starostlivosť aj pri častejšie sa vyskytujúcich, multifaktoriálnych chorobách.

**Kľúčové slová:** sekvenovanie novej generácie (NGS), génové panely, exómové sekvenovanie (ES), celogenómové sekvenovanie (WGS), geneticky heterogénne ochorenia, zriedkavé syndrómy.

## *Next Generation Sequencing and its Application in Clinical Genetics*

Revolutionary method of next generation sequencing (NGS) is based on the parallel sequencing analysis of a large number of DNA fragments. Chemical principle of current most widely used NGS technologies includes sequencing by synthesis or ligation followed by the detection of fluorescence, chemiluminiscence or changes in pH. Huge amount of data arising from NGS analyses have to be effectively processed and correctly evaluated by various bioinformatic algorithms that put high requirements on laboratory's hardware and software equipment as well as staff trained in bioinformatics. Routine diagnostic implementation of NGS methods requires thorough validation of individual tests and standardization of the entire analytical procedure. Considering the amount of acquired data, genetic testing by NGS yields a lot of results with varying informativeness. If a pathological variant (mutation) in a known or novel gene associated with the disease is found, the cause of patient's phenotype can be ascertained. On the contrary, incidental findings identified by exome or whole genome sequencing give rise to interpretative and ethical challenges and their reporting must fulfil strict criteria. Various NGS applications are already used in research and clinical diagnosis of many genetically determined diseases. Long-term experience proved apparent efficacy of gene panel and exome sequencing particularly in the diagnosis of rare syndromes and genetically heterogeneous diseases. However, in perspective, progressive integration of NGS into the clinical practice could lead to the individually tailored patient management even in more common, multifactorial diseases.

**Key words:** next generation sequencing (NGS), gene panels, exome sequencing (ES), whole genome sequencing (WGS), genetically heterogeneous diseases, rare syndromes.

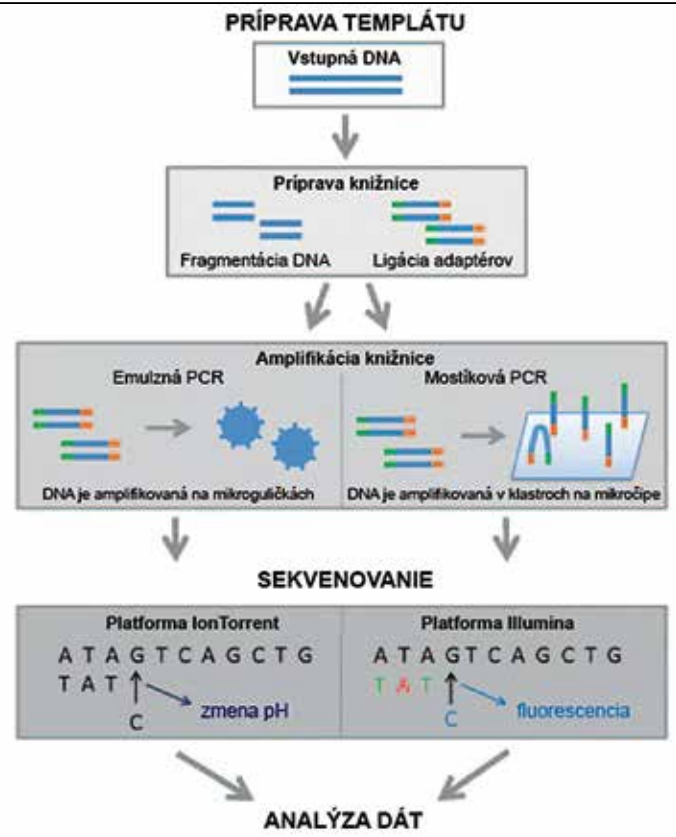
## Sekvenačné technológie prvej a druhej generácie

Metóda DNA sekvenovania publikovaná F. Sangerom koncom 70. rokov minulého storočia (1) označovaná aj ako dideoxynukleotidové sekvenovanie priniesla nové a v čase svojho vzniku ešte netušené možnosti analýzy jednotlivých génov a neskôr celých genómov. Prvogeneračná Sangerova metóda sa postupne vyvinula na výkonnú automatizovanú technológiu využívajúcu polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), fluorescenčné značenie dideoxynukleotidov, kapilárnu elektroforézu a komplexné počítačové spracovanie dát a metodicky stále predstavuje zlatý štandard. Napriek určitým obmedzeniam automatizácia Sangerovho postupu umožnila úspešnú realizáciu projektu sekvenovania ľudského genómu a etablovanie sekvenačnej analýzy v rutinej molekulovo-genetickej diagnostike. Program sekvenovania celého ľudského genómu však dramaticky zvýšil nároky na kapacitu sekvenačných technológií. Projekt sa realizoval v „továrskych“ organizovaných sekvenačných centrách so špecifickou infraštruktúrou, ktorá zahŕňala stovky veľkokapacitných sekvenátorov, ďalších automatizovaných prístrojov a počítačov, ako aj veľké množstvo personálu. Takýto typ zvýšenia výkonnosti sekvenovania však nebol perspektívne postačujúci pre nové výskumné a diagnostické výzvy v humánnej genetike a genomike a postupne dochádzalo k vývoju nových, čoraz komplexnejších sekvenačných postupov.

Technológie sekvenovania novej generácie (NGS) sa od automatizovanej Sangerovej metódy odlišujú najmä svojou vysokou výkonnosťou. Základný princíp NGS je prehľadne znázornený na obrázkoch 1 – 3. Podstata zvýšenej efektivity spočíva v masívnej paralelizácii biochemických a meracích krokov, ako aj výraznom zvýšení rýchlosti sekvenovania. Nové metódy umožňujú simultánnu analýzu miliónov sekvenačných „čítaní“ v jednej vzorke. Ďalšie rozdiely zahŕňajú odlišnú formu východiskového templátu (tzv. fragmentové knižnice, viď nižšie) a o niečo kratšiu dĺžku sekvenovania analyzovaných fragmentov v porovnaní so Sangerovou metódou. Obmedzenia spôsobené kratšími čítaniami však kompenzuje masívna hĺbka pokrytia a paralelizácia, t. j. mnohonásobné opakovanie analýzy tej istej cieľovej oblasti genómu v zmesi obrovského množstva súbežne zoradených DNA fragmentov rôzneho typu (obrázok 2).

V súčasnosti používané NGS technológie druhej generácie (popis metód tretej generácie, ktoré sa stále ešte len profilujú, je nad rámec tohto prehľadového článku) z chemického hľadiska využívajú DNA syntézu alebo ligáciu. Detekcia signálu z miliónov chemických reakcií, ktorý je následne transformovaný do sekvenačných dát, je zabezpečená snímaním emitovanej fluorescence (z fluorescenčne značených nukleotidov), enzymaticky vyvolanej chemiluminiscencie (pri degradácii pyrofosfátu) a pH zmien (pri uvoľňovaní protónov počas inkorporácie nukleotidov do DNA reťazca). Bez ohľadu na chemickú podstatu sekvenovania, všetky NGS metódy vyžadujú komplexnú predsekvenačnú prípravu DNA templátu a následnú bioinformatickú analýzu sekvenačných dát (obrázky 1 a 3). Predsekvenačné kroky zahŕňajú prípravu sekvenačnej (fragmentovej) knižnice, podľa potreby aj vrátane cieľového obohatenia (target enrichment) a následne klonálnu amplifikáciu pripravenej sekvenačnej knižnice. Príprava knižnice sa zvyčajne skladá z dvoch krokov, fragmentácie východiskovej DNA na veľkosť 150-500 bp fyzikálnym (napríklad sonikáciou) alebo enzymatickým spôsobom (nukleázou, transpozónami) a ligácie adaptorových primerov na fragmenty. Cieľové obohatenie, t. j. špecifická

Obrázok 1. Princíp sekvenovania novej (druhej) generácie (upravené podľa (2))

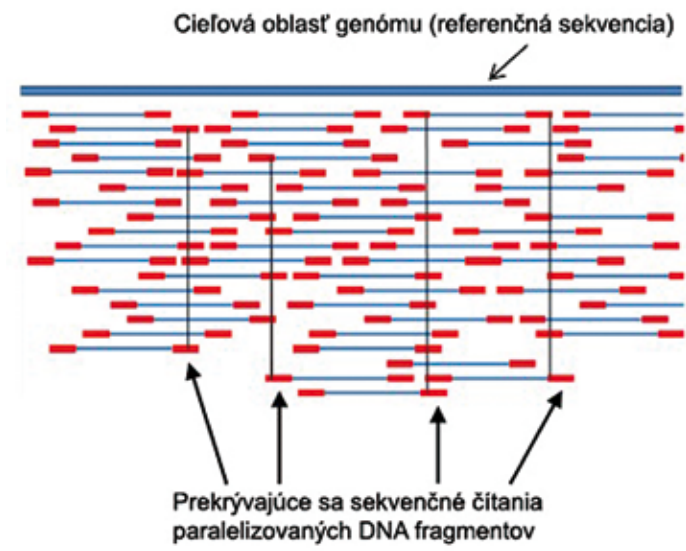


selekcia želaných DNA fragmentov, sa vykonáva v prípade potreby sekvenovať len určité oblasti genómu v sumárne menšom rozsahu (napríklad len niektoré exóny alebo súbory génov) a najčastejšie sa realizuje pomocou PCR alebo hybridizácie so špecifickými oligonukleotidovými próbami. Klonálna amplifikácia knižnice prebieha pomocou špecifických typov PCR – najčastejšie tzv. emulznej alebo mostíkovej (bridge) PCR. Posekvenačná bioinformatická analýza zahŕňa spracovanie nasnímaného signálu, jeho transformáciu do čiastkových nukleotidových sekvencií a porovnanie výslednej „poskladanej“ DNA sekvencie s referenčnou za účelom záverečnej identifikácie a anotácie variantných nukleotidov (5).

Počas sekvenačnej reakcie sa vygenerujú milióny až miliardy tzv. čítaní. Čítanie (read) je nukleotidová sekvencia určitej dĺžky (read length) získaná z DNA fragmentu nachádzajúceho sa v sekvenačnej knižnici. Na presnosť NGS analýzy a správnu interpretáciu dát je nevyhnutné dosiahnuť dostatočnú hĺbku pokrytia (depth of coverage). Hĺbka pokrytia je počet čítaní, ktorý pokrýva konkrétny cieľový nukleotid a bežne sa vyjadruje vo forme Nx (napríklad 40x, 100x, t. j. štyridsať, sto čítaní cieľového nukleotidu). Ďalším dôležitým parametrom je hĺbka sekvenovania (sequencing depth), t. j. celkové množstvo sekvenačných dát (prečítaných nukleotidov), ktoré vyžaduje daná vzorka, aby sa dosiahla požadovaná priemerná hĺbka pokrytia. Najčastejšie sa udáva ako počet potrebných čítaní na vzorku (napríklad 40 miliónov, 1 miliarda) alebo počet nukleotidov (báz), ktoré je nutné sekvenovať (napríklad 100 Mb, 4 Gb).

Proces analýzy NGS dát môžeme všeobecne rozdeliť na tri stupne (obrázok 4). Primárna analýza, stanovenie báz (base-calling), zahŕňa konvertovanie

**Obrázok 2.** Masívna paralelizácia na úrovni spracovania sekvenačných NGS dát. Červené úseky predstavujú identifikované sekvencie, modré úseky medzi nimi neurčenú sekvenciu (upravené podľa (3))



**Obrázok 3.** Všeobecný postup sekvenovania druhej generácie a analýzy získaných sekvenačných dát (upravené podľa (4))

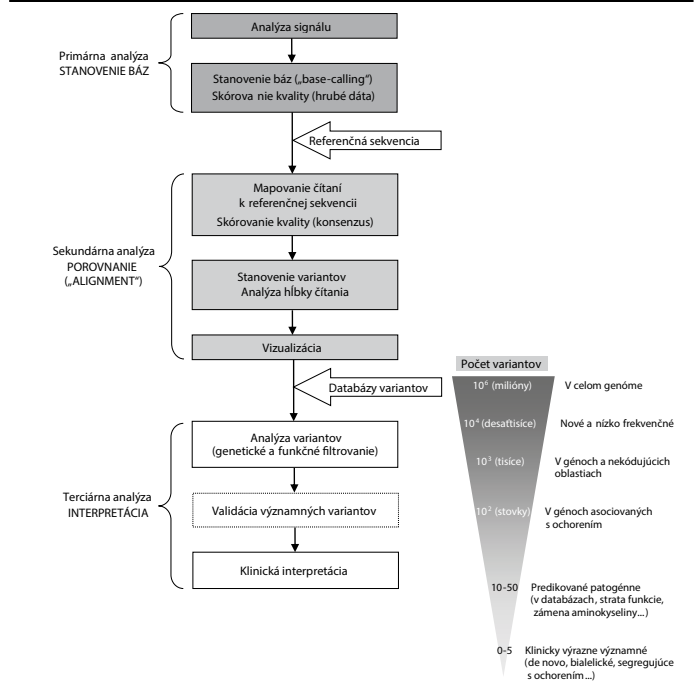


biochemických signálov, čiže hrubých dát, ktoré boli získané snímaním zmien svetelnej intenzity (fluorescencia, chemiluminiscencia) alebo zmien pH, do krátkych nukleotidových sekvencií – čítaní. Sekundárna analýza zabezpečuje porovnanie (alignment) sekvencií s referenciou a stanovenie variantných nukleotidov a ich anotáciu. Terciárna analýza znamená interpretáciu, t. j. analýzu zistených variantov z hľadiska pôvodu, jedinečnosti a funkčného dosahu. Každý z týchto krokov vyžaduje špeciálne vytvorené databázy, algoritmy, softvér a skúsenosti. Procesy primárnej analýzy sú už v súčasnosti úspešne zvládnuté a postupne sa automatizujú. Aj v rámci sekundárnej analýzy sa štandardizujú metódy mapovania čítaní k najnovšej referenčnej sekvencii ľudského genómu. Limitáciu širšej klinickej aplikácie NGS predstavuje práve biomedicínska interpretácia identifikovaných variantov, ktorá sa zatiaľ ešte len vyvíja, čo sa týka algoritmov, analytických postupov a identifikácie či predikcie kauzálnych genotypovo-fenotypových korelácií (6).

### Aplikácie NGS

Sekvenovanie génových panelov (panelové sekvenovanie, PS) je zamerané na konkrétne ochorenia, pretože sa analyzuje stanovený súbor známych, klinicky významných génov. Dosahuje sa tým väčšia hĺbka pokrytia (t. j. viac čítaní v želaných oblastiach) a následne aj vyššia analytická senzitivita a špecifita. Keďže PS analyzuje len gény so známou

**Obrázok 4.** Obrázok 4. Algoritmus bioinformatického spracovania NGS dát a stupne filtrovania pri terciárnej analýze (upravené podľa (6) a (7))



asociáciou s konkrétnymi ochoreniami, umožňuje lepšiu interpretáciu nálezov v klinickom kontexte. V porovnaní s exómovým a genómovým sekvenovaním (viď nižšie) je PS kompatibilné s ekonomicky a časovo výhodnejším využitím menších stolových sekvenátorov (nižšia cena prístroja, možnosť analýzy viacerých vzoriek v jednom behu) a jednoduchším manažovaním objemu dát. V tabuľke 1 sú uvedené príklady génových panelov, ktoré v súčasnosti komerčne ponúkajú výrobcovia dvoch NGS platforiem (Illumina, Life Technologies) na priame použitie v diagnostike.

Exómové sekvenovanie (ES) znamená stanovenie DNA sekvencie exómu, teda väčšiny približne zo 160 000 proteín-kódujúcich exónov, ktoré síce predstavujú len 1 – 2 % ľudského genómu (~30 – 60 Mb), ale zahŕňajú ~85 % známych kauzálnych mutácií (8). ES sa používa na detekciu variantov (mutácií) už v známych, s ochoreniami asociovaných génoch, ako aj na zisťovanie nových etiopatogenetických asociácií. Objavovanie a charakterizácia „nových“ génov boli ešte donedávna doménou výskumných laboratórií, ale postupne dochádza k presunu identifikácie kandidátnych kauzálnych génov aj do klinicko-diagnostických laboratórií, hoci na jednoznačné potvrdenie asociácie sú zvyčajne potrebné ďalšie štúdie, často v spolupráci s výskumnými pracoviskami.

Celogenómové sekvenovanie (whole genome sequencing, WGS) stanovuje DNA sekvenciu prakticky celého genómu a pokrýva teda kódujúce aj nekódujúce oblasti. Výhodou tohto prístupu je relatívne nekomplikovaná predsekvenačná príprava vzoriek, ktorá nevyžaduje PCR amplifikáciu alebo obohacovanie cieľových oblastí. Pre obmedzenia pri interpretácii variantov v nekódujúcich oblastiach sa často volí stratégia, pri ktorej sa najprv analyzujú kódujúce regióny (t. j. exóm). V prípade, že sa nenájdu kauzálné mutácie, dáta sa znovu analyzujú a hľadajú sa va-

rianty v regulačných nekódujúcich oblastiach, ktoré by mohli ovplyvňovať expresiu klinicky významných génov. WGS pri porovnaní s cieľným PS vyžaduje rádovo desaťnásobky hĺbky sekvenovania (sequencing depth), t. j. množstva sekvenovania, ktoré vyžaduje daná vzorka, a to pri podstatne nižšej hĺbke pokrytia (depth of coverage), čo prináša veľké nároky na kvalitu a kapacitu technológie (konkrétneho prístroja) aj dátovej analýzy. Keďže sekvenačná hĺbka analyzovanej vzorky je násobkom objemu sekvenovanej DNA a želanej hĺbky pokrytia, pri veľkosti génového panela napríklad 3 Mb ( $3 \times 10^6$  bp) a hĺbke pokrytia 100x je sekvenačná hĺbka 0,3 Gb ( $3 \text{ Mb} \times 100$ ), zatiaľ čo pri sekvenovaní celého genómu s veľkosťou 3 Gb ( $3 \times 10^9$  bp) a hĺbke pokrytia 30x je požadovaná sekvenačná hĺbka až 90 Gb ( $3 \text{ Gb} \times 30$ ). Celogenómové sekvenovanie tak v súčasnosti predstavuje finančne najviac náročnú NGS aplikáciu s najnižšou priemernou hĺbkou pokrytia, hoci v budúcnosti sa tieto nevýhody budú postupne redukovat.

### Klinické aspekty implementácie NGS

Vzhľadom na pomerne nedávne etablovanie NGS technológií a rôznorodosť klinických aplikácií sa NGS testovanie (najmä panelové) vykonáva prevažne pomocou vlastných testov vyvinutých v jednotlivých laboratóriách. Využívajú sa najrozličnejšie kombinácie prístrojov, chemikálií a postupov dátovej analýzy. Niekedy sú jednotlivé časti analýzy (napríklad zostava predsekvenačného postupu od jedného výrobcu alebo softvéry pre terciárnu analýzu dát) komerčne, verejne dostupné, ale následne musia byť validované na diagnostické použitie (9).

Pri tradičnom diagnostickom testovaní je úlohou klinického genetika stanoviť diagnózu založenú na klinickom obraze, objektívnom vyšetrovaní a rodinnej anamnéze. Genetický test býva indikovaný na potvrdenie, respektíve vylúčenie diagnózy. Vyšetrujúce laboratórium vo výsledkovej správe uvedie všetky potenciálne patologické varianty (mutácie) v analyzovanom géne, ako aj základný popis použitých metód vrátane analytických parametrov (senzitivita, špecifita, detekčný limit). Panelové sekvenovanie predstavuje z pohľadu klinického genetika logické rozšírenie súčasných sekvenačných testov v prípade tzv. geneticky heterogénnych ochorení. Indikáciou PS je teda klinická diagnóza ochorenia, ktorého genetická etiológia je veľmi heterogénna, konkrétny kauzálny gén sa nedá nijakým spôsobom vyselektovať a súbežná analýza veľkého počtu asociovaných génov preto predstavuje najefektívnejší diagnostický postup. Korektná indikácia PS tak môže prispieť k podstatnému zrýchleniu identifikácie kauzálnej mutácie u novodiagnostikovaných pacientov, respektíve úspešnému završeniu diagnostického procesu pri dlhodobo nedoriešených prípadoch. Testovanie pomocou PS najlepšie vyhovuje aj súčasným modelom finančnej úhrady (zdravotnými poisťovňami i samoplacovsky) za molekulárne diagnostické testy. Z týchto dôvodov je pre laboratóriá aj indikujúcich klinických genetikov najvhodnejšie začať zo získavaním skúseností najprv prostredníctvom PS pred postupným prechodom k ES a WGS aplikáciám.

Použitie ES alebo WGS umožňuje voľnejší prístup k testovaniu pacientov, bez nutnosti presnej iniciálnej diagnózy, ale na korektnú interpretáciu dát vyžadujú obe aplikácie úzku spoluprácu klinického genetika s laboratóriom, najmä pri voľbe vhodnej stratégie filtrovania variantov a následnej interpretácii výsledkov. Indikáciou ES, respektíve WGS sú prípady, pri ktorých je klinicky veľmi pravdepodobné genetické ochorenie,

**Tabuľka 1.** Príklady génových panelov ponúkaných výrobcami NGS platforiem

Zameranie panelu	Názov	Počet génov	Spektrum analýzy
Dedičné ochorenia	TruSight One Sequencing	4.813	Exónové oblasti génov uvedených v OMIM*, ktorých mutácie boli asociované s konkrétnymi ochoreniami
	Ion AmpliSeq Inherited Disease	325	>700 vrodených chorôb vrátane neuromuskulárnych (245 ochorení /87 génov), kardiovaskulárnych (159/62), metabolických (46/28), vývinových porúch (193/75) a iných ochorení (napr. dedičné nádorové, slepota: 210/73)
	TruSight Inherited Disease	552	OMIM* gény asociované prevažne so závažnými autozómovo-recesívnymi ochoreniami s nástupom v detstve
Heterogénne ochorenia	TruSight Cardiomyopathy	46	Kardiomyopatie (KMP: hypertrofická, dilatčná, nonkompaktná ľavokomorová, arytmogénna pravokomorová/ katecholaminergná polymorfna komorová tachykardia) a syndrómy s KMP, napr. Danonov, Fabryho
	TruSight Autism	101	Gény asociované s poruchami autistického spektra a mentálnou retardáciou (resp. zaostávaním vývinu)
Analýza tumorového tkaniva a dedičné nádorové predispozície	Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer	22	Vybrané oblasti najčastejšie mutovaných génov v karcinómoch hrubého čreva a pľúc
	Ion AmpliSeq Cancer Hotspot	50	Najčastejšie mutácie („hotspots“) vo vybraných onkogénoch a tumor-supresorových génoch; široké pokrytie onkogénov <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> a <i>EGFR</i>
	Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer	>400	Exónové oblasti onkogénov a tumor-supresorových génov často mutovaných v rôznych typoch solídnych nádorov (vrátane génov pre signálnu transdukciu, apoptózu, opravu DNA, reguláciu transkripcie, zápalovú reakciu a rastové faktory)
	TruSight Tumor	26	Vybrané exóny onkogénov a všetky exóny tumor-supresorových génov, ktoré sú najčastejšie mutované v karcinómoch pľúc, hrubého čreva, žalúdka, ovárií a v melanómoch; vysoká senzitivita (detekčný limit < 5 % zastúpenia mutovaných alieli vo vzorke nádorového tkaniva)
	TruSight Cancer	94	Gény asociované s predispozíciou k častým (prsniť/ováriá, hrubé črevo) aj zriedkavým dedičným nádorovým ochoreniam

\* databáza Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.omim.org/>

**Tabuľka 2.** Geneticky podmienené ochorenia vhodné na panelové testovanie

Syndrómy Noonanovej spektra (RASopatie), Cornelia de Lange syndróm
Marfanov syndróm a príbuzné ochorenia spojiva
Sticklerov, Ehlers-Danlovov, Alportov syndróm a iné kolagénopatie
Osteogenesis imperfecta a iné skeletálne dysplázie
Bardet-Biedlov, Joubertov syndróm a iné cíliopatie
Polycystická choroba obličiek, Bartterov syndróm
X – viazaná mentálna retardácia
Syndrómy asociované s autizmom
Glykogenózy
Lysozomálne tezaurizmány
Poruchy peroxizómovej biogenézy
Mitochondriálne ochorenia
Epilepsia a s ňou asociované syndrómy
Spinocerebelárne a iné vybrané ataxie
Hereditárna spastická paraplégia
Primárne dystónie a príbuzné syndrómy
Charcot-Marie-Toothova a ďalšie dedičné neuropatie
Spinálna svalová atrofia a vrodené svalové dystrofie
Pletencové svalové dystrofie
Kardiomyopatie a arytmie
Retinálne dystrofie
Vrodená hluchota

ale dostupné ciele testy pre konkrétny gén alebo gény asociované s daným fenotypom (aj pomocou PS) neidentifikovali kauzálnu mutáciu, alebo ak klinický obraz, údaje z rodinnej anamnézy, silne suponujú genetickú etiológiu, ale fenotyp nekorešponduje so špecifickým ochorením, pre ktoré je dostupný cieleňý genetický test. Pred indikáciou ES/WGS testovania musí klinický genetik dôkladne zvážiť aj potenciálny vplyv náhodných nálezov (viď nižšie).

Predtestová konzultácia klinickým genetikom má zahŕňať formálny informovaný súhlas a pacienti majú byť podrobne informovaní o očakávanom výsledku testovania, pravdepodobnosti a type potenciálnych náhodných nálezov a kategóriách výsledkov, ktoré budú, respektíve nebudú uvedené vo výsledkovej správe. Takisto je potrebné pacientom jasne vysvetliť rozdiel medzi výlučne klinicko-diagnostickým a (potenciálne) výskumne orientovaným testovaním, hoci oba typy sa často prekrývajú, resp. dopĺňajú. Nevyhnutným dôsledkom testovania pomocou ES/WGS je identifikácia sekvenčných variantov, ktoré sa nevzťahujú priamo k pôvodnému zámeru testu. Za primárny nález sa považuje patogénny variant (mutácia) v géne, ktorý je relevantný k diagnostickej indikácii NGS testu. Naopak, náhodný alebo sekundárny nález znamená nečakané zistenie patogénnej zmeny v géne zjavne nesúvisiacom s pôvodnou indikáciou. Určité typy náhodných nálezov je možné považovať za dostatočne závažné a ich uvedenie vo výsledkovej správe sa jednoznačne odporúča (10). Medzi významné náhodné nálezy patrí najmä identifikácia variantu asociovaného s predispozíciou k určitému ochoreniu (t. j. vysokým rizikom rozvoja ochorenia v budúcnosti), respektíve zistenie mutácie pre doteraz

klinicky sa neprejavujúce ochorenie a nález nosičstva heterozygotnej mutácie pre recesívne ochorenie. Diagnostické laboratórium poskytuje ES/WGS analýzy by preto malo mať vypracovaný podrobný postup ohľadom posudzovania a uvádzania (reportovania) náhodných nálezov vo výsledkovej správe.

### Diagnostické využitie NGS v klinicko-genetickej praxi

Jednotlivé NGS aplikácie sa v súčasnosti efektívne využívajú v genetickej laboratórnej diagnostike zriedkavých syndrómov, heterogénnych ochorení a pri neinvazívnom prenatálnom testovaní plodu. Za zriedkavé (raritné) ochorenia sa na základe konsenzu považujú choroby s individuálnou populačnou incidenciou menej ako 1 : 2 000, čiže vyskytujúce sa menej ako u 500 jedincov z milióna. Extrémne zriedkavé (ultrararitné) ochorenia majú incidenciu menšiu ako 1 : 50 000, zisťujú sa teda u menej ako 20 jedincov z milióna. Predpokladá sa, že kauzálne mutácie pre raritné ochorenia sa vyskytujú so zodpovedajúcou nízkou frekvenciou, respektíve výlučne u postihnutých jedincov. Tento predpoklad platí najmä pre vysokopenetrantné mutácie, t. j. varianty veľkého účinku asociované s typickým fenotypom, ktoré sa nevyskytujú bežne v populácii, a preto ani v databázach celogenómových analýz alebo polymorfizmov (dbSNP, HapMap, 1000 Genomes, ap.). Neprítomnosť v týchto databázach predstavuje dôležité kritérium pri hľadaní zriedkavého alebo *de novo* variantu pri ES/WGS analýzach. Od uverejnenia pilotnej práce, ktorá pomocou ES identifikovala mutáciu v géne *SLC26A3* a potvrdila pôvodne klinicky nesuponovanú diagnózu vrodenej chloridovej diarrhey (hnačky) (11) bolo publikovaných viac ako 150 ďalších štúdií, ktoré úspešne využili ES/WGS na detekciu recesívnych, dominantných aj *de novo* mutácií.

Geneticky heterogénne ochorenia, ktoré predstavujú jednoznačných kandidátov na využitie PS, môžeme rozdeliť do niekoľkých základných skupín: špecifické genetické syndrómy s historicky známou heterogenitou, syndrómy s mentálnou retardáciou a/alebo autizmom, dedičné metabolické poruchy a ochorenia primárne diagnostikované inými medicínskymi odborníkmi (neuroológia, kardiológia, oftalmológia, ORL). Konkrétne príklady sú uvedené v tabuľke 2.

Zavedenie NGS metód prinieslo potrebnú technológiu aj na vyriešenie technických problémov neinvazívnej detekcie trizómie 21 a ďalších častých aneuploidií plodu z voľnej fetálnej DNA cirkulujúcej v periférnej krvi matky. Po pilotných menších prácach principiálne testujúcich NGS analýzu ďalšie štúdie potvrdili vysokú špecificitu a senzitivitu takéhoto neinvazívneho prenatálneho testovania (NIPT) na rozsiahlych súboroch tehotných žien (12,13). Pri skríningu najčastejších fetálnych aneuploidií NIPT predstavuje alternatívu a perspektívne náhradu multimarkerových biochemických testov a invazívneho odberu fetálnej vzorky. V súčasnosti je už v ponuke viacero komerčne dostupných NIPT testov a ich široké použitie je zatiaľ limitované finančnou náročnosťou pre tehotné probandy. Len ďalší vývoj ukáže, či tento typ testov úspešne nahradí doterajšie postupy prenatálnej genetickej diagnostiky.

### Záver

Postupné rozšírenie NGS analýz v klinicko-diagnostickej praxi bude predstavovať zmenu paradigmy v medicíne a veľmi pravdepodobne

prinesie skutočne „na mieru šitú“ lekársku starostlivosť založenú na poznaní individuálneho rizika. Už dnes je zrejmé, že aplikácie NGS budú mať veľký význam nielen pri genetických ochoreniach s mendelským typom dedičnosti, ale aj pri polygénových a multifaktoriálnych chorobách (14). Preto je potrebné, aby klinickí genetici postupne pomohli integrácii „genomického“ myslenia aj v iných medicínskych špecializáciách.

### Literatúra

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463-7.
2. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol*. 2013;133(8):e11.
3. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapping\\_Reads.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapping_Reads.png)
4. Hui P. Next Generation Sequencing: Chemistry, Technology and Applications. *Top Curr Chem*. 2014;336:1-18.
5. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46.
6. Moorithie S, Hall A, Wright CF. Informatics and clinical genome sequencing: opening the black box. *Genet Med*. 2013;15(3):165-71.
7. Krier JB, Green RC. Management of incidental findings in clinical genomic sequencing. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 9:Unit9.23.
8. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, et al. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. 2011;48(9):580-9.
9. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15(9):733-47.
10. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15(7):565-74.
11. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(45):19096-101.
12. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*. 2012;119(5):890-901.
13. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med*. 2011;13(11):913-20.
14. Thakuria JV, Zaraneek AW, Church GM, et al. Back to the future: from genome to metabolome. *Hum Mutat*. 2012;33(5):809-12.



**MUDr. Mária Geryková Bujalková, PhD.**  
 Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP  
 Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava  
 maria.bujalkova@medirex.sk