

## **Napredno paralelno sekvenciranje DNK**

**Robert Belužić i Oliver Vugrek\***

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Grupa za translacijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska.

Napredne tehnologije određivanja genetskog slijeda, ili 'Massively Parallel Sequencing' ponekad skraćeno samo kao 'NGS' (engl. Next Generation Sequencing) u velikom su zamahu u svijetu te su sve prisutnije u modernim kliničkim laboratorijima, omogućujući ubrzani napredak u području genomske medicine. U odnosu na klasične metode, NGS tehnologija već je smanjila troškove sekvenciranja DNA za nekoliko redova veličina i kontinuirano se razvija. Mogućnost analize čitavog genoma pojedinca pomaže u rješavanju širokog spektra kliničkih scenarija. Također, informacije dobivene NGS tehnologijom mogu biti ključne pri izboru između različitih postojećih terapijskih postupaka, kao i procjeni rizika od oboljenja kod rizičnih skupina, odnosno osoba s već postojećom obiteljskom anamnezom. Međutim, brzi napredak donosi i dodatne izazove koji uključuju strogu validaciju i zaštitu osobnih podataka pri korištenju navedenih tehnologija u kliničkim laboratorijima.

### **Vodič za genetske testove koji se koriste za ispitivanje više gena istovremeno**

Ovaj tekst daje informacije o genetskim testovima koje služe analizi različitih gena odjednom. Informacije vam mogu pomoći da se odlučite za određeni test, te da razumijete rezultate.

#### **Zašto naručiti određeni test?**

Za mnoge osobe s nejasnom genetskom pozadinom, pronalaženje uzroka bolesti ili poremećaja može biti važno. Razumijevanje genetske pozadine može pomoći stručnjacima kako bi Vam mogli dati informacije o napretku stanja, mogućih preventivnih akcija ili sugestije za liječenje. Štoviše, u pojedinim slučajevima se jednostavno smatra korisnim biti upoznat s točnom genetičkom podlogom svoje bolesti.

Tradicionalno, genetski testovi su namijenjeni samo jednom genu. To je značilo da je liječnik morao imati vrlo dobar uvid u potencijalnog (genetskog) uzročnika, kako bi izabrao ispravan test. Nažalost to nije uvijek moguće kada primjerice poremećaj ne odgovara poznatim stanjima, ili kada stanje može biti uzrokovano promjenama u jednom od mnogih gena kandidata. U mnogim slučajevima to je značilo više testova nekoliko gena tijekom određenog vremenskog razdoblja, te je bilo potrebno više vremena i truda laboratorija za dobivanje poželjnih rezultata.

Sa novim tehnologijama, moguće je testirati različite gene u isto vrijeme. Dotične testove obično preporučuju eksperti iz genetike i / ili genetskog savjetovanja.

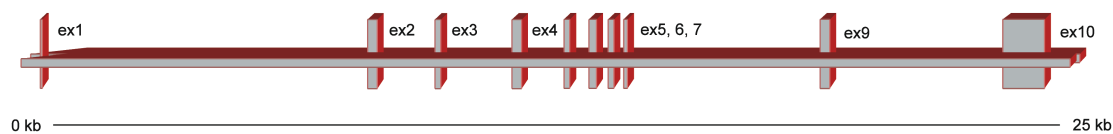
## Što su geni?

Naša tijela su sastavljena od milijuna stanica. Većina tih stanica sadrži kompletan set gena.

Geni djeluju kao skup uputa koji kontroliraju rast i funkciju ljudskog tijela. Oni su također odgovorni za mnoga fizička obilježja, kao što su boja očiju, krvna grupa ili visina. Imamo tisuće gena. Nasljeđuju se dvije kopije svakog gena, po jedan primjerak od majke te jedan primjerak od oca. Geni se sastoje od posebnih dijelova DNA koji sadrže upute za uporabu istih.

DNA se sastoji od četiri različitih biokemijskih građevnih kockica, tzv. nukleobaza ili baza, opisanim s četiri slova, A, C, G i T (adenin, citozin, guanin, timin). Slijed tih slova određuje kakve upute su pohranjene u pojedinim genima. Primjerice, slijed AAGGTC mogao bi dati uputu za smeđu kosu, dok AAGGCT bi mogao dati uputu za plavu kosu. Ponekad dolazi do promjene u redosljedu slova, koja sprječava da gen radi ispravno. Samo jedna takva promjena može uzrokovati gensku bolest zato što gen ne može više osigurati točne upute tijelu. Promjene u genetskom slijedu mogu se nazvati varijacijom ili mutacijom.

Također, postoje različite regije u našoj DNA, i samo određeni dijelovi daju instrukcije tijelu. Naime, između gena su veliki dijelovi DNA koji zasada nisu povezani s određenim funkcijama, i koje nazivamo 'ne-kodirajućom DNA'. Unutar samih gena postoje dijelovi DNA koji sadrže informacije koje su važne kako bi geni funkcionirali (eksoni) i dijelovi DNA koji se ne koriste izravno (introni). Veličina svakog gena znatno varira (slika 1).



**Slika 1:** Shema prikazuje tipičan primjer organizacije gena u introne i eksone (ex1 do ex10 označava eksone 1 do 10). Područja između eksona nazivaju se introni.

## Kakve vrste testova naručiti?

U posljednjih nekoliko godina, broj raspoloživih testova je sve veći te omogućuju genetičaru ispitati veliki broj gena u isto vrijeme.

Dotični testovi su poznati kao testovi naprednog određivanja genetskog slijeda, ili masivno paralelno sekvenciranje, ponekad napisane kao NGS (engl. Next Generation Sequencing, NGS). Sekvenciranje znači odrediti točan redosljed A, C, T i G baze unutar DNA. S tim novim tehnikama, cjelokupni genetski slijed čovjeka može biti očitao ili 'dešifriran' u jednom testu. Tako se određeni slijed DNA može usporediti sa kontrolnim ili referentnim slijedom bilo ljudskog DNA ili drugih vrsta, te zabilježiti sve razlike između dvije ili više sljedova.

## Testiranje genskih panela

Postoje dvije glavne vrste genskih panela.

### A) Ciljano testiranje gena povezana s bolestima u čovjeka

U ovom pristupu se analiziraju specifični geni koji su povezani s određenim genetskim poremećajem u isto vrijeme, ili paralelno. Takav test može pročitati informaciju kodiranu u nekoliko do više stotina gena. Primjeri razvijenih genskih panela su za analizu oštećenja sluha, epilepsije ili bolesti oka, koje mogu biti

uzrokovane mutacijama u jednom ili brojnim zasebnim genima. Naime, iako se radi o analizi nekoliko različitih gena, genski panel je usmjeren na specifično stanje prisutno u obitelji.

#### B) Nasumično testiranje gena povezana s bolestima u čovjeka

Razvijen je panel koji pokriva eksone svih otprilike 2600 gena s poznatom ulogom u određenim oboljenjima. Takav pristup se koristi kada je za razvoj poremećaja odgovoran veliki broj gena, primjerice kod bolesti kognitivnih disfunkcija, odnosno gdje ciljana pretraga nije dala željeni rezultat. Prvenstveno, analiza će se usredotočiti na one gene za koje postoji sumnja da bi mogli biti uključeni u oboljenje za koje je rađeno testiranje. Međutim, u slučaju da to ne otkriva uzročnika, analiza se može proširiti na panele svih 2600 gena kako bi se došlo do točne dijagnoze.

#### **Sekvenciranje eksoma ili genoma (engl. Whole Exome Sequencing, WES; Whole genome Sequencing, WGS)**

Ovo testiranje se primjenjuje kada je dijagnoza vrlo nejasna. Opet, postoje dva glavna tipa.

##### **Sekvenciranje eksoma ili WES**

Iako je cijena određivanja cjelokupnog slijeda DNA čovjeka znatno pala, ponekad ima više smisla gledati samo DNA sekvence u kojim se nalaze upute za građu pojedinih dijelova tijela, primjerice proteina, stanica, tkiva itd. (eksone). Cjelokupno sekvencioniranje svih eksona čovjeka, tzv. eksom otkriva sve kodirajuće dijelove gena, ili dijelova gena u kojima su zapisane instrukcije za građu proteina itd., te pokriva gotovo sve poznate gene ljudskog genoma (20.000-40.000). Isto kao kod nasumičnog testiranja gena, analiza će se usredotočiti na one gene za koje postoji sumnja da bi mogli biti uključeni u oboljenje. Međutim, u slučaju da to ne otkriva uzročnika, analiza se može proširiti na sve sekvencirane gene. Stoga, WES analiza može otkriti varijante gena s još nepoznatim funkcijama ili varijante koji su u vezi s drugom kliničkom slikom.

Slijedom navedenog, WES analiza stvara ogromnu količinu podataka, uključujući informacije o još nepoznatim genima. Tipična analiza obuhvaća istovremeno i roditelje i bolesno dijete kako bi usporedili genetske varijante u genima djeteta s onima u roditelja.

##### **Sekvenciranje genoma ili WGS**

Ova tehnika omogućuje znanstveni pogled na gotovo cjelokupni slijed DNA u detalje: eksona, introna i DNA slijeda između pojedinačnih gena. WGS se sve više koristi u slučajevima vrlo bolesne djece koji nemaju dijagnozu i gdje je nužno osigurati sveobuhvatnu analizu u najkraćem roku. Jedno od ograničenja ovog pristupa je da nastaju ogromne količine genetskih informacija koje zahtijevaju opsežnu i vremenski zahtjevnju interpretaciju stručnjaka.

#### **Što su mogući rezultati?**

Rezultati bi mogli pokazati da je došlo do promjene u uobičajenom slijedu genetskog materijala pronađenog u vašem uzorku (varijanti) ili da ne postoje promjene. Ako se

utvrđi varijanta, genetičari će provjeriti da li je varijanta prisutna u drugim slučajevima koji imaju slične simptome. Naime, svi posjedujemo neke varijacije u genetskom materijalu, te ne postoje dvije osobe koji imaju identičnu sekvencu DNA. Međutim, velika veličina varijacija je potpuno normalna i nema klinički učinak. Svakako, trenutne spoznaje o genetici nisu dovoljne kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi koja od rijetkih varijanti je štetna odnosno bezazlena.

Moguće je dobiti jedan od sljedećih rezultata:

- Varijanta je definitivno uzrok patološkog stanja ili pridonosi tome na neki način. Obično je pronađena i u drugim slučajevima s istim simptomima. Takva varijanta se naziva patogena varijanta ili uzročnik bolesti.
- Dokazana je varijanta, ali nemoguće je s sigurnošću reći da je povezano s simptomima. To se ponekad naziva varijanta nepoznatog značenja, te se moraju pričekati nove znanstvene spoznaje kako bi se došlo do konačne dijagnoze.
- Varijanta je bezazlena, i sa sigurnošću nije uzrok patološkog stanja. To se zove polimorfizam ili benigna varijanta.
- Dokazana je patološka varijanta, ali je povezana s drugim bolestima od onih za koje je testiranje učinjeno (vidi neočekivane rezultate).

U slučaju da je varijanta pronađena ali zbog trenutnog nedostatnog znanja nije moguće uspostaviti dijagnozu, podatci se sačuvaju do novih spoznaja u genetici. Također, u slučaju nepronalska varijante ne može se isključiti mogućnost da ne postoji ipak genetski uzrok za patološko stanje. Mi još uvijek nemamo dovoljno razumijevanje genetike prepoznati temeljne uzroke za sve uvjete. Naime, iako je daleko napredovala u proteklih 20 godina, genetika još uvijek ne može dati sve odgovore na sva patološka stanja odnosno oboljenja.

Svakako korisno za genetičara je proširiti testiranje na druge bliske članove obitelji kako bi povećao izgleda za postizanjem pouzdanog zaključka o tome što varijanta znači u kontekstu simptoma unutar obitelji, primjerice usporedba gena roditelja i djeteta.

Iako je prihvaćanje činjenice kako postoji genetska dijagnoza psihološko ponekad teško, mnogi ljudi osjećaju potrebu da imaju odgovor na pitanja što je odgovorno za njihovo stanje ili simptome. Također se može primijetiti da su nejasni rezultati analiza najgori mogući scenarij, što izaziva veliku frustraciju kod pacijenata.

### **Jesu li mogući neočekivani rezultati?**

Da.

Naime, testovi su namijenjeni za širok spektar gena, i moguć je pronalazak varijante gena koja bi mogla izazvati sasvim druge simptome ili bolest. Idealni postupak je da genetičar ili liječnik s pacijentom o tome razgovara prije obavljanja testa. Općenito, liječnik može smatrati da je korisno izlaziti sa svim rezultatima koji bi u budućnosti mogli utjecati na zdravlje, ili zdravlje svojih potomaka. Međutim, u pravilu bi se trebalo prije pristanka na testiranja definirati da li pacijent želi dobiti uvid u cjelokupnu genetsku informaciju.

Izglede za pronalaženje neočekivanih rezultata razlikuju se između različitih testova i najniža je u ciljanim genskim panelima. U ostalim testovima također je vrlo niska dok se analize usmjerava na stanje za koje je zatražen test (uvjet je ciljano filtriranje rezultata). U ciljanoj WES analizi izgledi za pronalaženje neočekivane varijante procjenjuje se na jednu u svakih 100 analiza, no kada se nasumično pretražuje eksom broj neočekivanih varijanti raste na 3 svakih 100 testova.

Primjerice, neočekivani nalaz je kada se testira mutacija koja uzrokuje nasljednu vrstu karcinoma debelog crijeva, no usput je u testiranoj osobi pronađena mutacija koja može uzrokovati cističnu fibrozu kod svojih potomaka.

Iako neočekivani rezultati mogu biti potencijalno uznemirujući, dugoročno gledano mogu omogućiti preventivne mjere te umanjiti ili spriječiti zdravstvene probleme u obitelji.

### **Na koje vrste neočekivanih rezultata se može naići?**

Naime, rezultat može utvrditi genetsku varijantu za koju je poznato da uzrokuje određene bolesti u kasnijem životnom razdoblju, primjerice povećan rizik za srčane bolesti ili raka. Razlikuju se "djelotvorni" i "ne-djelotvorni" nalazi.

Djelotvorno znači da je dokazani rizik za zdravlje, no liječnik može savjetovati daljnju obradu koje može biti korisno za sprečavanje ili liječenje stanja. Ako je rezultat nedjelotvoran, tada postoji povećan rizik za zdravlje, ali trenutno ne postoji odgovarajuće liječenje.

Druga vrsta neočekivanog rezultata može biti varijanta koja ne utječe na osobno zdravlje, ali može dovesti do povećanog rizika kod potomaka. Na primjer, neke genske bolesti (tzv. autosomno recesivna) nastaju kada dijete naslijedi patogenih varijanti od oba roditelja te nema normalnu kopiju dotičnog gena. Nosioци su u pravilu zdravi jer imaju osim neispravne kopije i jednu normalnu kopiju gena. Genetski test može ukazivati da ste nositelj varijante, i u pravilu će se testiranim osobama omogućiti uvid u informacije kako bi razumjeli što to znači za njihovu obitelj i buduću djecu. Dodatne informacije o autosomno recesivnom nasljeđivanju navedeni su u popisu literature.

### **Postoji li rezultati koji utječu na druge članove u obitelji?**

Teoretski svaki genetski test može generirati rezultate koji mogu utjecati na krvne srodnike. Naime, u slučaju da se radi o naslijeđenom poremećaju važno je biti u posjedu podataka koji su od važnosti za aktualnu ili buduću djecu, braće i sestara ili roditelja. Genetsko savjetništvo upravo služi objašnjavanju takvih situacija.

### **Pravila korištenja uzorka**

U nekim slučajevima poželjno je sačuvati genetski uzorak i eventualno koristiti ubuduće za istraživačke svrhe. Tada liječnici moraju tražiti pristanak pacijenta u pisanom obliku.

### **Reference**

1. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P et al: ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med 2013; 15: 733-747.