

Jak šel čas s masivním paralelním sekvenováním na ÚBLG Albertov

Veronika Elišáková, Kateřina Hirschfeldová, Lena Obeidová, Bohumila Janošíková, Markéta Urbanová, Aleš Hořínek, Eva Pazourková, Jitka Štekrová

Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

Úvod: Historie masivního paralelního sekvenování (MPS) na Ústavu biologie a lékařské genetiky na Albertově se datuje od roku 2011. V rámci výzkumu i rutinní diagnostiky jsme od té doby vyzkoušeli různé postupy MPS. I když je tato metoda sama o sobě velmi efektivní, ne všechny přístupy jsou stejně účinné. Především analýza oblastí pseudogenů a kódujících repetitivních sekvencí zůstává stále velmi problematická. Vliv na výběr vhodného postupu MPS analýzy má i frekvence konkrétního onemocnění v populaci a míra heterogenity jeho genetické složky. Pro diagnostiku častých onemocnění s jasně definovaným, malým počtem kauzálních genů mohou být výhodné menší panely, naopak v diagnostice vzácných onemocnění či onemocnění s velmi heterogenní genetickou složkou (nebo nejednoznačnými fenotypovými projevy) může být spíše využit přístup exomového sekvenování.

Cíle: Cílem naší práce je nalézt optimální cestu pro dosažení klíčových kritérií rutinní praxe: zachování krátké doby odezvy, vysoké validity a senzitivity analýzy a rentability vyšetření.

Metodika: Metodika i kvalita nabízených postupů přípravy knihoven pro masivní paralelní sekvenování se od roku 2011 významně proměnila. V naší laboratoři bylo období MPS zahájeno pyrosekvenováním vlastních amplikonových a později Multiplicomových knihoven na platformě GS-Junior, které jsme roku 2016 nahradili sekvenováním na platformě Illumina Miseq a později i NextSeq. V rámci výzkumu i rutinní praxe jsme pracovali s panely na zakázku i katalogovými knihovnami obohacenými metodou hybridizace, a to jak systémem SeqCap, tak SureSelect. Ale nezanevřeli jsme ani na amplikony a vytvořili si interdisciplinární panel QIAseq pro rutinní diagnostiku. Během let jsme si rovněž vyzkoušeli různé způsoby fragmentace DNA: nebulizaci, sonikaci i enzymatické štěpení, které se nakonec stalo metodou naší první volby.

Výsledky: Tak jak se masivní paralelní sekvenování vyvíjelo, začalo i u nás postupně přecházet z výzkumných projektů do rutinní praxe. Od původní amplikonové knihovny jednoho genu jsme dospěli k panelovým analýzám pokrývajícím desítky, stovky, a dokonce tisíce genů. Nově nastavený víceúrovňový koncept využívá menší panely pro cílenou diferenciální diagnostiku vybraných diagnóz. Tuto základní úroveň konceptu doplňuje rutinní analýza 4800 genů klinického exomu (určeno pro vzácná a heterogenní onemocnění) a analýza kompletního exomu, která zatím zůstává na výzkumné bázi. Vytvořili jsme rovněž postup na přípravu knihovny ze směsi vlastních amplikonů určené pro krátká čtení.

Závěr: Nabyté zkušenosti s metodikou MPS nám umožnily vytvořit víceúrovňový koncept rutinní diagnostiky, jehož zavedení do praxe nám dovoluje zvýšit efektivitu diagnostických vyšetření v naší laboratoři.

Podporováno programem COOPERATIO, vědní obory „207036 Medical Diagnostics and Basic Medical Sciences“ a „207034 Internal Disciplines“ a projektem MZ ČR-RVO-VFN64165.