

Sekvenování nové generace – nástroj vědy či rutinní patologie?

Lenka Krsková¹, Markéta Kalinová¹, Tereza Němečková¹, Barbora Šípalová¹, Marcela Mrhalová¹, Miroslav Koblížek¹, Jan Balko¹, Jaromír Háček¹, Daniela Nováková-Kodetová¹, Aleš Vícha², Petr Brož^{2,3}, Michal Zápotocký², Edita Kabíčková², Josef Zámečník¹

¹ Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

² Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

³ Biosys s.r.o., Ústí nad Labem

SOUHRN

Molekulární metody pro detekci translokací byly postupně začleněny do rutinní diagnostiky nádorových onemocnění. Konvenční metody, jako je fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a reverzně transkriptázová-PCR, však mají i některé nevýhody. Sekvenování nové generace (NGS) může poskytnout citlivou detekci alterací mnoha genů.

RNA NGS na principu Anchored multiplex PCR se ukázalo jako rychlý a snadno analyzovatelný přístup pro laboratoře rutinní diagnostiky. Archer FusionPlex panely jsou přínosné jak v diagnostice nádorů, tak v identifikaci nových fúzních genů.

NGS je užitečný nástroj při identifikaci cílitelných molekulárních změn (bodové mutace, fúzní geny atd.). U pacientů s pokročilým onemocněním může NGS napomoci k zařazení těchto pacientů k léčbě na základě stanovení rizikových markerů (risk adapted therapy) a/nebo při průkazu léčebného cíle k cílené léčbě.

Klíčová slova: Sekvenování nové generace (NGS) – somatické mutace – fúzní geny – cílená terapie

Next generation sequencing – a science tool or routine pathology?

SUMMARY

Molecular assays for translocation detection in different tumors have gradually been incorporated into routine diagnostics. However, conventional methods such as fluorescence in situ hybridization (FISH) and reverse transcriptase-PCR come with several drawbacks.

Next-generation sequencing (NGS) can provide in-depth detection of numerous gene alterations.

The anchored multiplex PCR assay proved to be a fast and easy-to-analyze approach for routine diagnostics laboratories. Next-generation sequencing-based anchored multiplex PCR technique (Archer FusionPlex Panels) is beneficial in both diagnosis for patient care and in identification of a novel fusion breakpoint in tumors.

NGS is useful in identifying targetable molecular changes (point mutations, fusion genes, etc.) in tumors that can serve as a rationale for inclusion of patients with advanced disease in ongoing clinical trials and allow for better risk stratification.

Keywords: Next generation sequencing (NGS) – somatic mutations – fusion genes – targeted therapy

Cesk Patol 2021; 57(3): 136–143

Sekvenování nové generace (**NGS** next-generation sequencing) nebo také masivně paralelní sekvenování (MPS) je metodika, která přináší obrovský rozvoj v oblasti personalizované medicíny. NGS je na rozdíl od klasické Sangerovy sekvenační metody schopno detekovat přidávání bází jednu po druhé a zároveň sekvenovat tisíce až miliony rozdílných molekul DNA či cDNA (komplementární DNA převedená z RNA) najednou během jednoho sekvenačního běhu.

Metoda NGS je již nedílnou součástí řady pracovišť patologie. Jde především o univerzitní zařízení a prediktivní laboratoře, kde se stala rutinní metodou vyšetřování somatických změn v nádorových buňkách. Počátek využití somatického NGS v rámci terapeuticko-indikační patologie je spjat se začátkem testování somatických mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* díky objevu cílené terapie PARP inhibitory u pacientek s ovariálním karcinomem. Pokud bychom geny *BRCA1/2* testovali klasickou Sangerovou sekvenační metodou, trvalo by nám to při

počtu více než 20 exonů každého z genů minimálně čtvrt roku. Mutační analýza v rámci indikace k terapii však musí být rychlá, přesná a musí splňovat mezinárodní kritéria.

NGS technologie však nenachází využití jen v rámci prediktivního testování, ale napomáhá i v diagnostice onemocnění, určení prognózy, k detekci minimální reziduální/diseminované nemoci (MRN/MDN) (1), či umožňuje definovat jednotlivé subklony ať už nádorových buněk nebo buněk imunitního systému, případně nádorového mikroprostředí. Při testování somatických mutací je vždy důležitá citlivost metody. U technologie NGS dosahujeme požadované citlivosti pomocí vysokého počtu čtení.

Molekulární patologie využívá primárně vzorky nádorových tkání, v menší míře se vyšetřuje i tzv. tekutá biopsie k detekci volné nádorové DNA (ctDNA), případně vzorky kostní dřeně (KD)/ periferní krve (PK) k monitoraci MRN/MDN.

Tekutá biopsie znamená odběr PK u pacientů se solidními nádory, ve kterých analyzujeme přítomnost ctDNA v krevní plazmě. Mechanismus uvolňování ctDNA do krve je spjatý s apoptózou a nekrotizací nádorových buněk a zčásti jde i o aktivní sekreci. Vyšetření v rámci identifikace molekulárních změn nádoru se standardně provádí z tkáně histologicky verifikovaného primárního nádoru a/nebo z metastáz. V některých případech však není tato tkáň dostupná. Vzhledem k tomu, že odběr PK je nenáročný, s minimální zátěží pro pacienta a lze ho provádět opakovaně,

✉ Adresa pro korespondenci:

RNDr. Lenka Krsková, Ph.D.

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol

V Úvalu 84, Praha 5, 15006

tel: 224435634