

Sekvenování nové generace

Eva Froňková

Laboratoř molekulární genetiky CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

SOUHRN

Sekvenování nové generace, nazývané také masivně paralelní sekvenování (MPS), je v současnosti nejrychleji se rozvíjející metodou molekulární genetiky, která přinese zlom v oblasti personalizované medicíny. V tomto přehledu stručně popisujeme hlavní typy MPS, kterými jsou celogenomová a exomová sekvenace, sekvenace transkriptomu a ampliconové sekvenování. Dále je uveden souhrn výhod, nevýhod a možných aplikací technologií nabízených v současnosti v České republice.

Klíčová slova: masivně paralelní sekvenování – sekvenování nové generace – exom – transkriptom – ampliconové sekvenování

Next-generation sequencing

SUMMARY

Next generation or massive parallel sequencing (MPS) is a rapidly advancing method in molecular genetics that will bring significant changes in the personalized medicine field. In this review we briefly describe major types of MPS, including whole-genome, -exome, -transcriptome and amplicon sequencing. We also present an overview of the advantages, drawbacks and possible applications of sequencing technologies available in the Czech Republic.

Keywords: massive parallel sequencing – next generation sequencing – whole-genome – exome – transcriptome – amplicon sequencing

Cesk Patol 2013; 49(3): 129–132

Sekvenování nové generace, nazývané také **masivně paralelní sekvování (MPS)**, je nejmodernější a nejrychleji se rozvíjející metodou molekulární genetiky, která způsobí zásadní zlom ve výzkumu patologických stavů a především v oblasti tzv. personalizované medicíny. Pomocí stále výkonnějších přístrojů je MPS schopno v jediném vyšetření generovat až stovky milionů různých nukleotidových sekvencí (v angličtině tzv. „reads“). Náklady na MPS velmi rychle klesají; těžko by někdo ještě před několika lety čekal, že v roce 2012 bude možno přečíst celý genom jedince během několika dnů za cenu menší než 10 000 USD. Aplikace metod MPS bude znamenat vedle nových diagnostických možností zároveň i jistou změnu v nárocích na interpretaci výsledků vyšetření. V laboratorní práci bude třeba stále více využívat dovedností z oblasti bioinformatiky s nutností alespoň základní orientace v principech generování a analýzy dat, softwarových aplikací a systému internetových databází. V následujícím přehledu chceme shrnout současné možnosti MPS s vědomím, že nabídka a dostupnost metod na trhu se neustále mění a informace rychle ztrácejí svoji aktuálnost. Rychlý vývoj zároveň znamená neustálenost českých pojmenování, proto vždy uvádíme příslušné anglické termíny.

APLIKACE

Vysoký výkon současných sekvenátorů lze použít v rozsáhlém spektru aplikací od pokrytí rozsáhlé oblasti, např. celého genomu

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Eva Froňková, Ph.D.
Laboratoř molekulární genetiky CLIP
Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
tel.: 22443 6487, fax: 224436521
eva.fronkova@lfmotol.cuni.cz

jedince („**ultraširoká sekvenace**“), po sekvenaci pouze jediné oblasti s vysokým počtem přečtení v případě tzv. ampliconového sekvenování („**ultrahluboká sekvenace**“) (tab. 1).

Celogenomová sekvenace („whole-genome sequencing“, obr. 1A) poskytuje nejkompaktnější obraz o genomu – kromě genů i o variacích v nekódujících oblastech, potenciálních chromozomálních translokacích, delecích a amplifikacích (tzv. „copy number variants“, CNV). Cílem je pokrýt každý nukleotid v genomu obvykle 30 – 40x, část přečtených sekvencí je ale ztracena kvůli chybám sekvenace nebo špatnému mapování k referenčnímu genomu. Nevýhodou zůstává cena a obrovská komplexita získaných dat. U solidních nádorů je sekvenování problematičtější než např. u vzorků krve z důvodu nerovnoměrné infiltrace vzorku nádorovými buňkami a časté diverzity s přítomností více klonů s různými genomy. Toto lze částečně překonat zvýšením počtu čtení a úpravou algoritmů pro analýzu dat (1). Přítomnost nekrotických buněk nebo fixace materiálu rovněž způsobuje horší kvalitu izolované DNA. Proto je výhodné počítat s případnou genetickou analýzou a zajistit izolaci materiálu z čerstvého vzorku. V jednom lidském genomu jsou odhadem 3 – 4 miliony zděděných variací a stovky CNV (2). To znamená, že u nádorového genomu bude většina objevených variací zděděnými polymorfismy a ne získanými mutacemi. Kvůli tomu je důležité u vzorků nádorů zároveň sekvenovat normální tkáň pacienta (např. remisní vzorek krve u leukémií). Po „odfiltrování“ zděděných variant zbývají řádově tisíce alterací, jejichž množství se velmi liší mezi jednotlivými typy nádorů. Pro určení, které mutace jsou klinicky důležité a které jsou pouze „vedlejším produktem“ nádorové transformace (tzv. „driver“ a „passenger mutations“), lze využít porovnání většího souboru vzorků od různých pacientů nebo databáze, které predikují efekt záměny aminokyseliny na strukturu a funkci proteinu (např. SIFT, PolyPhen).

Zjednodušenou variantou je tzv. „**exomové sekvenování**“, obr. 1B. Jako vstupní materiál slouží také DNA. Díky různým způsobům