

Sekvenování nové generace a jeho aplikace v diagnostice neuromuskulárních onemocnění

Jana Zídková¹, Jana Haberlová², Tereza Kramářová¹, Lenka Fajkusová¹

¹ Centrum molekulární biologie a genetiky, Fakultní nemocnice Brno

² Klinika dětské neurologie, Fakultní nemocnice Motol, Praha

SOUHRN

Neuromuskulární onemocnění (NMD) jsou klinicky a geneticky heterogenní skupinou onemocnění. V současné době je identifikováno 608 genů asociovaných s různými typy NMD. Většina těchto onemocnění se řadí mezi vzácná s velmi nízkou prevalencí.

Pokrok v identifikaci genů asociovaných s NMD lze připisat technologickému vývoji v oblasti sekvenování nové generace (NGS) a cenové dostupnosti tohoto metodického přístupu. Z hlediska šíře analyzované DNA je možné aplikace NGS rozdělit na analýzu (a) vybraného souboru genů, (b) exomu a (c) genomu. Identifikace patogenních variant vede k výraznému posunu v chápání etiopatogeneze onemocnění, umožňuje predikci průběhu onemocnění, event. jeho cílenou léčbu, která může být specifická pro jednotlivé typy NMD nebo dokonce pro jednotlivé patogenní sekvenční varianty.

Klíčová slova: Neuromuskulární onemocnění – NGS – diagnostika

Next generation sequencing and its application in the diagnostics of neuromuscular diseases

SUMMARY

Neuromuscular diseases (NMDs) are a clinically and genetically heterogeneous group of diseases. Currently, 608 genes associated with different types of NMD have been identified. Most of these diseases are rare with a very low prevalence. Advance in the identification of genes associated with NMD can be attributed to technological development in an area of next generation sequencing (NGS) and the affordability of this methodical approach. NGS applications can be divided into analysis of (a) a selected set of genes, (b) an exom, and (c) a genome. The identification of pathogenic variants leads to a significant shift in the understanding of the etiopathogenesis of the disease, allows the prediction of the course of the disease, or its targeted treatment, which may be specific for individual types of NMD or even for particular pathogenic sequence variants.

Keywords: Neuromuscular diseases – NGS – diagnostics

Cesk Patol 2021; 57(3): 150–153

Neuromuskulární onemocnění (NMD) jsou klinicky a geneticky heterogenní skupinou onemocnění rozvíjející se v důsledku poruchy některé ze struktur motorické jednotky, kterou tvoří motoneuron, periferní nerv, nervosvalová ploténka a sval. Neuromuskulární onemocnění postihují všechny věkové skupiny, některá jsou typicky kongenitální, jiná začínají v dětství nebo až v dospělosti. Neuromuskulární onemocnění mohou být získaná v důsledku zánětu, ischemie, úrazu nebo geneticky podmíněná. V současné době je identifikováno 608 genů asociovaných s různými typy NMD (www.musclegenetable.fr). Většina těchto onemocnění se řadí mezi vzácná s velmi nízkou prevalencí.

Pokrok v identifikaci genů asociovaných s NMD lze připisat technologickému vývoji v oblasti sekvenování nové generace (NGS) a cenové dostupnosti tohoto metodického přístupu. NGS je založena na masivní paralelní sekvenaci mnoha fragmentů DNA v jednom sekvenačním běhu. Z hlediska šíře analyzované DNA je možné aplikace NGS rozdělit na analýzu (a) vybraného souboru genů, (b) exomu a (c) genomu.

Vybraný soubor genů - tzv. panel, se zaměřuje na skupinu genů asociovanou se specifickým fenotypem. Panel může zahr-

novat několik desítek ale i stovek analyzovaných genů. Panely jsou rychlou metodou pro hledání genových variant spojených se specifickými onemocněními. Výhodou panelu oproti sekvenaci exomu nebo genomu je vyšší pokrytí analyzované sekvence, což umožňuje i jednoznačnější identifikaci variant, zvláště pak rozsáhlých delecí a duplikací.

Sekvenace exomu (WES, whole exome sequencing) analyzuje kódující oblast genomu, tedy přibližně 2 % z jeho celkové DNA. Nicméně přibližně 85 % patogenních sekvenčních variant způsobujících onemocnění se nachází právě v kódujících oblastech. WES analyzuje přibližně 22 000 genů kódujících proteiny a kromě genů s popsanou asociací s lidskými chorobami zahrnuje i geny, u kterých tato asociace doposud popsána nebyla.

Sekvenace genomu (WGS, whole genome sequencing) je necílená analýza kódujících i nekódujících oblastí DNA. WGS generuje velké množství sekvenačních dat, což klade vysoké nároky na bioinformatické zpracování a následnou interpretaci identifikovaných variant. WGS má na rozdíl od sekvenace exomu spolehlivější pokrytí sekvence s větší uniformitou i když nižším počtem čtení. V současné době není WGS používán v rutinní diagnostické praxi. S poklesem nákladů na sekvenování a s identifikací populačně specifických variant pro tzv. filtrování představuje ale WGS budoucí „standard“, tj. jediný genetický test nahrazující jakékoliv další genetické analýzy (1,2).

Pro kvalitu NGS je důležité *pokrytí* analyzované sekvence, tzn. počet čtení daného nukleotidu, které je obvykle u panelu řádově vyšší než u WES. Pokrytí však v praxi nebývá rovnoměrné. Tato nerovnoměrnost může být způsobena mnoha různými faktory, například zastoupením jednotlivých bází v daném úseku DNA.

✉ Adresa pro korespondenci:

Mgr. Jana Zídková, Ph.D.

Centrum molekulární biologie a genetiky

Fakultní nemocnice Brno

Jihlavská 20, 625 00 Brno

tel: +420 532 234 624

e-mail: zidkova.jana@fnbrno.cz