Metode sekvenciranja novih generacija u dijagnostici

Kaltak, Melita

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:027412

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

METODE SEKVENCIRANJA NOVIH GENERACIJA U DIJAGNOSTICI

NEXT GENERATION SEQUENCING IN DIAGNOSTIC

SEMINARSKI RAD

Melita Kaltak
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: doc. dr. sc. Petra Korać

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1.UVOD.....2

2.METODA SEKVENCIRANJA PRVE GENERACIJE – SANGEROVA METODA SEKVENCIRANJA…….....3

3.METODE SEKVENCIRANJA DRUGE GENERACIJE.....5

4. METODE NGS-A U DIJAGNOSTICI.....10

4.1 KROMOSOMSKE NEPRAVILNOSTI I NASLJEDNE BOLESTI.....10

4.2 ČESTE BOLESTI.....11

4.3 MALIGNI TUMORI.....12

5.ZAKLJUČAK.....15

6.LITERATURA.....16

7.SAŽETAK.....17

8.SUMMARY.....18

1.UVOD

Oswald Theodore Avery 1944. godine pokazuje da je deoksiribonukleinska kiselina (DNA) gradivna komponenta gena. James D. Watson i Francis Crick 1953.godine objavili su da je DNA polimer oblika dvostruke uzvojnice, dvije vrpce spiralno omotane jedna oko druge , od kojih svaka sadrži nanizane nukleotide, međusobno povezane vodikovim vezama među dušičnim bazama. Slijedilo je postavljanje centralne dogme molekularne biologije koja kaže da je protok genetskih informacija jednosmjeran, od DNA do proteina, sa RNA (mRNA) kao intermedijerom. Kopiranje genetskih informacija iz DNA u RNA naziva se transkripcija, uz daljnju pretvorbu u protein procesom koji nazivamo translacija. (1)

1977. paralelno su objavljene dvije metode sekvenciranja DNA : Maxam-Gilbertova metoda sekvenciranja i Sangerova metoda sekvenciranja. Prva metoda, Maxam-Gilbertova metoda sekvenciranja, koristi kemikalije za cijepanje DNA molekule na određenim mjestima, što generira niz fragmenata koje se razlikuju za jedan nukleotid. Drugu metodu sekvenciranja su razvili Fred Sanger i Alan Coulson, koja uključuje enzimsku sintezu DNA lanaca koji završavaju modificiranim nukleotidom. Analiza fragmenata je slična kod obje metode i uključuje gel elektroforezu i autoradiografiju (pod pretpostavkom da se koristi radioaktivni obilježivač). Enzimska metoda danas gotovo u potpunosti zamjenjuje kemijsku metodu, iz razloga jer je bila moguća automatizacija te metode, te ista nije koristila opasne kemikalije koje su se upotrebljavale u kemijskoj metodi. Deset godina kasnije, pojavljuju se AB370 I AB3730xl, instrumenti koji na temelju kapilarne elektroforeze sekvenciraju odsječak molekule DNA. (2)
Do ranih godina 21.stoljeća sekvencirani su genomi nekoliko organizama: trideset osam bakterija, jedne gljive (*Saccharomyces cerevisidae*), dva beskralježnjaka (*Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*) te jedne biljke (*Arabidopsis thaliana*) Unatoč uspješnim počecima sekvenciranja genoma, sekvenciranje ljudskog genoma je bilo izazov, budući da je veći od zbroja svih iščitanih genoma do tada i sadržava velik broj ponavljajućih sekvenci.(3)

Tehnologije sekvenciranja novih generacija (NGS, od eng. *next generation sequencing*) razvijaju se upravo tijekom projekta sekvenciranja ljudskog genoma pa su tako u posljednjih 15-tak godina razvijene tehnologije koje omogućavaju veći broj očitanja paralelno sekvenciranih uzoraka u kraćem vremenu uz drastično manji trošak nego krajem prošlog stoljeća. Takav brzi razvoj i relativno niska cijena, omogućili su upotrebu NGS-a u temeljnim znanstvenim područjima, te istraživanjima u kliničkoj dijagnostici, agrogenetici i forenzici. U ovom radu opisat ću temeljnu podjelu metoda sekvenciranja, tehnologije današnjih metoda sekvenciranja, te pojasniti kako se te metode danas koriste u dijagnostici.(4)

2. METODA SEKVENCIRANJA PRVE GENERACIJE – SANGEROVA METODA SEKVENCIRANJA

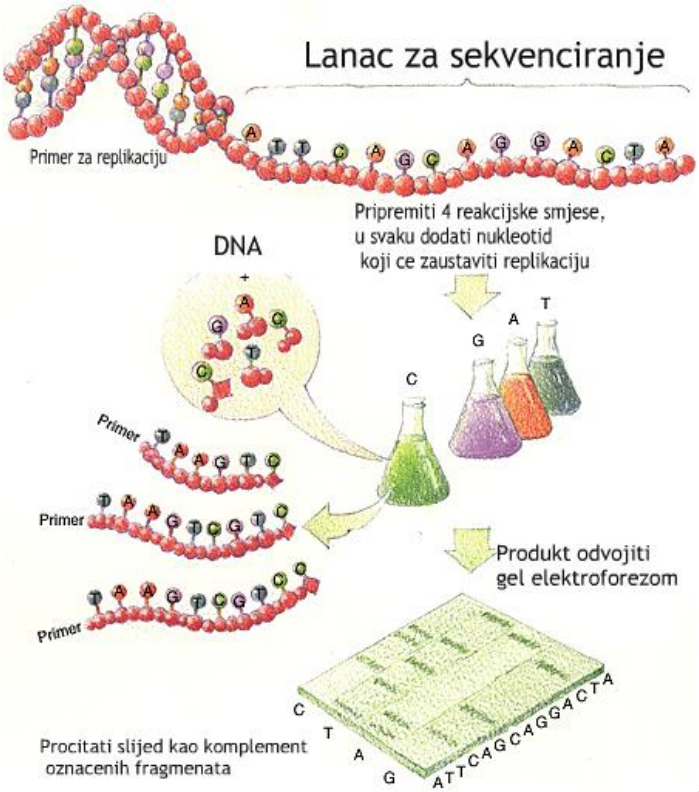
Frederick Sanger 1977.godine razvija metodu sekvenciranja molekule DNA koja se temeljila na metodi terminacije sinteze lanca (od eng. chain termination method). Metoda je zahtijevala razdvajanje jednolančanih molekula DNA koje su se razlikovale u jednom nukleotidu pomoću gel elektroforeze. Uz pomoć svojih suradnika, Sanger sekvencira genom bakteriofaga Ø X174 veličine 5375 nukleotida, pritom koristeći 2,3-dideoksinukleotid trifosfate (ddNTP) i DNA polimerazu. Specifičnost ddNTP-a je odsustvo hidroksilne skupine na 3'kraju, što onemogućuje stvaranje fosfodiesterske veze. DNA polimeraza ne razlikuje dNTP i ddNTP, stoga se ddNTP mogao ugraditi u rastući lanac molekule DNA vezanjem 5' fosfatne skupine i 3'hidroksilne skupine posljednjeg nukleotida u lancu. Međutim, ugradnjom ddNTP-ova u rastući lanac, dolazi do završetka sinteze lanca zbog nedostatka 3' hidroksilne skupine. Budući da se u pokusu nalaze milijarde molekula DNA, odsječak novo sintetiziranog lanca može biti zaustavljen na bilo kojoj poziciji. To rezultira većim brojem molekula DNA različite duljine. (5)

Princip rada automatiziranog sekvencera je prepoznavanje zadnjeg ddNTP-a u lancu koji je obilježen fluorescentnom bojom. Računalni program interpretira podatke te iscrtava elektroferogram sa obojenim vrhovima predstavljajući tako svako slovo u nukleinskom slijedu. Simulirana slika čita se s dna prema vrhu, počevši s najmanjim fragmentom DNA.

Pojava automatiziranog DNA sekvencera 1998.godine pridonijela je završetku Projekta ljudskog genoma (HGP od eng. Humane Genome Project) u travnju 2003.godine, uz pomoć odgovarajućih softvera i Sangerove metode. HGP je međunarodni projekt znanstvenog istraživanja s ciljem utvrđivanja slijeda parova baza koje čine ljudsku DNA, identifikacije i mapiranja svih gena ljudskog genoma. Ostaje do dan danas kao najveći svjetski kolaborativni biološki projekt. Planiranje projekta započelo je 1984.godine sa strane američke vlade, a službeno je započeo 1990. Projekt je trajao više od 10 godina, te koštao 3 milijarde $. Razvoj NGS metoda učinilo je sekvenciranje prosječnom znanstveniku pristupačnijim i dostupnijim procesom.

Sangerova metoda smatra se metodom sekvenciranja prve generacije (od eng. "*first-generation" sequencing*), dok metode sekvenciranja druge i

treće generacije nazivamo metodama sekvenciranja novih generacija (od eng. *"next-generation" sequencing*). (6)



Slika 1.Sangerova metoda sekvenciranja (www.ilbe.com/6582250523)

3.METODE SEKVENCIRANJA DRUGE GENERACIJE

Tijekom projekta sekvenciranja ljudskog genoma došlo je do razvoja novih tehnika za sekvenciranje, koje su s vremenom prikazivale rezultate u sve kraćem vremenskom periodu i postajale sve učinkovitije. Tri su prednosti koje skup tehnologija NGS imaju nad Sangerovom metodom. Prva prednost se temelji na načinu pripremanja uzorka; umjesto kloniranja fragmenata DNA, knjižnice NGS-a (od eng. *library*) pripremaju se u staničnom sustavu. Drugo, umjesto stotine, tisuće do više milijuna reakcija sekvenciranja odvija se istovremeno. Treća prednost je eliminacija elektroforeze za odvajanje fragmenata DNA. Kao rezultat tih prednosti, NGS tehnologije omogućuju sekvenciranje čitavog genoma nekog organizma, transkriptoma ili egzoma iz uzorka pacijenta u kratkom vremenu.

Osim što njima možemo sekvencirati po potrebi i cijeli genom nekog organizma, NGS tehnologije iziskuju znatno manji financijski utrošak za razliku od metode sekvenciranja prve generacije, što je učinilo mogućim korištenje tih metoda u kliničkim laboratorijima, te istraživanje genoma i u manjim laboratorijima. Uz to, NGS metode iščitavaju veliku količinu podataka u kratkom vremenskom roku zbog milijuna reakcija sekvenciranja koje se odvijaju istovremeno. (4, 6, 7)

Većina metoda sekvenciranja druge generacije temelji se na tehnici „sekvenciranja sintezom“ (od eng. *sequencing by synthesis*), koju su začeli Shankar Balasubramanian i David Klenerman na sveučilištu Cambridge 1998. godine. Sekvenciranje sintezom slično je Sangerovoj metodi sekvenciranja, međutim, koristi modificirane dNTP-ove koji sadrže terminator koji blokira daljnju polimerizaciju, na taj način enzim polimeraza može dodati samo jednu bazu na rastući lanac DNA. Terminator sadrži fluorescentne markere koji se mogu detektirati pomoću kamere.(8)

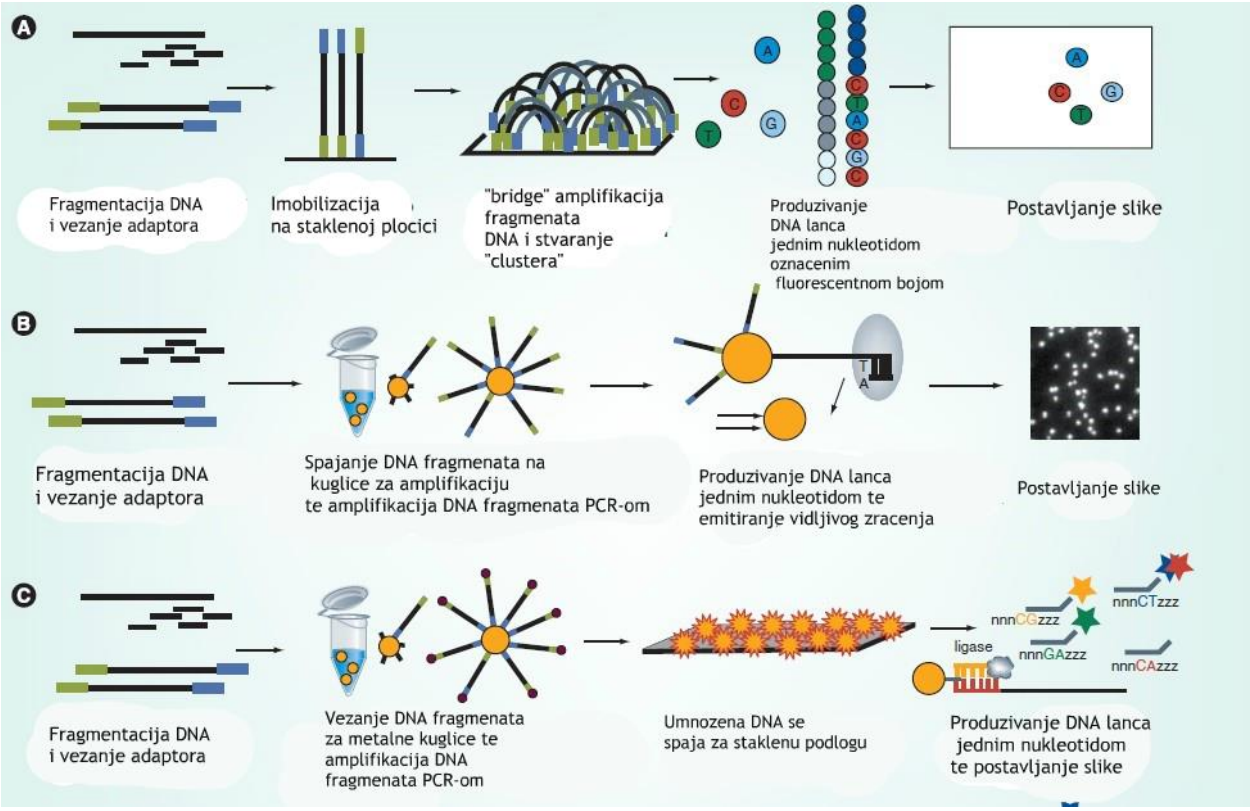
Komercijalno je dostupno nekoliko različitih NGS tehnologija. Prva NGS tehnologija koja se temelji na metodi pirosekvenciranja je sustav Roche 454 koji je predstavila kompanija Life Science (Roche) 2005.godine. Pirosekvenciranje se temelji na detekciji pirofosfata koji se oslobađaju prilikom ugradnje nukleotida. Roche sustav 454 omogućuje dobivanje i do 14 gigabaza podataka po čitanju. Knjižnica DNA sa 454-specifičnim adapterima denaturira se u jednolančani oblik pa se svi fragmenti amplificiraju. Komplementaran dNTP spaja se za DNA molekulu uz pomoć ATP sulfurilaze, luciferaze, luciferina, DNA polimeraze i adenozin 5' fosfosulfata i dolazi do oslobađanja pirofosfata. Pirofosfat transformira ATP te pretvara luciferin u oksiluciferin i oslobađa vidljivu svjetlost. U usporedbi s ostalim sustavima, Roche sustav ima nekoliko prednosti, a najveća je njegova brzina: od početka sekvenciranja do kraja rada je

potrebno samo 10 sati, a fragmenti DNA koje je moguće sekvencirati su duljine od 300-500 nukleotida. (2, 4, 6)

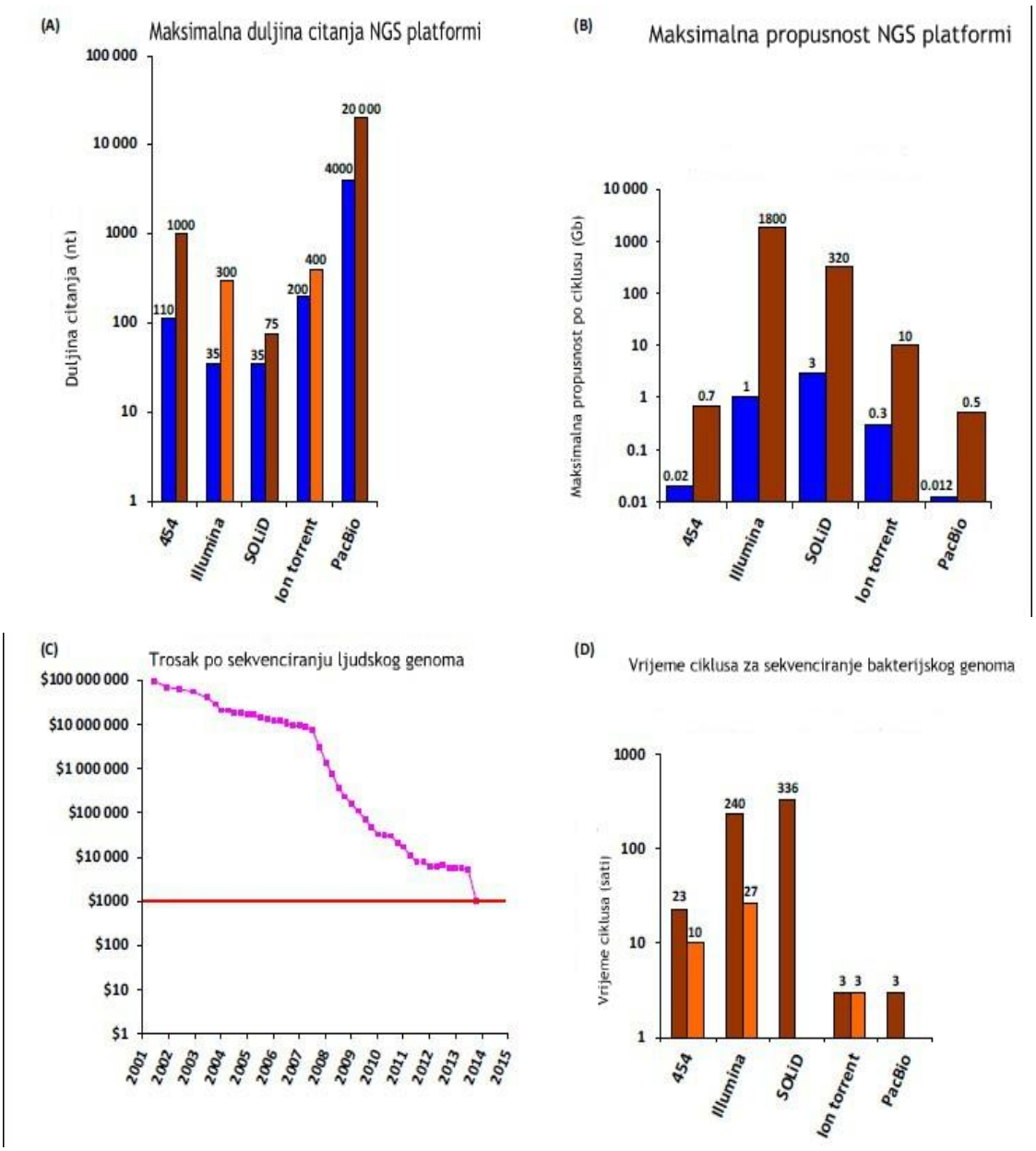
Nakon Roche sustava , na tržištu se javljaju AB SOLiD System te Illumina GA/HiSeq System. Dva navedena sustava proizvode puno više čitanja od Roche sustava , od 30 do 100 milijuna čitanja po procesu, a duljina fragmenata koje je moguće sekvencirati su manji od 1000 parova baza.

Sustav SOLiD (od eng. *Sequencing by Oligo Ligation Detection*) proizvela je kompanija Applied Biosystems 2006.godine. Sustav je još jedan ciklički postupak koji se razlikuje od Roche sustava u upotrebi DNA ligaze i ili probe koja kodira za jednu bazu ili probe koja kodira za dvije baze. Fluorescentno označena proba veže se za svoju komplementarnu sekvencu u blizini početnice. Tada se dodaje DNA ligaza koja spaja fluorescentno označenu probu za početnicu. Nevezane probe se ispiru, nakon čega slijedi iščitavanje fluorescentnih slika kako bi se utvrdio identitet povezanih proba. (4, 6, 7)

Illumina sustav, koji je predstavila tvrtka Solexa 2006.godine, temelji se na principu sekvenciranja sintezom. Metoda se temelji na tri osnovna koraka: umnažanje, sekvenciranje i analiziranje. Proces započinje s pročišćenom DNA, koja se zatim izreže na manje fragmente te se modificira adapterima, koji služe kao referentne točke tijekom umnažanja, sekvenciranja i analize. Specijalizirani čip za umnažanje i sekvenciranje se napuni modificiranom DNA. Uzduž dna čipa nalazi se tisuće oligonukleotida, koji se vežu za komplementarne sekvence duž DNA. Nakon što dođe do spajanja tih sitnih fragmenata za DNA , započinje faza koju nazivamo „cluster“, u kojoj dolazi do umnažanja svakog fragmenta DNA u tisuće kopija. Zatim se unesu početnice i modificirani nukleotidi u čip. Ti nukleotidi sadrže blokatore na 3' kraju koji prisiljavaju početnicu da doda samo jedan nukleotid istovremeno sa fluorescentnom oznakom. Na kraju svakog kruga sinteze, kamera snima sliku čipa. Računalo determinira koja je baza dodana na fragment DNA na temelju valne duljine fluorescentne oznake i bilježi ga za svaku točku na čipu. Istovremeno, na kraju svakog kruga, sve neupotrijebljene molekule budu isprane. (2, 4, 6, 9)



Slika 2.Sažetak različitih metoda sekvenciranja druge generacije. (A) Illumina sustav, metoda sekvenciranja sintezom **(B)** Roche 454 sustav, metoda pirosekvenciranja **(C)** ABI SOLiD sustav. (6)



Slika 3.Pregled evolucije platformi za sekvenciranje. (A) Plavi stupac : Maksimalna duljina čitanja prvih komercijalno dostupnih sekvencera : 454, Illumina / Solexa, SOLiD , Ion Torrent i Pacific Biosciences (PacBio). Narančasti stupac : maksimalna duljina čitanja tih instrumenata danas. **(B)** Maksimalna propusnost prvih komercijalno dostupnih instrumenata za sekvenciranje (plavi stupac) i trenutna maksimalna propusnost (tamni narančasti stupac). Za određene tehnologije, trenutni maksimum duljine čitanja i propusnost nisu nužno dobiven sa jednim i istim instrumentom. **(C)** Graf prikazuje evoluciju troškova sekvenciranja ljudskog genoma od 2001. do danas. Troškovi su oštro smanjeni posljednjih godina, zahvaljujući pojavi tehnologija nove generacije sekvenciranja (NGS) te njihove naknadne nadogradnje. **(D)** Vrijeme potrebno za završetak tipičnog sekvenciranja bakterijskog genoma pomoću velikih instrumenata raznih proizvođača (tamno narančasti stupci) ili njihovih novih strojeva (svijetlo narančasti stupci). (7)

Unatoč porastu korištenja te mnogim izmjenama u metodama sekvenciranja druge generacije, rađaju se i metode treće generacije sa drugačijim pristupom sekvenciranju. Jedna od metoda se naziva sekvenciranje pojedinačne molekule u realnom vremenu (SMRT, od eng.*single molecule real time sequencing*), koja koristi valovode (ZMW, od eng. *zero-mode waveguide*), te metodu izdaje tvrtka PacBio. DNA polimeraza prikačena je za ZMW skupa sa jednom molekulom DNA koja služi kao kalup. ZMW je struktura koja stvara osvijetljeni volumen promatranja dovoljno malen za promatranje samo jednog nukleotida koji je DNA polimeraza inkorporirala. Svaki od četiri nukleotida vezan je na jednu od četiri različite fluorescentne boje. Kada DNA polimeraza inkorporira nukleotid u fragment DNA, fluorescentna oznaka se odcijepi i difundira iz područja promatranja ZMW. Detektor otkriva fluorescentni signal inkorporacije nukleotida . Druga metoda treće generacije naziva se metoda sekvenciranja ionskim poluvodičem (od eng. *ion semiconductor sequencing, Ion Torrent Sequencing*). Postupak sekvenciranja zasniva se na otkrivanju vodikovih iona koji se oslobađaju za vrijeme polimerizacije DNA.

Obje metode ne zahtjevaju korištenje PCR reakcije, te se samim time skraćuje vrijeme potrebno za završetak čitanja. Uz to, emitirani signal, detektiran u fluorescentnom ili električnom obliku, bilježi se u realnome vremenu tijekom enzimatske reakcije dodavanja nukleotida uz pomoć proteina na komplementarni lanac. (10)

Prvi ljudski genom sekvenciran metodama NGS-a bio je genom Jamesa Watsona 2008.godine. Analiza genoma trajala je dva mjeseca, te je trošak projekta bio stoti dio troška koji bi inače bio uložen u Sangerovu metodu sekvenciranja. Od tad, broj iščitanih genoma znatno je porastao i doveo do revolucionarnih otkrića u velikom broj područja znanosti. (11)

4. METODE NGS-A U DIJAGNOSTICI

Završetkom HGP-a 2003.godine te pojavom prvom sekvencera koji radi na temelju metode sekvenciranja druge generacije, porast otkrića u genetici se znatno povećao. Razvoj tih metoda doveo je do njihove raširene uporabe, a područje koje je pokazalo najviše interesa je dijagnostika. Genomska otkrića do kojih su dovele spomenute metode obuhvaćaju identifikaciju novih varijacija i mutacija koje uzrokuju razne bolesti, od rijetkih nasljednih bolesti do kompleksnih, ali čestih bolesti kao što su maligni tumori, te identifikaciju gena eksprimiranih kao odgovor na lijekove. Uvođenje tehnologije višestrukog sekvenciranja pridonijelo je ogromnom broju novih razvoja u genomskoj medicini. Jedno od prvih velikih primjena NGS-a u dijagnostici bilo je upravo sekvenciranje genoma malignog tumora kod pacijenta kojem je bila dijagnosticirana akutna mijeloidna leukemija nepoznatog podtipa. Sekvenciranje ukupnog genoma (WGS, od eng.*whole genome sequencing*) dovelo je do uočavanja nove insercijske translokacije na kromosomu 17. Ona dovodi do ekspresije gena koji uzrokuju bolest organizma. Uspoređujući cjelovitu sekvencu DNA tog pacijenta s germinativnom linijom istog pacijenta, uočene su mutacije koje su omogućile njegovo efikasnije liječenje. Ovakva i slična istraživanja omogućila su saznanja o specifičnim mutacijama u različitim tipovima malignih tumora.(12)

4.1 KROMOSOMSKE NEPRAVILNOSTI I NASLJEDNE BOLESTI

Unatoč činjenici da su pojedinci oboljeli od nasljedne bolesti rijedak slučaj u populaciji, one su uzrok 20% smrtnih slučajeva kod dojenčadi i djece, te uzrokuju 10% hospitalizacija u pedijatriji. U proteklih 25 godina, kod 7028 poremećaja za koje se sumnja da su nasljedni, identificirano je 1139 gena koji uzrokuju recesivne nasljedne bolesti i utvrđene su njihove molekularne strukture. (13)

Sangerova metoda je desetljećima pridonosila dijagnosticiranju nasljednih bolesti sekvenciranjem gena pacijenata, te pomagala tako pri odabiru laboratorijske i kliničke procedure koje bi najprije dovele do ozdravljenja ili poboljšanja stanja pacijenta. Unatoč tome, istraživanje i utvrđivanje nasljednih bolesti kod mnogih pacijenata nije bilo moguće zbog financijskih razloga: mnogi oblici bolesti bili su prerijetko zastupljeni u globalnoj populaciji da bi bili predmet većih istraživanja. Kao posljedica toga, opće znanje spektra mutacija, odnosa genotipa i fenotipa te frekvencije alela bilo je minimalno za većinu nasljednih poremećaja. Međutim,

pojava metoda NGS-a omogućila je sekvenciranja ukupnog genoma te pružila novi način identifikacije nasljednih bolesti. WGS daje mogućnost simultanog i opsežnog dijagnostičkog testiranja koje je pogodno za istraživanje monogenskih bolesti, ubrzavajući tako molekularnu dijagnozu i smanjuje vrijeme tretiranja te bolesti. Dok WGS pruža širok spektar mutacija, zahtjeva veliku količinu sekvenciranja i stvara izazovne zapreke pri rukovanju s pohranom i interpretacijom podataka. Budući da geni koji kodiraju za proteine u genomu obuhvaćaju 1-2% genoma, i sadrže veliku većinu poznatih mutacija odgovornih za nasljedne bolesti, drugi pristup sekvenciranja zastupa samo tu regiju genoma koju nazivamo egzom, a metoda se naziva metoda sekvenciranja ukupnog egzoma (WES, od eng.*whole-exome sequencing*). (7)

Ove dvije metode omogućuju razmatranje monogenske bolesti proučavajući samo manju kromosomsku regiju te uočavanje gena ili mutacije odgovorne za nasljednu bolest. Uspoređujući pacijenta s roditeljima, moguće je identificirati mutacije koje bi se mogle kroz generacije pretvoriti u dominantne letalne alele. Budući da se trošak ovih metoda smanjuje svakim danom, WGS i WES bi mogle postati rutinske metode koje bi parovi koristili prije začeća djeteta, ili u prenatalnoj dijagnostici fetalne DNA pri ranom otkrivanju genetskih poremećaja, te koje bi pedijatri koristili pri objašnjavanju idiopatskih stanja djece.

Kod poremećaja s recesivnim nasljednim bolestima često nedostaje ekspresija specifičnog proteina, teško ih je uspješno tretirati, te će biti izazov pronaći način kako izliječiti takve nasljedne bolesti.

4.2 ČESTE BOLESTI

Metode NGS-a korištene su i kod proučavanja čestih bolesti kod ljudi, primjenom istih metoda na razini jedne cijele populacije i kreiranjem genomskih mapa populacija umjesto jednog ili par pojedinaca. Uz pretpostavku da su česte bolesti poligenske, isti geni bi se trebali pronaći kod više različitih pojedinaca u jednoj većoj grupi ljudi koja obitava na istom području. Istraživanja širokog spektra genoma (GWAS, od eng. *Genome-wide Association Study*) su istraživanja setova genoma koja obuhvaćaju pronalaženje čestih genetskih varijanti u populaciji koje bi mogle biti uzročnici čestih bolesti. Prvi uspješni GWAS objavljen je 2005.godine, u kojem se istraživalo bolesnike koji su patili od senilne makularne degeneracije i u kojem su pronađena dva genska polimorfizma s bitno drugačijom frekvencijom alela nego kod zdravih kontrola. Do 2000.bilo je identificirano samo nekoliko genomskih varijanti koje su bile povezane s bolestima, međutim do kraja 2007.godine, broj uočenih lokusa je porastao na 1100 koji su utjecali na ekspresiju 165 gena čija je promjena uključena u razvoj bolesti kod ljudi.

GWAS je puno pridonijeo novim terapeutskim pristupima tim bolestima nakon što je došlo do otkrića velikog broja gena koji modificiraju fenotip čovjeka, ali i životinja. Neke od čestih bolesti koje su prisutne kod velikog broja ljudi, a kojima je metodom GWAS-a pronađen jedan ili više karakterističnih lokusa koji se javljaju kod oboljelih u genomu su sljedeće: degeneracija žute pjege, vodeći uzrok za gubitak centralne vidne oštrine kod starijih osoba, Crohnova bolest, idiopatska upala crijeva, kontrola fetalnog hemoglobina (HbF), dijabetes tip 2, najčešći oblik šećerne bolesti, autoimune bolesti kao dijabetes tipa 1 , reumatoidni artritis i celijakija, bubrežne upale i neki psihički poremećaji (bipolarni poremećaj, shizofrenija i autizam). (3)

4.3 MALIGNI TUMORI

Metode sekvenciranja druge generacije su se počele koristiti u liječenju i tretiranju pacijenata oboljelih od raznih vrsta malignih tumora. Još 1975.godine, talijanski virolog Renato Dulbecco sa svojim suradnicima pokazao je da zaražavanjem zdrave stanice tumorskim virusom dolazi do ugradnje gena virusnog porijekla u genom zdrave stanice, što dovodi do fenotipske promjene te stanice. Dulbecco je već tada predložio mapiranje kompletnog ljudskog genoma u svrhu otkrivanja mutacija koje uzrokuju pojavu raka i tumora u organizmima, te predvidio da će nove metode koje će to omogućiti omogućiti bolje poznavanje i liječenje takvih bolesti. Do danas , otkriveno je oko 230 gena koji su uključeni u razvoj nekih vrsta tumora što je omogućilo razumijevanje novih bioloških mehanizama i razvoj terapeutskih pristupa.

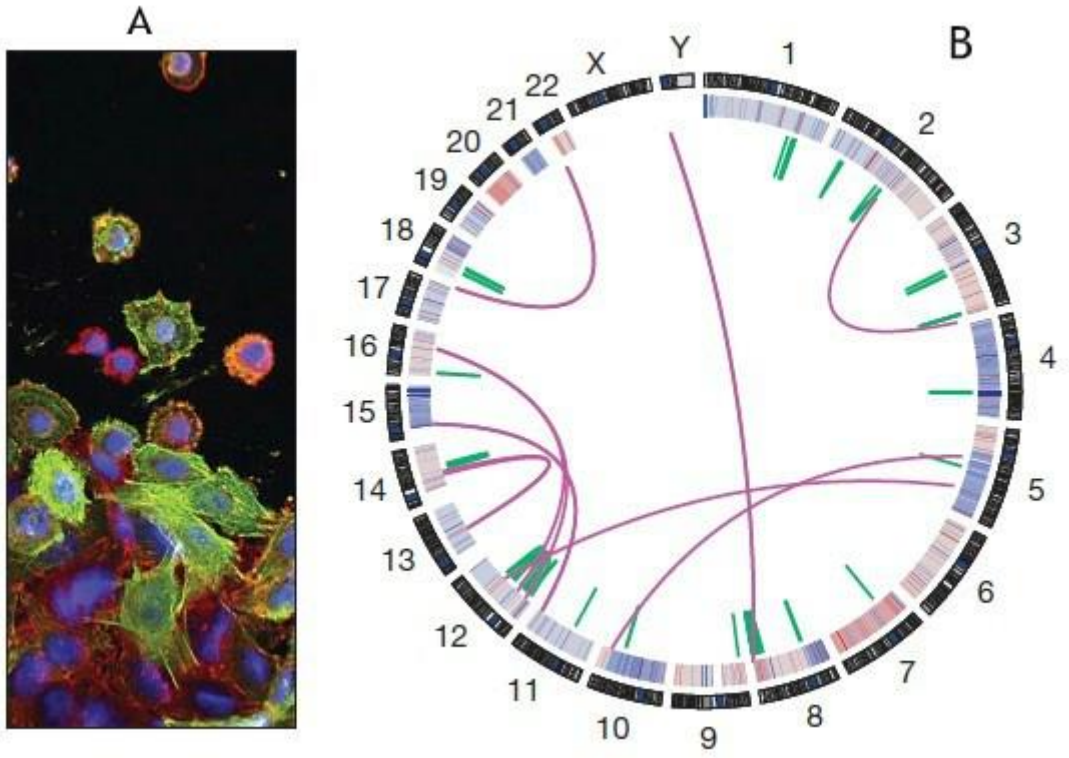
Tumori su kompleksna tkiva koja uključuju endotelne stanice, limfocite i makrofage uz tumorske stanice. Heterogenost ovakvog tkiva može prikriti promjene u samim tumorskim stanicama i tako onemogućiti dobro razumijevanje inter- i intratumorskih pojava, na kojima se temelje klasične molekularne metode klasifikacije tumora.

Metode NGS-a pridonijele su razvoju proučavanja pojedinih stanica, i ta proučavanja dovela do novih metoda u onkologiji. Sekvenciranje jedne stanice (SNS, od eng. *single-cell sequencing*) učinkovito je kod profiliranja malog broja stanica u kliničkim uzorcima, te kod identifikacija rijetkih stanica otpornih na procese kemoterapije. SNS pridonosi razvoju u trima najvećim granama onkologije: detekciji i predikciji razvoja bolesti te odabiru najučinkovitijeg terapijskog protokola. Za proučavanje samo jedne stanice, potrebno je izolirati istu iz stanične kulture ili uzorka tkiva na način koji će najviše očuvati njen integritet. Razne metode omogućuju dolazak do istog cilja, od kojih mikromanipulacija, mikrodisekcija laserom (LCM, od eng. *laser-capture microdissection*) te protočna citometrija. Mikromanipulacija pojedinih stanica koristi se kod uzorkovanja i izolacije pojedinih stanica iz kultura ili tekućih uzoraka kao što su sperma, slina i

krv. Metoda je lako dostupna, međutim kompleksna je, i stanice su podložne mehaničkim oštećenjima. LCM omogućuje izolaciju stanica direktno iz uzoraka tkiva, što ju čini poželjnom u kliničkim primjenama. Nedostatak iste metode je da neke jezgre mogu biti prerezane u procesu sekcije tkiva, uzrokujući gubitak kromosomskih segmenata koji pridonose iznošenju podataka.

Protočna citometrija se koristi za izolaciju specifičnih stanica iz smjese različitih stanica. Tom tehnikom se mogu identificirati različite stanice zbog različitog raspršenja svjetlosti odnosno fluorescencije. FACS (od eng. *fluorescence activated cell sorter*) razdvaja različite stanice koje su obilježene fluorescentnim reagensima. Obilježene stanice prolaze kroz snop laserskih zraka. Zatim se mjeri emitirana fluorescencija te raspršenje svjetlosti svake stanice. Pritom suspenzija dolazi do otvora te se stvaraju kapljice koje sadrže po jednu stanicu. Stvaranjem navedenih kapljica nastaje negativan naboj koji je proporcionalan količini fluorescencije te stanice. Nenabijene kapljice ili pak one drugačijeg naboja se odvajaju u električnom polju dok se kapljice identičnog naboja skupljaju. Ovakav način razdvajanja stanica je relativno brz (do milijun stanica u jednom satu).

Cilj metoda NGS-a je smanjiti stopu mortaliteta od tumora, i to tako da se u što skorije vrijeme tim metodama otkriju svi geni koji su najpodložniji somatskim mutacijama u svim vrstama tumora , kao i stanične linije svih vrsta tumora. (14)



Slika 4. Karta genoma karcinoma kolona.

WGS je pružio nove poglede na maligne tumore . **A)** Slika malignog tumora debelog crijeva. **B)** Genom uzorka malignog tumora debelog crijeva (Broad Institute), uključujući translokacije unutar kromosoma (ljubičasta) ,

intrakromosomalne translokacije (zeleno) te umnažanja i delecije (crvene

i plave boje, na unutarnjem prstenu) . Mutacije pojedinog nukleotida nisu prikazane. (3)

5.ZAKLJUČAK

Pojava NGS-a omogućila je istraživačima i znanstvenicima istraživanje bioloških sustava na razini koja do razvoja ovih metoda nije bila moguća. Kako su se metode i tehnologija koja ih je pratila razvijale, tako je narastao broj metoda priprema uzoraka i analize podataka, koji su omogućili veliku raznolikost znanstvenih primjena. Nastoji se smanjiti trošak tih metoda te ih učiniti još dostupnijim nego što jesu, kako bi se te tehnologije mogle upotrebljavati u još više područja u budućnosti. Klinički laboratoriji su već počeli koristiti metode NGS-a kao dijagnostički alat; forenzička istraživanja, koja i danas dosta teže upotrebljavanju Sangerove metode, počinju primjenjivati metode sekvenciranja novih generacija. Stavljanje na tržište sekvencera koji za relativno nisku cijenu sekvenciraju cijeli genom nekog organizma potiče upotrebljavanje tih uređaja u svakodnevnoj praksi i tako razvijanje populacijske genomike. Izrada i proučavanje desetaka tisuća genoma revolucionarizirat će pogled na populacijsku raznolikost i pomoći će razumjeti genetsku osnovu zdravlja i bolesti. Uvođenje sekvenciranja velikih razmjera u kliničke studije i zdravstvo dovodi do novih genomskih i fenotipskih informacija te više saznanja o tome kako jedno utječe na drugo. Sekvenciranje novih generacija unaprjeđuje naše razumijevanje funkcionalnih posljedica mutacija molekule DNA te poboljšava mogućnost dijagnosticiranja i predviđanja ishoda bolesti svakog bolesnika.

6.LITERATURA

1. Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. Nature, 227(5258), 561-563.
2. Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. BioMed Research International, 2012.
3. Lander, E. S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. Nature, 470(7333), 187-197.
4. Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. Nature reviews genetics, 11(1), 31-46.
5. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12), 5463-5467
6. Natrajan, R., & Reis-Filho, J. S. (2011). Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. Expert review of molecular diagnostics, 11(4), 425-444.
7. van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in genetics, 30(9), 418-426.
8. Ju, J., Kim, D. H., Bi, L., Meng, Q., Bai, X., Li, Z., ... & Edwards, J. R. (2006). Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(52), 19635-19640
9. http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html
10. Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC genomics, 13(1)
11. Watson, J. (2007). The human genome project. Legal Medicine, 193.
12. Ku, C. S. (2016). Bringing Next-Generation Sequencing Oncology Tests into the Diagnostic Setting. Next Generat Sequenc & Applic, S1.
13. Bell, C. J., Dinwiddie, D. L., Miller, N. A., Hateley, S. L., Ganusova, E. E., Mudge, J., ... & Sheth, V. (2011). Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. Science translational medicine.
14. Guan, Y. F., Li, G. R., Wang, R. J., Yi, Y. T., Yang, L., Jiang, D., ... & Peng, Y. (2012). Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. Chinese journal of cancer, 31(10), 463.

15. Meldrum, C., Doyle, M. A., & Tothill, R. W. (2011). Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. Clin Biochem Rev, 32(4), 177-95.
16. Strande, N. T., & Berg, J. S. (2016). Defining the Clinical Value of a Genomic Diagnosis in the Era of Next-Generation Sequencing. Annual Review of Genomics and Human Genetics.
17. Kingsmore, S. F., & Saunders, C. J. (2011). Deep sequencing of patient genomes for disease diagnosis: when will it become routine?. Science Translational Medicine.
18. Lyon, E., Cockerill, F. R., Bale, S. J., Beadling, C., Bry, L., Hagenkord, J., ... & Palomaki, G. E. (2015). Next generation sequencing in clinical diagnostics: experiences of early adopters. Clinical chemistry, 61(1), 41-49.
19. Navin, N., & Hicks, J. (2011). Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. Genome medicine, 3(5), 1..

7.SAŽETAK

Metode sekvenciranja novih generacija su najznačajnije otkriće u znanosti biologije u proteklih 40 godina. Nakon Sangerove metode koju nazivamo metodom sekvenciranja prve generacije, razvijaju se metode druge i treće generacije sekvenciranja. Metode sekvenciranja novih generacija daju rezultate u sve kraćem vremenskom periodu te su svakim danom sve učinkovitije. Danas je moguće sekvencirati tisuće i tisuće genoma spomenutim metodama, što omogućava otvaranje mnogih puteva u raznim područjima znanosti i uvelike pridonosi kvaliteti života. Ove metode su veoma značajne u području dijagnostike, tako što omogućuju brže i učinkovitije otkriće raznih kromosomskih nepravilnosti koje dovode do nasljednih bolesti, čestih bolesti u nekoj populaciji te malignih tumora. U ovom radu izložen je kratak povijesni pregled razvoja raznih metoda sekvenciranja kroz zadnja desetljeća , njihova uporaba u raznim područjima, ponajviše njihov doprinos u kliničkim laboratorijima i predstavljanje tih metoda kao novog alata u otkrivanju uzroka mnogih bolesti.

8.SUMMARY

New generation-sequencing methods are the most important discovery in biology in the past 40 years. After Sanger sequencing, which is also called the first-generation sequencing, the second and the third-generation sequencing are developed. The new-generation sequencing methods are showing results in shorter time periods and are getting more efficient day by day. Today it is possible to sequence thousands and thousands of genoms with these methods, and this opens many pathways in many areas of science and contribute to the quality lives. These methods are highly significant in many fields of diagnostics, because they help to determine chromosomes irregularities, which cause hereditary diseases, common diseases in a population, and malignant tumors faster and more efficient.

This work presents a short historical overview of the development of various sequencing methods through the last decade , their use in various fields , particularly their contribution to clinical laboratories and presentation of these methods as a new tool in detecting causes of many diseases .