

# Nove spoznaje genomske patologije u djece

---

Udovičić, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:396600>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Marijana Udovičić

Nove spoznaje genomske patologije u djece

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je pri Katedri za pedijatriju, Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Maria Ćuka i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

aCGH – komparativna genomska hibridizacija na mikropostroju (*engl.* – array comparative genomic hybridization)

CMA – tehnika analize kromosoma na mikropostroju (*engl.* – chromosomal microarray analysis)

CNV – varijacija u broju kopija gena (*engl.* – copy number variation)

CVS – biopsija korionskih resica (*engl.* – chorionic villus sampling)

ddGTP – dideoksigvanozin-trifosfat

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ddNTP – dideoksiribonukleotid-trifosfat

dNTP – deoksiribonukleotid-trifosfat

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija

HGNC – Odbor za nomenklaturu gena (*engl.* – Human Genome Nomenclature Committee)

HUGO – Organizacija ljudskog genoma (*engl.* – Human Genome Organisation)

INDEL – insercije i delecije (*engl.* insertions and deletions)

MLPA – metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (*engl.* – multiplex ligation dependent probe amplification)

MS-MLPA – metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (*engl.* – methylation-specific multiplex ligation dependent probe amplification)

NIPS – neinvazivni prenatalni probir (*engl.* – noninvasive prenatal screening)

NGS – sekvenciranje nove generacije (*engl.* – next-generation sequencing)

PCR – polimerazna lančana reakcija (*engl.* – polymerase chain reaction)

RNK – ribonukleinska kiselina

SBH – sekvenciranje hibridizacijom (*engl.* – sequencing by hybridization)

SBS – sekvenciranje sintezom (*engl.* – sequencing by synthesis)

SMRT – sekvenciranje pojedinačne molekule u stvarnom vremenu (*engl.* – single-molecule real-time sequencing)

SNP – nizovi mononukleotidnih polimorfizama (*engl.* – single nucleotide polymorphism)

SNV – varijanta jednog nukleotida (*engl.* – single nucleotide variant)

TAD – topološki pridružujuća domena (*engl.* – topologically associating domain)

UTR – neprevedena regija (*engl.* – untranslated region)

VUS – varijacije nepoznatog značenja (*engl.* – variant of uncertain significance)

## Sadržaj

SAŽETAK .....	i
SUMMARY .....	ii
1. UVOD.....	1
2. POSTOJEĆE TEHNIKE I METODOLOGIJE U ISTRAŽIVANJU GENOMIKE .....	4
<b>2.1. Projekt humanog genoma</b> .....	10
<b>2.2. Sekvenciranje nove generacije (NGS)</b> .....	11
3. POTEŠKOĆE U INTERPRETACIJI I SLUČAJNI NALAZI.....	17
4. DUBINA I OBUHVAT ČITANJA .....	19
5. TEHNOLOGIJA U RAZVOJU.....	20
6. NOVA OTKRIĆA U PODRUČJU GENOMSKE PATOLOGIJE DJECE – ODABRANE BOLESTI .....	23
7. GENOMSKA DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA – PREKRETNICA U PEDIJATRIJSKOJ MEDICINI .....	25
8. ZAKLJUČAK.....	28
9. ZAHVALE .....	29
10. LITERATURA.....	30
11. ŽIVOTOPIS .....	36

## SAŽETAK

### **Nove spoznaje genomske patologije u djece**

**Marijana Udovičić**

U svijetu moderne medicine, savjetovanje i testiranje na genetskoj razini postaju sve relevantniji, posebno kada se radi o genetskim bolestima koje pogađaju djecu. Interpretacija genetskih podataka zahtijeva duboko razumijevanje i stručnost, s posebnim osvrtom na potencijalne rezultate testiranja. Izazovi vezani uz etiku i pravo sve su prisutniji u kontekstu genetskog testiranja, osobito s obzirom na mogućnost otkrivanja slučajnih nalaza koji mogu ukazivati na predispozicije za razne bolesti.

Genomika, disciplina koja se bavi istraživanjem genetskih promjena koje uzrokuju bolesti, postaje ključna, posebno u području pedijatrije. S razvojem tehnologija sekvenciranja nove generacije (NGS), moguće je postići brže i preciznije dijagnoze, što mijenja pristup dijagnostici genetskih bolesti.

Poseban fokus je na rijetkim bolestima koje utječu na djecu. Iako su ove bolesti relativno česte, u općoj populaciji se smatraju rijetkima jer negativno utječu na reproduktivnu sposobnost. Napredak u tehnologiji i metodologiji omogućio je značajne pomake u ovom području, povećavajući mogućnosti za postavljanje genetske dijagnoze, čak i za rijetka i ultra-rijetka stanja. Genomika ima sposobnost pružiti duboko razumijevanje ovih neuobičajenih bolesti i pružiti temeljne uvide u biološke procese, što brzo mijenja način pružanja medicinske skrbi ovim bolesnicima i njihovim obiteljima.

Ključne riječi: genom, cijelogenomsko istraživanje, pedijatrija, sekvenciranje genoma

## **SUMMARY**

### **New knowledge of genomic pathology in children**

**Marijana Udovičić**

In the world of modern medicine, counseling and testing at the genetic level are becoming more and more relevant, especially when it comes to genetic diseases that affect children. Interpretation of genetic data requires deep understanding and expertise, with particular reference to potential test results. Challenges related to ethics and law are increasingly present in the context of genetic testing, especially with regard to the possibility of discovering accidental findings that may indicate predispositions to various diseases.

Genomics, the discipline that deals with the study of genetic changes that cause disease, is becoming crucial, especially in the field of pediatrics. With the development of next-generation sequencing (NGS) technology, it is possible to achieve faster and more accurate diagnoses, which changes the approach to the diagnosis of genetic diseases.

There is a special focus on rare diseases that affect children. Although these diseases are relatively common, they are considered rare in the general population because they negatively affect reproductive capacity. Advances in technology and methodology have enabled significant advances in this field, increasing opportunities for genetic diagnosis, even for rare and ultra-rare conditions. Genomics has the ability to provide a deep understanding of these uncommon diseases and provide fundamental insights into biological processes, which is rapidly changing the way medical care is delivered to these patients and their families.

Key words: genome, whole genome sequencing, pediatrics, genome sequencing



## 1. UVOD

Genomska patologija, koja se bavi proučavanjem genetskih promjena koje dovode do nastanka bolesti, postala je ključna disciplina u modernoj medicini. Posebno je važna u pedijatrijskoj medicini, gdje nove spoznaje mogu pružiti dublje razumijevanje i bolju terapiju za brojne bolesti koje pogađaju djecu (1,2).

Bolesti koje pogađaju manje od 1 na 2000 osoba u općoj populaciji definirane su kao rijetke bolesti (3). Unatoč relativno visokoj incidenciji, te bolesti su u općoj populaciji i dalje rijetke jer nepovoljno utječu na reproduktivnu sposobnost (4,5).

Još uvijek treba pronaći mnogo više gena koji uzrokuju bolesti, iako je nedavno potvrđeno da rijetke varijante u gotovo 1500 gena uzrokuju razvojne poremećaje (6,7). Kamen temeljac sigurnog medicinskog liječenja je točna dijagnoza, koja se ovdje definira kao identificiranje specifičnog biološkog uzroka (genotipa) koji objašnjava kliničke simptome bolesti (fenotipa) (8).

Odbor za nomenklaturu gena (HGNC – *engl.* HUGO genome nomenclature committee) uspostavio je niz smjernica za nomenklaturu ljudskih gena. Ove smjernice, iako nisu apsolutna pravila, pružaju okvir za dosljednost i jasnoću u imenovanju gena. HGNC definira gen kao segment DNK (deoksiribonukleinska kiselina) koji doprinosi fenotipu/funkciji, a u nedostatku dokazane funkcije, gen se može karakterizirati sekvencom, transkripcijom ili homologijom.

Smjernice preporučuju da simboli gena budu kratki, pamtljivi i izgovorljivi. Nazivi gena obično su dugi opisi simbola i trebali bi biti kratki, specifični i prenositi neke informacije o karakteru ili funkciji genskih proizvoda. Svakom genu dodijeljen je samo jedan simbol, a HGNC rutinski ne imenuje izoforme, što znači da nema zasebnih simbola za protein-kodirajuće ili nekodirajuće ribonukleinske kiseline (ncRNK – *engl.* non-coding ribonucleic acid) izoforme lokusa koji kodira proteine, ili alternativne transkripte iz ncRNK lokusa.

U određenim iznimnim okolnostima odobreni su zasebni simboli za segmente gena u složenim lokusima, kao što je lokus UGT1, grupirani protokadherini na 5q31 i obitelji imunoglobulina i T-

staničnih receptora. Pretpostavljenim bicistronskim lokusima mogu se dodijeliti zasebni simboli za predstavljanje različitih genskih proizvoda (9).

Smjernice također uključuju niz ključnih čimbenika u dodjeljivanju nomenklature gena. Ti čimbenici uključuju da simboli i nazivi gena moraju biti jedinstveni unutar određenog genoma, trebaju biti kratki i specifični, ne smiju biti uvredljivi ili pogrdni i ne smiju koristiti ekspresne ili subskripte ili interpunkcijske znakove. Genski simboli moraju sadržavati samo velika latinična slova i arapske brojeve i moraju počinjati slovom. Imena gena moraju biti napisana na američkom engleskom, moraju počinjati malim slovom (osim ako ne počinju eponimom ili kraticom velikim slovima) i ne smiju sadržavati riječi 'gen' ili 'human'. Također ne bi smjeli pisati vlastita imena ili uobičajene riječi ili odgovarati uobičajenim kraticama, i trebali bi počinjati istim slovom kao i simbol kako bi se olakšalo abecedno ispisivanje i grupiranje.

Ove su smjernice osmišljene kako bi pomogle u komunikaciji i dohvaćanju podataka, a odstupanja od ovih smjernica mogu se napraviti ako postoje dovoljni dokazi da će nomenklatura u konačnici pomoći u ovim ciljevima (9).

Organizaciju genoma karakterizira visok stupanj reda i nenasumičnosti, sa značajkama kao što je fizička segregacija transkripcijski aktivnog eukromatina od potisnutog heterokromatina i formiranje kromatinskih domena. Na primjer, postoje razlike u 3D položaju i funkcionalnom statusu alela, te fluktuacije u obliku i broju jezgrinih tijela među pojedinim stanicama.

Struktura genoma organizirana je na više razina. DNK je omotana oko nukleosoma, tvoreći kromatinsko vlakno koje se savija u petlje, često dovodeći uzvodne regulacijske elemente gena u blizinu promotora gena kako bi se kontrolirala njihova transkripcija. Vlakno se zatim savija u domene kromatina, koje se nazivaju TAD (*engl.* – topologically associating domain), koje se međusobno povezuju kako bi stvorile odjeljke kromatina. DNK svakog kromosoma zauzima poseban volumen, ili teritorij kromosoma, unutar stanične jezgre, generirajući nenasumične uzorke kromosoma i gena (10).

Posljednjih godina, napredak u tehnologiji i metodologiji omogućio je značajne korake naprijed u ovom području. Zbog svoje genetske i fenotipske objektivnosti, NGS tehnologije (NGS – *engl.*

next generation sequencing) značajno su povećale šanse za dobivanje genetske dijagnoze. Čak i za rijetka i ultra-rijetka stanja, uključujući ona s kojima djetetov kliničar možda nije upoznat, istovremeno sekvenciranje svakog gena u genomu otkriva veliku većinu značajnih varijacija prisutnih u genomu pojedinca i može omogućiti postavljanje dijagnoza u čitavom rasponu pedijatrijskih fenotipova (11).

Sposobnost genomike da razumije ove neuobičajene bolesti i pruži temeljne uvide u biološke procese brzo će promijeniti način na koji se ovim bolesnicima i njihovim obiteljima pruža medicinska skrb (2).

Sve ove spoznaje i tehnologije otvaraju nove mogućnosti za dijagnozu i liječenje dječjih bolesti, ali također postavljaju i nove izazove, uključujući etička, pravna i društvena pitanja koja se moraju riješiti.

## 2. POSTOJEĆE TEHNIKE I METODOLOGIJE U ISTRAŽIVANJU GENOMIKE

Ovisno o mehanizmu nastanka pojedine genske bolesti, u upotrebi su različite metode i tehnike kojima se iste mogu dijagnosticirati. Važno je naglasiti kako su u dijagnostici jednako važne sve metode koje će u nastavku biti opisane jer se nove metode implementiraju u već postojeći algoritam dijagnostike budući da sve imaju specifičnu dijagnostičku vrijednost. Danas su dostupne različite metode za otkrivanje kromosomskih aneuploidija, varijacija u broju kopija gena (CNV – *engl.* copy number variant), strukturnih varijacija ili čak odsutnosti heterozigotnosti, što može ukazivati na uniparentnu disomiju ili identitet podrijetlom. Izum fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH – *engl.* fluorescence in situ hybridization), koja procjenjuje prisutnost ili odsutnost različitih segmenata DNK, doveo je do nastanka "molekularne citogenetike" 1980-ih (12).

FISH omogućuje karakterizaciju translokacija ili marker-kromosoma vidljivih u kariotipovima, kao i ciljanu identifikaciju delecija i duplikacija povezanih s poznatim bolestima kao što su Cri-du-Chat ili Wolf-Hirschhornov sindrom. Metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (MLPA – *engl.* multiplex ligation-dependant probe amplification) i tehnika analize kromosoma na mikropostroju (CMA – *engl.* chromosomal microarray), dva CNV testa temeljena na metodi polimerazne lančane reakcije (PCR – *engl.* polymerase chain reaction) PCR-u, razvijena su kao rezultat revolucionarnog razvoja PCR-a, koji je, među mnogim drugim upotrebama, omogućio i ciljano otkrivanje CNV-a u čak i manjim regijama.

Moderni CMA, koji omogućuje nepristrano skeniranje genoma za otkrivanje CNV-a, zapravo je rezultat desetljeća rada u molekularnoj biologiji, bioinženjeringu i robotici. Kao rezultat toga, identificirani su mnogi poremećaji povezani sa submikroskopskim CNV-ima, a temeljni mehanizam je razjašnjen (12). Analiza kromosoma korištenjem tradicionalnih citogenetičkih metoda je i dalje prva linija testiranja u bolesnika sa sumnjom na aneuploidiju (trisomije ili aneuploidija spolnih kromosoma), obitelji u kojih postoji sumnja na postojanje strukturnih promjena kromosoma (translokacija ili inverzija) ili osoba s nepolodnošću (12).

Međutim, metoda izbora za dijagnostiku u bolesnika sa sumnjom na zastoj u razvoju, intelektualne poteškoće, bolesti iz spektra autizma ili multiple kongenitalne defekte nepoznate etiologije je CMA jer pokazuje pojačanu osjetljivost na suptilne promjene poput mikrodelecije ili mikroduplikacije (12). Kromosomske aberacije mogu se pronaći korištenjem različitih testova, stoga je ključno razumjeti varijacije u njihovoj kliničkoj korisnosti i ograničenjima.

### **Rodoslovno stablo**

Rodoslovno stablo i obiteljska anamneza važan su dijagnostički alat u medicinskoj genetici (13). Obiteljska anamneza je u genetici definirana kao opis genetskih odnosa i medicinske povijesti obitelji; a kada je obiteljska anamneza predstavljena u obliku dijagrama korištenjem standardnih simbola i izraza, to se naziva rodoslovnim stablom (14). Napori medicinskih genetičara u saznavanju obiteljske povijesti bolesti ima višestruke svrhe, uključujući uspostavljanje odnosa, edukaciju bolesnika i obitelji o genskom stanju i olakšavanje donošenja odluka vezanih uz gensko testiranje. Unatoč očitj važnosti ovih dobiti, najvažnija uloga obiteljske anamneze je kao alat za genetsku dijagnozu i procjenu rizika (15).

### **Citogenetika (kariotipizacija i FISH)**

Općenito, analiza kariotipa se preporučuje ako postoji sumnja na kromosomsku aneuploidiju ili značajnu strukturnu promjenu (>5-10 Mb), osobito ako su promjene uravnotežene. Uravnotežene promjene mogu se pronaći sekvenciranjem cijelog genoma, analizom kariotipa i FISH-om (ako je anomalija unaprijed poznata), međutim sekvenciranje cijelog genoma trenutno je preskupo za većinu indikacija. Kod testiranja ponavljajućih promjena, kao što je sindrom Williams ili obiteljskih istraživanja, često se koristi molekularna citogenetika s FISH-om (12).

### **Kariogram**

Kariogram je shematski prikaz skupa kromosoma koji služi u vizualizaciji i mapiranju genetskih podataka. Na temelju veličine, oblika i uzorka povezivanja pojedinačnih kromosoma, omogućuje identifikaciju kromosoma. Ovi se dijagrami mogu koristiti kao vodič za pronalaženje položaja određenih gena na kromosomima i za uočavanje abnormalnosti povezanih s raznim kromosomskim bolestima. Koriste ih istraživači diljem svijeta, pridržavajući se sheme mapiranja

koja se stalno ažurira i standardizira Međunarodnim sustavom citogenetičke nomenklature (ISCN – *engl.* The International System for Human Cytogenomic Nomenclature). Kariogrami omogućuju istraživačima korelaciju određenih gena s određenim kromosomskim vrpčama. Ukratko, kariogrami su nezamjenjivi alati u citogenetici i genomskim istraživanjima, pružajući vizualnu i standardiziranu metodu za mapiranje i upućivanje na gene i kromosomske regije (16).

### **Tehnika analize kromosoma na mikropostroju (CMA)**

Za otkrivanje CNV-a koriste se dvije vrste nizova: nizovi mononukleotidnih polimorfizama (SNP – *engl.* single nucleotide polymorphism) koji testiraju SNP-ove u cijelom genomu i nizovi komparativne genomske hibridizacije (aCGH – *engl.* array comparative genomic hybridization) koji koriste veće oligonukleotidne sonde raspoređene preko genoma, često s "okosnicom" SNP sondi. SNP-ovi su generalno bezopasne promjene jedne baze u DNK koje se često javljaju u zdravoj populaciji. SNP sonde mogu detektirati odstupanja omjera alela, što može pomoći u identifikaciji mozaicizma niskog stupnja, a neophodne su za identifikaciju mrlja homozigotnosti zbog identiteta podrijetlom ili uniparentalne disomije s CMA testom. Oba testa se uvelike koriste i imaju preklapajuću kliničku korisnost, ali SNP-ovi se češće koriste za identifikaciju većih ili multigenih CNV-ova, regija homozigotnosti i niske razine mozaicizma, dok se aCGH koristi za CNV-ove na razini gena (12).

### **Metoda istovremenog umnažanja vezanih proba (MLPA)**

MLPA je molekularna tehnika koja mjeri broj kopija omogućavajući detekciju malih delecija i duplikacija ispod granice rezolucije FISH-a (12, 17). Istraživana DNK se hibridizira sa sondama specifičnim za određenu sekvencu, povezuju se i umnažaju, a svaka ciljna regija ima "sekvencu za punjenje" određene duljine koja omogućuje identifikaciju multipleksiranih ciljeva. Manji CNV-i, kao što su pojedinačne delecije gena ili rekurentni sindromi mikrodelecija/duplikacija, najbolje se otkrivaju MLPA-om (12).

MS-MLPA (*engl.* methylation specific multiplex ligation-dependant probe amplification) koristi endonukleaze osjetljive na metilaciju koje probavljaju nemetiliranu DNK i sprječavaju vezivanje i amplificiranje sonde. Na taj način se vizualiziraju samo metilirani aleli, a originalni izvor se može

odrediti na temelju dizajna testa. MS-MLPA se obično izvodi paralelno s uobičajenom MLPA-om kako bi se otkrio bilo koji temeljni CNV u regiji od interesa. Stoga kombinacija MS-MLPA i standardne MLPA može identificirati gubitak majčinskog ili očevog alela i temeljnu deleciju, ali potrebno je dodatno testiranje za otkrivanje uniparente disomije ili varijanti sekvence (12).

### **Sangerovo sekvenciranje**

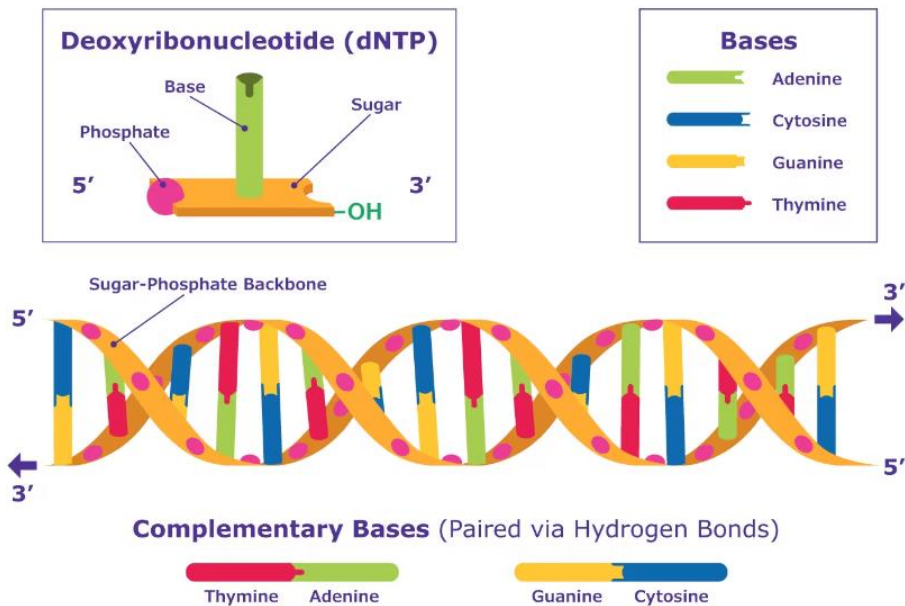
Sangerovo sekvenciranje (metoda prekidanja lanca), prvi put uvedeno 1977., funkcionira tako da selektivno ugrađuje nukleotide koji su promijenjeni kako bi "prekinuli" reakciju sekvenciranja, čime se identificira položaj baze koja je posljednja ugrađena (12).

Sangerovo sekvenciranje je zrela tehnologija visoke točnosti koja se smatra "zlatnim standardom" za određivanje sekvence, unatoč činjenici da ne otkriva mozaicizam ispod razine od 15-20%. Sangerovo sekvenciranje posebno je korisno za otkrivanje genotipa u bolesnika s jasnom kliničkom slikom poznate monogenske bolesti. Ovom metodom otkrivaju se točkaste mutacije, no važno je napomenuti da ovaj pristup neće otkriti delecije, duplikacije ili strukturne preraspodjele genoma te je često potrebno uključiti sekundarnu metodu za otkrivanje ovih abnormalnosti (12).

Željeni slijed DNK koristi se kao predložak za oblik PCR-a poznat kao PCR s prekidom lanca. PCR s prekidom lanca radi slično uobičajenom PCR-u, uz uključivanje modificiranih nukleotida poznatih kao dideoksiribonukleotidi-trifostat (ddNTP). Tijekom stadija ekstenzije normalnog PCR-a, DNK polimeraza katalizira stvaranje fosfodiesterske veze između slobodne 3'-OH skupine prethodnog nukleotida i 5'-fosfata sljedećeg nukleotida. U PCR-u s prekidom lanca, korisnik uključuje skroman omjer ddNTP-a koji završavaju lanac u PCR reakciju s uobičajenim dNTP-ima. Budući da ddNTP-ima nedostaje 3'-OH skupina bitna za sintezu fosfodiesterskih veza, produljenje se prekida kada DNK polimeraza nasumično uključi ddNTP. PCR s prekidom lanca proizvodi milijune do milijarde oligonukleotidnih kopija željene DNK sekvence, prekinute na nasumičnim duljinama (n) pomoću 5'-ddNTP-a.

Ručno Sangerovo sekvenciranje uključuje postavljanje četiri PCR reakcije, svaka s jednom vrstom ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP i ddCTP) koje se onda pomiješaju zajedno (18).

## DNA Structure



Slika 2. Shematska struktura DNK, preuzeto s (18)

Oligonukleotidi sa završenim lancem razvrstavaju se po veličini pomoću gel elektroforeze u drugom stupnju. Gel elektroforeza uključuje unošenje uzoraka DNK u jedan kraj matrice gela i primjenu električne struje; budući da je DNK negativno nabijena, oligonukleotidi će biti gurnuti prema pozitivnoj elektrodi na suprotnoj strani gela. Budući da svi fragmenti DNK imaju isti naboj po jedinici mase, brzina oligonukleotida bit će određena isključivo veličinom. Što je fragment manji, to će naići na manje trenja dok prolazi kroz gel, a time će se brže kretati. Kao rezultat toga, oligonukleotidi će biti poredani silaznim redoslijedom, čitajući gel odozdo prema gore.

Oligonukleotidi iz svake od četiri PCR reakcije izvode se u četiri različite trake gela tijekom ručnog Sangerovog sekvenciranja. Ovo omogućuje korisniku da odredi koji oligonukleotidi koreliraju s kojim ddNTP.

Svi oligonukleotidi u automatiziranom Sangerovom sekvenciranju izvode se u jednoj kapilarnoj gel elektroforezi unutar opreme za sekvenciranje (18).



Posljednji korak je očitavanje gela kako bi se identificirala sekvenca ulazne DNK. Budući da DNK polimeraza sintetizira DNK samo u smjeru od 5' do 3', svaki terminalni ddNTP će odgovarati specifičnom nukleotidu u originalnoj sekvenci (na primjer, najkraći fragment mora završiti na prvom nukleotidu od 5' kraja, drugi- najkraći fragment mora završavati na drugom nukleotidu od 5' kraja, i tako dalje). Kao rezultat toga, tumačenjem traka gela od najmanjih do najvećih, možemo identificirati 5' do 3' sekvencu izvornog DNK lanca.

Ručno Sangerovo sekvenciranje uključuje očitavanje sve četiri vrpce gela odjednom, odozdo prema gore, i određivanje identifikacije terminalnog ddNTP za svaku vrpca. Ako donja vrpca u stupcu odgovara ddGTP, najmanji PCR fragment završava s ddGTP, a prvi nukleotid s 5' kraja izvorne sekvence ima guanin (G) bazu.

Računalo redom skenira svaku vrpca kapilarnog gela, koristeći fluorescenciju za određivanje identiteta svakog terminalnog ddNTP-a u automatiziranom Sangerovom sekvenciranju. Ukratko, laser aktivira fluorescentne oznake u svakoj traci, a računalo detektira svjetlo koje se emitira kao rezultat. Budući da svaki od četiri ddNTP-a ima jedinstvenu fluorescentnu oznaku, oslobođeno svjetlo izravno je povezano s identitetom terminalnog ddNTP-a. Rezultat je kromatogram koji prikazuje vrh fluorescencije svakog nukleotida duž duljine uzorka DNK (18).

Svaki dNTP sastoji se od fosfatne skupine, šećerne skupine i jedne od četiri dušične baze [adenin (A), timin (T), gvanin (G) ili citozin (C)]. Šećerno-fosfatni lanac formiran je fosfodieterskim kovalentnim vezama koje se formiraju između šećera jednog dNTP-a i fosfatne skupine sljedećeg.

Da bi se stvorila dvolančana spirala DNK, dušične baze dvaju različitih niti spojene su vodikovim vezama između komplementarnih baza (18).

Najznačajnije inovacije u Sangerovom sekvenciranju bile su: (1) razvoj fluorescentnih (terminirajućih) boja, (2) upotreba termičkog ciklusa sekvenciranja za smanjenje količine potrebne ulazne DNK i termostabilnih polimeraza za učinkovito i točno uključivanje terminirajućih boja u rastuće DNK niti, i (3) razvoj softvera za tumačenje i analizu sekvenci (19).

Sangerovo sekvenciranje još uvijek je široko korišteno u raznim područjima biologije i medicine, ali danas uglavnom služi kao potvrdni test u dijagnostici, a ne kao primarna metoda dijagnostike.

## 2.1. Projekt humanog genoma

Nakon uvođenja tehnika za manipulaciju i analizu DNK, kao što je otkriće i uporaba restrikcijskih enzima ("molekularnih škara") u kasnim 1960-im i ranim 1970-im (12) i razvoj metoda hibridizacije temeljenih na DNK, uključujući Southern blot 1975., (12) pojavila se molekularna dijagnostika temeljena na DNK.

Victor McKusick, jedan od utemeljitelja medicinske genetike, predložio je ideju mape ljudskog genoma 1969. godine. Radionice mapiranja ljudskih gena održavale su se redovito počevši od 1973. godine kako bi se prikupili podaci mapiranja. Projekt humanog genoma započeo je 1991. i procjenjuje se da je koštao više od 2,7 milijardi američkih dolara. Druge zemlje, ponajviše Francuska, Ujedinjeno Kraljevstvo i Japan, ubrzo su pokrenule svoje velike nacionalne programe humanog genoma, a kasnije im se pridružio niz drugih zemalja. Organizacija za humani genom, međunarodna organizacija osnovana za poticanje suradnje među znanstvenicima genoma, koordinirala je ove pojedinačne nacionalne projekte (20).

Projekt ljudskog genoma, pokrenut s ciljem sekvenciranja cijelog ljudskog genoma, suočio se sa značajnim izazovima zbog prisutnosti velikih dijelova repetitivne DNK koju je bilo teško klonirati i sekvencirati. Štoviše, smatralo se da bi fokusiranje na mali dio genoma koji uključuje eksprimirane sekvence ili gene bilo vrijednije za medicinska i biološka istraživanja. Rane tehnike sekvenciranja bile su isrppljujuće budući da je jedan laboratorijski djelatnik mogao sekvencirati oko 2000 parova baza (bp) dnevno. Međutim, tehnološki napredak u sekvenciranju DNK brzo je povećao stopu proizvodnje podataka. Do sredine 1995. više od polovice genoma kvasca bilo je sekvencirano, a potpuni genomski slijed prijavljen je 1996. Napredak se nastavio sekvenciranjem punog slijeda DNK nematode *Caenorhabditis elegans* objavljenim 1998. i sekvenciranim ljudskog 22. kromosoma od 50 milijuna pb do kraja 1999. Zahvaljujući ovom napretku, "radni nacrt" humanog genoma, koji pokriva 90% genoma, objavljen je u veljači 2001. Gotova sekvenca, sa preko 99% pokrivenosti, objavljena je u travnju 2003, više od dvije godine prije roka za objavu kompletne sekvence. Ovo postignuće dalo je istraživačima potpuni katalog od približno 20 000 gena i postavilo temelje za biomedicinska istraživanja u narednim desetljećima (20).

## 2.2. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Potreba za financijski pristupačnijim sekvenciranjem potaknula je razvoj tehnologije sekvenciranja visoke propusnosti koja može proizvesti milijune sekvenci odjednom. Nova generacija (ili druga generacija) "klonskih" sekvencera koristi *in vitro* kloniranje za umnožavanje pojedinačnih DNK molekula emulzijom ili prenosnim PCR-om. Klonirane molekule DNK zatim se paralelno sekvenciraju pomoću metode sekvenciranja sintezom, uz lasersko skeniranje koje se koristi za otkrivanje fluorescentnih baza. Očitavanja sekvence prilično su kratka (150-250 bp) i moraju se uskladiti s referentnom sekvencom kako bi se otkrile varijacije koje uzrokuju bolest. (20). Bioinformatičke analize se koriste za spajanje fragmenata DNK. Svaka od tri milijarde baza ljudskog genoma sekvencirana je mnogo puta, pružajući ogromnu dubinu za prikaz preciznih podataka i uvid u neočekivane varijacije DNK. NGS se može koristiti za sekvenciranje kompletnih genoma ili za fokusiranje na određena područja interesa, kao što je svih 22 000 kodirajućih gena (cijeli egzom) ili ograničeni broj pojedinačnih gena (21).

Prva klinička primjena NGS-a bila je hvatanje i analiza malih skupina gena u svrhu pronalaska varijacija koje uzrokuju bolest ili su predisponirajuće za određenu bolest. Walsh i *sur.* primijenili su ovu metodu 2010. godine za analizu 21 gena odgovornih za nastanak karcinoma dojke i jajnika, kada su istovremeno, nakon hibridizacije, analizirali sekvencu za te gene, u kohorti od 20 žena koje su imale poznatu mutaciju u jednoj od predisponirajućih gena za nastanak raka dojke i jajnika (12).

Ova uspješna studija postavila je temelje za širok raspon ciljanih genskih panela koji se sada koriste u dijagnostičkim laboratorijima diljem svijeta. Ciljani paneli obično procjenjuju između 2 i 500 gena, s različitim dijagnostičkim tehnikama ovisno o specifičnosti kliničkog fenotipa, diferencijalnoj dijagnozi i genskoj heterogenosti (12).

Većina varijanti koje uzrokuju bolesti (85%) koncentrirana je u 1-2% genoma koji kodira proteine (egzonske regije), a egzom je skup svih egzona. Metodom sekvenciranja egzoma, egzoni se mogu selektivno "uhvatiti", dovodeći do značajnog smanjenja količine sekvenci u usporedbi sa cijelogenomskim sekvenciranjem, omogućujući relativno učinkovit test za nove uzroke genetskih

bolesti ili identifikaciju patogene varijante u genima koji su otprije poznati kao uzročnici bolesti (12).

Sekvenciranje egzoma ima značajan utjecaj na kliničku praksu budući da su blaži zahtjevi za preciznim kliničkim fenotipom, za razliku od naručivanja testiranja jednog gena, gdje se odluka o tome koji će se gen testirati mora donijeti unaprijed. Doista, nedavna meta-analiza dijagnostičkog učinka sekvenciranja egzoma za neurorazvojne poremećaje otkrila je da se sekvenciranje egzoma treba koristiti kao test prve linije pri sumnji na navedene poremećaje (12).

Metode sekvenciranja nove generacije koriste sekvenciranje kratkog čitanja sekvenca.

Neke prednosti koje se navode kod metoda sekvenciranja kratkih čitanja su široka dostupnost zbog velike uspostave u većini dijagnostičkih laboratorija, veća točnost i niža cijena. Ograničenja koja su specifična za sekvenciranje kratkog čitanja uglavnom se odnose na duljinu generiranih čitanja. Budući da su kratki, možda neće biti moguće preslikati očitavanja na određenu regiju referentnog genoma iz kojeg dolaze. Ako se očitavanja ne mogu preslikati na referentni genom, mogu se odbaciti, što dovodi do praznine u podacima sekvenciranja. Stoga može biti teško sekvencirati gene s pseudogenom ili gene u repetitivnim regijama. Poremećaje ekspanzije ponavljanja može biti teško točno otkriti, osobito ako duljina kratke regije tandemskog ponavljanja premašuje duljinu očitavanja. Zbog toga se obično testiraju zasebno.

Nadalje, sekvenciranje kratkog očitavanja obično ima slabije rezultate u otkrivanju CNV-a i strukturnih varijanti od tehnika zlatnog standarda kao što su mikropostroji ili kariotipizacija. Promjene metilacije moraju se proučavati jer se ne mogu prepoznati.

Sekvenciranje dugotrajnog očitavanja sve je popularnije u kliničkim primjenama budući da prevladava neke od ovih problema (22).

Metode sekvenciranja nove generacije mogu se grupirati u dvije glavne podkategorije; sekvenciranje hibridizacijom (SBH – *engl.* sequencing by hybridization) i sekvenciranje sintezom (SBS – *engl.* sequencing by synthesis). SBS metode su daljnji razvoj Sangerovog sekvenciranja, bez dideoksi terminanti, u kombinaciji s ponovljenim ciklusima sinteze, slikanja i metoda za ugradnju dodatnih nukleotida u rastući lanac (19).

## **Sekvenciranje hibridizacijom**

Ova je metoda razvijena 1980-ih godina, korištenjem raspoređenih DNK oligonukleotida poznatog slijeda koji su na filtrima hibridizirani s obilježenim fragmentima DNK koje treba sekvencirati. Kako bi se utvrdilo odgovaraju li obilježeni fragmenti slijedu DNK sonde na filtru, radile su se uzastopne hibridizacije i ispiranje neželjene nehibridizirane DNK. Time je omogućeno izgrađivanje informacija o većem kontinuiranom nizu temeljem informacija koje se preklapaju iz hibridizacijskih točaka sonde.

Sekvenciranje hibridizacijom je u velikoj mjeri potisnuto u tehnologije koje ovise o korištenju specifičnih sonda za ispitivanje sekvenci, npr. dijagnostičke aplikacije za identifikaciju SNP-ova povezanih s bolešću u specifičnim genima ili identificiranje grubih abnormalnosti kromosoma (preraspodjele, delecije, duplikacije ili CNV-ovi) (19).

## **Sekvenciranje sintezom**

Trenutne SBS tehnike razlikuju se od izvorne Sangerove strategije sekvenciranja po tome što se oslanjaju na znatno kraća čitanja (danas do otprilike 300-500 baza). Osim toga, obično imaju višu stopu pogreške od Sangerovog sekvenciranja i oslanjaju se na visoku pokrivenost sekvence ("masivno paralelno sekvenciranje") od milijuna do milijardi kratkih očitavanja sekvenci DNK (50 do 300 nukleotida) kako bi proizveli točnu sekvencu na temelju otkrića konsenzusnog (sporazumnog) niza. Međutim, za neke tehnologije se pojavljuju pogreške konteksta slijeda i ne mogu se uvijek ispraviti povećanjem broja čitanja (19).

Prijelaz s "dužih duljina čitanja" na tehnologije "kratkog čitanja" sada ide u smjeru razvoja tehnologija koje generiraju duže primarne duljine čitanja, zadržavajući pritom "masivno paralelnu" prirodu tehnologije, a to se događa u tehnologijama "treće" i "četvrte" generacije. Ovo je djelomično potaknuto cijenom po reakciji, a dijelom željom da se dobije što više informacija o čitanju primarne sekvence kako bi se zaobišli problemi konteksta sekvence kao što su ponovljeni elementi DNK (19).

Većina SBS tehnologija koristi tehniku u kojoj se pojedinačne molekule DNK koje treba sekvencirati dijele u brojne odvojene jažice ili komore ili se pričvršćuju na određena mjesta na

čvrstoj površini. Molekule DNK, umnožene pomoću PCR-a ili modificiranih metoda amplifikacije "kotrljajućeg kruga", zatim se izlažu reakcijama sinteze DNK gdje se označeni nukleotidi ili kemijske reakcije koje uključuju ugradnju specifičnog nukleotida mogu promatrati ili detektirati na različite načine. Osmišljene su brojne inovativne tehnologije kako bi se olakšala proizvodnja milijuna čitanja sekvenci DNK u jednoj operaciji sekvenciranja. Trajanje izvođenja niza može varirati od sati do nekoliko dana, ovisno o propusnosti (19).

#### **454 Pirosekvenciranje**

Ova tehnika, unatoč tome što se više ne koristi, bila je pionir u metodama sekvenciranja druge generacije. Djelovao je na principu otkrivanja pirofosfata, nusprodukata, kada se baza doda rastućem lancu DNK. Proces je uključivao umnožavanje fragmenata DNK, u rasponu od 400 do 700 parova baza, kroz jedinstvenu reakciju kuglica emulzije. Ova je metoda bila posebno omiljena za sekvenciranje genoma i metagenoma zbog svoje sposobnosti da proizvede duge duljine očitavanja i relativno visoke propusnosti (19).

#### **Ion Torrent**

Ova je metoda revolucionirala sekvenciranje transformacijom sekvence nukleotida u digitalne podatke pomoću poluvodičkog čipa. Proces funkcionira oslobađanjem iona vodika kada se ispravni nukleotid doda rastućem lancu DNK, uzrokujući promjenu u pH otopine koja se može otkriti kao promjena napona. Sustav Ion Torrent, svestran je i podržava širok raspon primjena, uključujući ciljano sekvenciranje DNK i RNK, sekvenciranje transkriptoma, mikrobnog sekvenciranje, otkrivanje varijacija broja kopija, sekvenciranje malih RNK i miRNK i CHIP-seq (19).

#### **Tehnologija Illumina**

Illumina, dominantna sila u polju sekvenciranja nove generacije, koristi metodu poznatu kao "amplifikacija mosta". Ova tehnika uključuje upotrebu molekula DNK s vezanim adapterima na svakom kraju kao supstrata za ponovljene reakcije sinteze pojačanja na čvrstom nosaču, kao što je predmetno staklo, koje sadrži oligonukleotidne sekvence. Illumina sekvenciranje podržava razne protokole uključujući genomsko sekvenciranje, exome i ciljano sekvenciranje, metagenomiku,

RNK sekvenciranje, CHIP-seq i metode metiloma. Različiti Illumina uređaji za sekvenciranje pružaju različite razine propusnosti, uključujući modele MiniSeq, MiSeq, NextSeq, NovaSeq i HiSeq (19).

### **INDELS – insercije i delecije**

Insercije i delecije (INDEL – *engl.* insertions and deletions) su drugi najčešći oblik genetske varijacije, nakon polimorfizama jednog nukleotida (SNP), i mogu uzrokovati sličnu razinu varijacije. Mnogi indeli nalaze se na funkcionalno značajnim mjestima unutar ljudskih gena i vjerojatno će utjecati na ljudske osobine i bolesti, što ih čini ključnima za personaliziranu medicinu. Detekcija, validacija i genotipizacija indela predstavljaju značajne izazove. Ulažu se naporima prema ponovnom sekvenciranju cijelog genoma kao pristupu za identifikaciju uzročnih varijanti pa će postati još važnije potpuno i točno otkriti indele (23).

U području kliničke molekularne onkologije, otkrivanje malih i srednjih indela važno je za mnoge vrste karcinoma. Dok se mali i srednji indeli mogu detektirati tradicionalnim metodama sekvenciranja, otkrivanje indela korištenjem NGS tehnologija je izazovno zbog kratkih duljina očitavanja. Mali indeli mogu se otkriti s razumnom osjetljivošću iz NGS podataka, ali je specifičnost često niska. Indele srednje veličine posebno je teško detektirati većinom metoda (24).

Indel softver za otkrivanje može se kategorizirati u četiri glavne vrste, iako postoji preklapanje među njima. Najčešće metode temelje se na poravnanju, optimizirane su za otkrivanje malih indela i često su uključene u popularne pakete za otkrivanje varijanti kao što su SAMtools, GATK ili VarScan. Metode temeljene na poravnanju koriste modele vjerojatnosti za identifikaciju indela na temelju početnog preslikavanja čitanja i procesa poravnanja. Različiti softverski programi koriste različite modele za razlikovanje pogrešaka poravnanja od pravih indela, što dovodi do odstupanja u indel pozivima. Međutim, nijedan se program nije pokazao potpuno točnim i svi zahtijevaju opsežnu provjeru valjanosti za kliničku upotrebu (24).

Metode temeljene na poravnanju imaju ograničenje u tome što indeli moraju biti sadržani unutar čitanja i identificirani tijekom početne faze mapiranja i poravnanja, ograničavajući otkrivanje

umetanja na približno 15% duljine čitanja. Međutim, mogu se otkriti veće delecije. Metode mapiranja podijeljenog čitanja, kao što je Pindel, mogu identificirati indele srednje veličine koje često propuštaju metode temeljene na poravnanju. Ove metode identificiraju neskladna očitavanja uparenih krajeva, gdje je jedan kraj poravnat s referentnom sekvencom, a drugi ne, dopuštajući identifikaciju umetanja duljih od duljine očitavanja. Metode mapiranja podijeljenog čitanja imaju veću stopu lažno pozitivnih rezultata, ali su prikladne za otkrivanje klinički relevantnih indela (24).

Metode preslikavanja čitanja na uparenom kraju otkrivaju velike indele uspoređujući očekivanu udaljenost između parova čitanja sa stvarnom mapiranom udaljenošću. Oni mogu otkriti umetanja i brisanja srednje veličine, ali često ne daju informacije o točnom slijedu indela. Ove su metode neosjetljive na male indele zbog poteškoća u razlikovanju malih poremećaja od normalne pozadinske varijabilnosti (24).

Druga klasa softvera za otkrivanje indela temelji se na metodama strojnog učenja. Ove metode koriste podatke skupa za obuku za filtriranje indela identificiranih različitim metodama, s ciljem smanjenja stope lažno pozitivnih rezultata. Iako ove novije metode obećavaju, zahtijevaju rigorozna testiranja kako bi se potvrdila njihova učinkovitost, posebno u izazovnim regijama kao što su homopolimerni traktovi i područja niske složenosti sekvenci (24).



### 3. POTEŠKOĆE U INTERPRETACIJI I SLUČAJNI NALAZI

Tumačenje podataka dobivenih NGS-om predstavlja višestruke izazove jer ogromna količina generiranih podataka o sekvencama zahtijeva specijalizirane timove za bioinformatiku koji su educirani za rukovanje podacima i analizu podataka. Podaci sekvence uspoređuju se s referentnim genomom kako bi se identificirale varijante, a filtri se primjenjuju kako bi se zadržale samo varijante visoke kvalitete. Prioritet se obično daje varijantama koje su rijetke i onima za koje se predviđa da će utjecati na funkcionalnost gena, obično mijenjanjem njegove sekvence koja kodira proteine (12).

NGS je, međutim, sklon i lažno pozitivnim i lažno negativnim rezultatima. Lažno pozitivni rezultati mogu biti rezultat čimbenika kao što su PCR artefakti, pogreške u sekvenciranju i niska pokrivenost. Na sreću, klinički laboratoriji imaju načine ili filtrirati te lažno pozitivne rezultate ili postaviti analitičke standarde kako bi definirali koje varijante zahtijevaju potvrdu drugim sredstvima. Lažno negativni rezultati, s druge strane, mogu se pojaviti zbog ispadanja alela ili problema s visokim sadržajem gvanina i citozina i složenim genomskim regijama što može rezultirati manjom pokrivenošću i neusklađenošću. Nekoliko profesionalnih skupina razvilo je standarde i smjernice koje pomažu laboratorijima u rješavanju ovih izazova (12).

Kritični izazov je tumačenje kliničkog značaja identificiranih varijanti. Važno je procijeniti rezultira li varijanta nefunkcionalnim ili slabo funkcionirajućim proteinima, što zahtijeva razmatranje nasljeđa, postojeće literature o funkcijama gena, profilima ekspresije i drugim čimbenicima. Međutim, tumačenje je komplicirano i čak se i iskusni laboratoriji često ne slažu oko klasifikacije varijante kao patogene, vjerojatno patogene, varijante nesigurnog značaja (VUS – *engl.* variant of uncertain significance), vjerojatno benigne ili benigne (12).

Štoviše, postoji izazov u izvješćivanju o varijantama koje su potencijalno patogene, ali imaju ograničenu kliničku valjanost, što znači da nema dovoljno informacija o njihovoj povezanosti s genetskim sindromom ili fenotipom. Oni se također klasificiraju kao VUS i kliničarima ih je teško protumačiti. Ulažu se naponi da se razviju metode koje mogu smanjiti nesigurnost u tumačenju (12).

Dodatno, NGS ima sposobnost identificiranja promjena u velikom postotku ljudskih gena, što je učinkovito u usporedbi s ispitivanjem gena jednog po jednog. Međutim, to također dovodi do identifikacije slučajnih i sekundarnih nalaza. Slučajni nalazi su varijante koje nisu povezane s kliničkim stanjem bolesnika, dok se sekundarni nalazi odnose na patogene varijante u određenim genima koji se smatraju medicinski opravdanim. Američko sveučilište za medicinsku genetiku i genomiku (ACMG – *engl.* American College of Medical Genetics and Genomics) razvilo je smjernice koje preporučuju da bi klinički laboratoriji trebali tražiti patogene varijante u 59 gena klasificiranih kao sekundarni nalazi, te ih prijaviti ako bolesnici žele te informacije. Preporuča se ne prijavljivati VUS u ovim genima jer mogu izazvati zabunu. Slučajni nalazi, s druge strane, nisu regulirani, a izvješćivanje se razlikuje među laboratorijima (12).

## 4. DUBINA I OBUHVAT ČITANJA

Dubina sekvenciranja odnosi se na prosječan broj puta kada je određeni nukleotid predstavljen u zbirci nasumičnih neobrađenih sekvenci. Obuhvat čitanja, s druge strane, može se odnositi na širinu pokrivenosti ciljnog genoma, definiranu kao postotak ciljnih baza koje su sekvencirane određeni broj puta (25).

Troškovi sekvenciranja često postavljaju ograničenja na količinu sekvenci koje se mogu generirati, a posljedično i na rezultate koji se mogu postići eksperimentalnim dizajnom. Veći obuhvat sekvenciranja neizbježno zahtijeva veće troškove. Teoretska ili očekivana pokrivenost je prosječan broj puta za koji se očekuje da će svaki nukleotid biti sekvenciran s obzirom na određeni broj očitavanja dane duljine i pretpostavke da su očitavanja nasumično raspoređena po idealiziranom genomu (25).

U studijama sekvenciranja nove generacije pokrivenost se često navodi kao prosječna neobrađena ili usklađena dubina čitanja, što označava očekivanu pokrivenost na temelju broja i duljine visokokvalitetnih čitanja prije ili nakon poravnanja s referencom (25).

Idealna metoda sekvenciranja genoma besprijekorno bi očitala sve nukleotide samo jednom, čineći to sekvencijalno od jednog do drugog kraja kromosoma. Međutim, u pristupima sekvenciranja u stvarnom svijetu, duljine čitanja su kratke i mogu sadržavati pogreške slijeda. Kako bi se to prevladalo, broj čitanja sekvenciranja može se povećati. Povećana dubina pokrivenosti stoga 'spašava' nedostatke u metodama sekvenciranja. Unatoč tome, stvaranje veće dubine kratkih čitanja ne liječi sve bolesti sekvenciranja. Na primjer, on sam ne može riješiti praznine sklopa koje su uzrokovane ponavljajućim područjima s duljinama koje se približavaju ili premašuju one duljine čitanja (25).

Dubina sekvenciranja i obuhvat čitanja su ključna razmatranja u genomskim analizama. Oni igraju ključnu ulogu u dizajnu eksperimenata sekvenciranja nove generacije i imaju značajne implikacije za tumačenje dobivenih podataka (25).

## 5. TEHNOLOGIJA U RAZVOJU

Raspon postupaka genetskog testiranja proporcionalan je s nizom kromosomskih promjena koje uzrokuju Mendelove bolesti. Tehnologije opisane u nastavku ili su nedavno usvojene ili su na rubu implementacije u kliničkim laboratorijima. Jedna zanimljiva tehnika koja se još uvijek proučava je optičko mapiranje, što je analiza sklopa genoma bez sekvenciranja. Optičko mapiranje je obećavajuće za rješavanje strukturnih varijacija (12), ponavljanje ekspanzije (12) i može imati značajan utjecaj na korištenje citogenetike raka zamjenom kariotipizacije, FISH-a i CMA drugim testovima (12). Doista, čini se da je putanja pedijatrijskog genskog testiranja usmjerena na pojednostavljenje postupaka kako bi se smanjio broj testova potrebnih za pronalaženje bilo koje mutacije koja uzrokuje bolest kako bi se uštedjelo vrijeme i novac. Kliničko sekvenciranje genoma utire put prema jedinstvenom, sveobuhvatnom genomskom dijagnostičkom testu za neuobičajene bolesti (12).

### **Kliničko sekvenciranje genoma**

Sekvenciranje genoma moglo bi zamijeniti sekvenciranje egzoma kao najpotpuniji klinički genomski dijagnostički alat u sljedećih 5-10 godina. Tehničke prednosti sekvenciranja čitavog genoma u odnosu na sekvenciranje egzoma uključuju (1) ravnomjerniju pokrivenost po egzonima, (2) pokrivenost nekodirajućih regija genoma; primjerice intergenskih, promotorskih, neprevedenih regija (UTR – *engl.* untranslated region) i intronskih regija, (3) CNV detekciju usporedivu s CMA (uključujući preslikavanje prijelomnih točaka), (4) sposobnost otkrivanja strukturnih preustroja kao što su uravnotežene translokacije i inverzije, i (5) bržu i jeftiniju pripremu knjižnice (12).

Brojne studije pokazuju kako se sekvenciranje genoma može izvesti brzo u slučaju akutno oboljelih bolesnika, novorođenčadi i bolesnika na pedijatrijskoj intenzivnoj njezi (12). Ova istraživanja i kliničke laboratorijske studije prvenstveno se odnose na bolesnike s brojnim kongenitalnim abnormalnostima i neurološkim karakteristikama (12).

## **DNK sekvenciranje dugih sekvenci**

Većina kliničkih laboratorijskih tehnika sekvenciranja nove generacije započinje kontroliranom fragmentacijom ljudskog genoma kako bi se stvorili fragmenti DNK od 200-500 bp. Nakon pripreme biblioteke, ti se fragmenti sekvenciraju sustavima koji se temelje na Illumini s duljinama kratkog čitanja od 100-250 bp. Iako kratke duljine očitavanja omogućuju vrlo točnu identifikaciju varijanti jednog nukleotida (SNV – *engl.* single nucleotide variant) i malih indela, ova metoda ima ograničenja kada su u pitanju druge vrste genetskih varijanti kao što su ekspanzije ponavljanja nukleotida, razlikovanje regija visoke homologije, strukturne varijante (uključujući neutralnu kopiju) i faze patogenih alela. Kako bi se riješili ti problemi, razvijene su tehnologije sekvenciranja dugog čitanja s duljinama čitanja većim od 10 000 bp (12). Sekvenciranje dugih sekvenci omogućuje dijagnostiku u teško dostupnim genomskim područjima i može pomoći u otkrivanju novih štetnih mutacija i gena odgovornih za nastanak bolesti (12).

Sekvenciranje pojedinačne molekule u stvarnom vremenu (SMRT – *engl.* single-molecule real-time sequencing) (Pacific Biosciences®) i praćenje električnih struja dok nukleinske kiseline teku kroz proteinske nanopore (Oxford Nanopore Technologies) dvije su vodeće tehnologije u razvoju u ovom području (12).

Ovaj se pristup može koristiti u studijama za otkrivanje klinički relevantnih strukturnih varijanti (12), a može sekvencirati i čitava proširenja ponavljanja nukleotida pronađena u genima kao što su HTT, FMR1 i ATXN10 (12).

Potencijalna buduća klinička primjena izgrađena na kontinuiranom poboljšanju tehnologije i propusnosti sekvenciranja bila bi izvođenje dugotrajnog sekvenciranja preko cijelog genoma i izvođenje *de novo* sklopa koji bi dao potpuno fazne genome specifične za bolesnika generirane neovisno o usklađivanju s referentnom sekvencom. *De novo* sklop genoma dugog čitanja bolesnika predstavlja budućnost ove tehnologije u nastajanju koja omogućuje otkrivanje svih normalnih i patogenih genomskih varijacija (12).

## **RNK sekvenciranje i analiza obrazaca metilacije**

Početne studije transkriptomike uvelike su se oslanjale na tehnologije mikronizova temeljene na hibridizaciji i nudile su ograničenu mogućnost potpunog katalogiziranja i kvantificiranja različitih molekula RNK koje se eksprimiraju iz genoma u širokom rasponu razina. Uvođenje visokoučinkovitih tehnologija poput NGS-a revolucionaliziralo je transkriptomiku dopuštajući analizu RNK putem cDNK sekvenciranja u masovnim razmjerima (RNK-seq) (26).

U usporedbi sa sekvenciranjem DNK, sekvenciranje glasničke RNK (mRNK – *engl.* messenger RNK) može pružiti jedinstvene informacije jer (1) omogućuje ispitivanje rezultata prekrajanja, (2) detektira ekspresiju specifičnu za alel i (3) omogućuje ispitivanje obilja mRNK, uz identificiranje varijanti germinativne linije koje se nalaze u kodirajućim regijama eksprimiranih transkripata (12).

RNK-seq se može promatrati kao hibridni test koji može pronaći patogene varijacije kodiranja i procijeniti abnormalnu ekspresiju i prekrajanje. Ključno je poboljšati pristupe za otkrivanje abnormalnih prekrajanja jer se procjenjuje da oko 10% svih varijacija koje uzrokuju bolesti ometaju prekrajanje. (12). Detekcijom netočnog prekrajanja, RNK-seq može postati važan dijagnostički alat u slučaju otkrivanja bolesti kod negativnih rezultata prilikom testiranja egzoma i genoma (12).

## 6. NOVA OTKRIĆA U PODRUČJU GENOMSKE PATOLOGIJE DJECE – ODABRANE BOLESTI

Pristup dijagnozi genskih bolesti je promijenjen postojanjem tehnologija genomskog sekvenciranja, posebice NGS-a. U zadnjih deset godina je tek manji postotak bolesnika sa sumnjom na monogensku bolest dobio dijagnozu, a mnogi bolesnici i obitelji još uvijek prolaze kroz opsežna klinička testiranja. Napredak u tehnologiji i analitici sekvenciranja DNK, kao i kliničko prihvaćanje sekvenciranja egzoma i genoma kao glavnih dijagnostičkih tehnika, rezultiralo je značajnim porastom stopa dijagnoza i novih mogućnosti liječenja za bolesnike koji pate od bolesti uzrokovanih genskim poremećajem ili od karcinoma. Put do dijagnoze danas je kraći te se dijagnoza može postaviti u roku od nekoliko dana ili tjedana (27).

### **Bainbridge-Ropersov sindrom**

Bainbridge-Ropersov sindrom nedavno je otkriven sindrom karakteriziran značajnim zaostajanjem u razvoju, poteškoćama s hranjenjem, niskim rastom, ulnarnom devijacijom šaka i promjenama lica koje karakteriziraju lučno položene obrve te deformitet nosa. Heterozigotna mutacija smještena je u genu *ASXL3* (*engl.* – additional sex combs-like 3) na kromosomu 18q12, a otkrivena je metodom sekvenciranja egzoma i genoma (28). Gen *ASXL1* je odgovoran za nastanak Bohring-Opitz sindroma (29) koji je karakteriziran teškim razvojnim poremećajem, primarno *in utero* zastojeom u rastu, poteškoćama s hranjenjem, mikrocefalijom, specifičnim kraniofacijalnim fenotipom koji uključuje egzoftalmus i *nevus flammeus* na čelu te specifičnim položajem ruku u fleksiji (30-32). *ASXL3* i *ASXL1* geni pripadaju istoj porodici gena (33). *ASXL3* se eksprimira u tkivima sličnim kao i *ASXL1* gen, uključujući mozak, leđnu moždinu, koštanu srž, jetru i bubrege, ali se njegova ekspresija odvija u manjoj mjeri (34). U istraživanju kojeg su provodili Balasubramanian i sur., (34) koristili su se metodom sekvenciranja egzoma na 12 sudionika studije i na njihovim roditeljima.

**Neurorazvojni poremećaj sa značajnim motoričkim oštećenjem i nemogućnošću govora – NEDMIAL (*engl.* – neurodevelopmental disorder with severe motor impairment and absent language)**

Genetske varijable igraju važnu ulogu u nastanku neurorazvojnih poremećaja, a velikom udjelu bolesnika s intelektualnim oštećenjem nastanak bolesti može se objasniti nekim genskim uzrokom. Kromosomske aberacije, varijanta broja kopija gena (CNV), točkasta mutacija ili manja insercija/delecija u jednom genu neki su od mogućih uzroka nastanka bolesti (35, 36).

Geni koji sudjeluju u nastanku intelektualnih oštećenja kodiraju proteine uključene u različite stanične funkcije koje mogu biti specifične za neurone, kao što su sinaptički proteini, ili sveprisutnije, kao što su proteini uključeni u globalnu kontrolu ekspresije gena na transkripcijskoj ili post-transkripcijskoj razini.

Metodama analize genoma se otkrio autosomno dominantni neurorazvojni poremećaj sa značajnim motoričkim oštećenjem i nemogućnošću govora (NEDMIAL) karakteriziran je usporenim psihomotornim razvojem. Bolesnici imaju teško intelektualno zaostajanje, hipotoniju mišića, poteškoće s hranjenjem i ataksiju. Također se nalazi i ponašanje karakteristično za bolesti iz spektra autizma. Revolucionarno istraživanje Lessela i sur.(37) dijagnosticiralo je NEDMIAL u 12 osoba i otkrilo je šest jedinstvenih *de novo* heterozigotnih missense varijanti u genu *DHX30* (*engl.* DExH-Box Helicase 30) (38).



## 7. GENOMSKA DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA – PREKRETNICA U PEDIJATRIJSKOJ MEDICINI

Od procijenjenih 7500+ genetskih poremećaja, većina pogađa djecu (39). Gensko testiranje ne služi samo za identifikaciju monogenetskih bolesti i odabir terapije u onkologiji (40), već i za identifikaciju osjetljivosti složenih svojstava (41). Utvrđivanje genetske etiologije je bitno za pedijatrijsku dijagnozu, što zauzvrat utječe na kliničku skrb, liječenje, obiteljsko savjetovanje i prognozu. Budući da neke bolesti mogu brzo progredirati, rana dijagnoza je ključna za bolji ishod bolesti. Za ona stanja koja se mogu liječiti, rana intervencija često je presudna za uspjeh terapije. Ovaj porast broja dijagnoza omogućuje molekularne uvide u nekoliko fenotipova koji dijele genetsko podrijetlo, ili obrnuto, ukazuje na to kako različite varijante gena mogu pridonijeti istoj kliničkoj bolesti. Informacije dobivene iz rezultata genetskih pretraga korisni su i u osoba oboljelih od bolesti u kojima je uloga genetike nedovoljno naglašena, kao što su zarazne bolesti. Genomski haplotip na kromosomu 3p, na primjer, ukazuje na visok rizik za respiratornu zahvaćenost kod infekcije virusom COVID-19 (42).

Napredak u otkrivanju i primjeni genske terapije proporcionalan je s napretkom u ranoj i brznoj dijagnozi neke bolesti. Ove izmjene u mogućnostima kliničke dijagnostike i terapije obuhvaćaju nadzor, kaskadno obiteljsko testiranje i liječenje karcinoma (kao što je Li-Fraumenijev sindrom), razvoj novih lijekova (modulatori gena CFTR specifičnih za mutaciju), nadomjesnu terapiju mutiranog gena virusom (spinalna mišićna atrofija) i ciljano liječenje genetske varijante epilepsije (piridoksin u bolesnika s mutacijama gena *ALDH7* mutacije) (27).

Ovi pomaci u kapacitetu dijagnostike označavaju prekretnicu u pedijatrijskoj medicini i daju priliku za razdoblje nakon postavljanja dijagnoze. Došlo bi do promjene paradigme kada bi se u potpunosti omogućilo brzo, učinkovito i pravedno postavljanje dijagnoze. Početna faza bila bi dijagnoza, slično kao provjera vitalnih znakova bolesnika prilikom posjeta zdravstvenoj ustanovi. Budućnost pedijatrijske medicine bit će određena načinom na koji to područje odgovori na četiri ključna problema koji će odlučiti o uspjehu ovog novog doba, a to su ograničenja dijagnostike, razumijevanje fenotipa, nejednakost u mogućnosti dobivanja dijagnoze te odgoda terapije (27).

Mogućnost dijagnosticiranja određene bolesti može biti prilično niska, uz stope uspješnosti od 20-40%, čak i kada se koristi sekvenciranje genoma (43-45). Pleiotropnost, različita penetracija bolesti, oligogenske i komplicirane varijante, (46) kao i uloge epigenetskih modifikatora, neki su od bioloških čimbenika koji pridonose ograničenjima dijagnostike koje znanost razumije, ali nije u mogućnosti u potpunosti riješiti te probleme. Još uvijek postoji puno prostora za poboljšanje načina testiranja. Sekvenciranje dugih sekvenci, kombiniranje sekvenciranja DNK s analizom ekspresije RNK i razumijevanje varijanti uzroka bolesti u nekodirajućim područjima genoma (tj. patogene varijante u regulatornim regijama) samo su neki od primjera novih sekvencirajućih tehnologija koje će iskoristiti u promjeni pristupu dijagnostici (27).

Dok sekvenciranje RNK proširuje onaj dio genoma koji se može interpretirati na intronske i nekodirajuće regije, sekvenciranje dugog čitanja može pomoći u rješavanju područja koja je teško sekvencirati i varijacija koje je teško nazvati (kao što su strukturne varijante koje se ne mogu identificirati sekvenciranjem kratkog čitanja ili mikroopstroji) (47). Potrebni su veći zajednički naponi i korištenje sofisticiranijih informacija o kliničkom fenotipu (27).

S brzim rastom kliničkog genetskog testiranja, raste i nepovezanost između rezultata ispitivanja i povezanosti bolesti. Kada se otkrije VUS; bolesnik, njegova obitelj i liječnik imaju poteškoće u razumijevanju ishoda testiranja i daljnjih koraka koje je potrebno (ili nije potrebno) poduzeti. Također, slabo su poznati razlozi za različitu penetraciju bolesti, kada roditelj nema izražen fenotip, ali dijete ima tešku bolest. Pronalaženje novih varijanti u genima povezanim s prepoznatim poremećajima može biti teško, čak i za stanja koja su naširoko istražena (27).

U bolesnika iz skupine manjina, onih iz skupina nižeg socioekonomskog statusa i bolesnika iz regija svijeta bez pristupa testiranju, postoji značajna razlika između mogućnosti postavljanja dijagnoze i stope dijagnoze. Ovaj jaz u dijagnozi pogoršan je činjenicom da su mnoge demografske skupine nedovoljno zastupljene u bazama podataka varijanti kao što je gnomAD, što otežava određivanje patogenosti rijetkih varijanti kod ljudi koji nisu zapadnoeuropskog podrijetla. Ove razlike u dijagnozi rezultirat će sve većom nejednakošću u liječenju. Važno je uzeti u obzir kako različite kulture vide zdravlje, bolest i vrijednost genetskog testiranja (48,49).

Postoje mogućnosti za smanjenje ovih nejednakosti, kao što je poboljšana edukacija i upoznatost pružatelja zdravstvenih usluga s tehnologijama genetskog testiranja ili proširenje zahtjeva osiguranja za pokriće testiranja. Također, potrebni su naponi Nacionalnog zavoda za zdravlje (NIH – *engl.* National Institute of Health) i drugih agencija za financiranje da zahtijevaju uključivanje različitih rasnih, etničkih i socioekonomskih skupina. Još jedna prilika za poboljšanje jednakosti bila bi proširenje genetskog testiranja na probir novorođenčadi (NIPS – *engl.* noninvasive prenatal screening) (50).

Također, otkrićem novih bolesti i bolesnika koji trebaju liječenje, potrebno je unaprijediti proces razvoja terapije, kao i njene isporuke. Razvoj novih lijekova može potrajati desetljećima, zahtijevajući značajne financijske izdatke i snalaženje u složenim regulatornim okvirima. S obzirom na to da određeni lijekovi imaju vrijednost u milijunima dolara, nejasno je kako uspostaviti ravnotežu između moralnih zahtjeva terapije i zdravstvene skrbi na slobodnom tržištu (27).

Nadalje, bolesnici koji su u nepovoljnom položaju možda neće imati pristup terapijskim postupcima koji spašavaju živote. Potrebno je uzeti u obzir nove paradigme, primjerice traženje zajedničkih patofizioloških putova umjesto razvijanja jedinstvenih tretmana za svaku bolest. Ovim pristupom bi se bolesnici s rijetkim bolestima liječili sličnim, molekularno ciljanim terapijama koje se temelje na uobičajenim biokemijskim ili genetskim putevima (27).

Područje pedijatrijske medicine spremno je za tranziciju prema "razdoblju nakon postavljanja dijagnoze", ali uspjeh i ishodi primarno ovise o procesima koji se trenutno provode. Važne komponente ove transformacije su napredak dijagnostičke tehnologije, razumijevanje povezanosti genetske varijante s fenotipom, prevladavanje razlika i prevođenje dijagnoze u terapiju. Novo okruženje za zdravlje djece može se stvoriti usklađenim, koordiniranim partnerstvom između javnog i vladinog sektora, istraživača i medicinskih stručnjaka, bolesnika i obitelji (27).

## 8. ZAKLJUČAK

U posljednjim desetljećima, područje genomike doživjelo je značajan napredak, pružajući neviđene mogućnosti za razumijevanje ljudskih bolesti i unaprjeđenje zdravstvene skrbi. Međutim, ovaj brzi napredak donio je brojna etička, pravna i društvena pitanja koja predstavljaju izazove za društvo.

U svijetu gdje se ljudski genom, sastavljen od otprilike 3 milijarde parova baza, na prvi pogled čini jednostavnim, dublje promišljanje otkriva nevjerojatnu složenost podataka koje ovaj kod sadrži. Projekt ljudskog genoma stvorio je tehnike za zamjenu sporih, skupih i radno intenzivnih tehnologija koje su se koristile u vrijeme pokretanja projekta, omogućujući brzo, jeftino i precizno određivanje cijelog linearnog slijeda genoma.

Klinička genetika većinom se oslanjala na dvije vrste genetskih testova: citogenetske testove niske rezolucije, koji obuhvaćaju cijeli genom, i visoko fokusirane, molekularne pojedinačne genske testove visoke rezolucije. S razvojem NGS tehnologija, postalo je moguće brzo, jeftino i precizno odrediti cijeli linearni slijed genoma, čime se mijenja pristup dijagnostici genetskih bolesti.

Rijetke bolesti predstavljaju poseban izazov. No, zahvaljujući napretku u tehnologiji i metodologiji, mogućnosti za postavljanje genetske dijagnoze za ove bolesti su se značajno povećale.

Kako se tehnologija i znanstvena spoznaja nastavljaju razvijati, očekuje se da će se ovaj trend nastaviti, pružajući sve veće mogućnosti za razumijevanje i liječenje genetskih bolesti. Genomika ima potencijal pružiti dublje razumijevanje ovih neuobičajenih bolesti, kao i temeljne uvide u biološke procese, što će imati duboki utjecaj na način pružanja medicinske skrbi ovim bolesnicima i njihovim obiteljima.

## **9. ZAHVALE**

Najveće zahvale upućujem svojoj obitelji i ostalim voljenima na svoj ljubavi i strpljenju, bez čije podrške završetak ovog studija ne bi bio moguć.

## 10.LITERATURA

1. Ecker, C, Bookheimer, SJ, Murphy, DGM. Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan. *Lancet Neurol.* Nov;14(11):1121-34. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00050-2. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25891007.
2. Boycott KM, Rath A, Chong JX, Hartley T, Alkuraya FS, Baynam G, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet.* 2017 May 4;100(5):695-705. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.04.003. PMID: 28475856; PMCID: PMC5420351.
3. European Organisation for Rare Diseases. Rare Diseases: Understanding this Public Health Priority. (Eurodis, 2005). Dostupno na: [https://www.eurordis.org/wp-content/uploads/2009/12/princeps\\_document-EN.pdf](https://www.eurordis.org/wp-content/uploads/2009/12/princeps_document-EN.pdf)
4. Boycott, K. M. et al. International cooperation to enable the diagnosis of all rare genetic diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 2017. 100, 695–705.
5. Quintana-Murci, L. Understanding rare and common diseases in the context of human evolution. *Genome Biol.* 2016. 17, 225
6. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. DDD study. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet.* 2015 Apr 4;385(9975):1305-14. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61705-0. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25529582; PMCID: PMC4392068.
7. Deciphering Developmental Disorders Study. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* 542, 433–438 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature21062>
8. Wright, C, FitzPatrick, D & Firth, H Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nat Rev Genet* 19, 253–268 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.116>
9. Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S. Guidelines for human gene nomenclature. *Nat Genet.* 2020 Aug;52(8):754-758. doi: 10.1038/s41588-020-0669-3. PMID: 32747822; PMCID: PMC7494048

10. Misteli T. The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):28-45. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.014. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32976797; PMCID: PMC7541718
11. Baynam G, Pachter N, McKenzie F, Townshend S, Slee J, Kiraly-Borri C, et al. The rare and undiagnosed diseases diagnostic service - application of massively parallel sequencing in a state-wide clinical service. *Orphanet J Rare Dis*. 2016 Jun 11;11(1):77. doi: 10.1186/s13023-016-0462-7. PMID: 27287197; PMCID: PMC4902909.
12. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic Diagnosis for Pediatric Disorders: Revolution and Evolution. *Front Pediatr*. 2020 Jul 8;8:373. doi: 10.3389/fped.2020.00373. PMID: 32733828; PMCID: PMC7360789.
13. Motulsky AG. Forward In: Bennett RL. *The Practical Guide to the Genetic Family History*. 1999; New York, NY: Wiley-Liss
14. GeneTests [Internet]. Glossary. 2002; [pristupljeno 22.6.2023] Dostupno na: <http://www.genetests.org>
15. Bennett RL. *The Practical Guide to the Genetic Family History*. 1999; New York, NY: Wiley-Liss
16. Nature [Internet], Chromosome mapping: Idiograms, Cambridge, USA; *Nature Science*; 2014; [pristupljeno 22.6.2023.] Dostupno na: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/chromosome-mapping-idiograms-302/#:~:text=With%20chromosome%20maps%20called%20idiograms,and%20locate%20abnormal%20gene%20forms.&text=Most%20cytogeneticists%20are%20skilled%20at,banding%20patterns%20of%20their%20arms>
17. Bilancia CG, Ganapathi M, Levy B. Prenatal Diagnosis of Chromosome Abnormalities. In: Pandya P, Wapner R, Oepkes D, Sebire N (eds). *Fetal Medicine*. Amsterdam: Elsevier. 2020. 233-246
18. Sigmaaldrich [Internet], Darmstadt: Merck KGaA, 2023. Sanger Sequencing Steps & Method, [pristupljeno 3.6.2023.]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>

19. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018 Apr;122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59. PMID: 29851291; PMCID: PMC6020069
20. Turnpenny P, Ellard S, Cleaver R. SECTION A The Scientific Basis of Human Genetics: Finding the Cause of Monogenic Disorders by Identifying Disease Genes. *Emery's Elements of Medical Genetics and Genomics*. 16th Edition. eBook ISBN: 9780702079672. Elsevier; 2020. Str: 172-174, 211
21. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013 Dec; 98(6):236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23986538; PMCID: PMC3841808.
22. Genomics Education Programme [Internet]; Health Education England, Birmingham, 2014, Short-read sequencing, [pristupljeno: 21.6.2023.], Dostupno na: [https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/short-read-sequencing/#:~:text=Short%2Dread%20sequencing%20is%20currently,300%20bases\)%20before%20being%20sequenced](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/short-read-sequencing/#:~:text=Short%2Dread%20sequencing%20is%20currently,300%20bases)%20before%20being%20sequenced)
23. Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 15;19(R2):R131-6. doi: 10.1093/hmg/ddq400. Epub 2010 Sep 21. PMID: 20858594; PMCID: PMC2953750
24. Abel HJ, Duncavage EJ. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet*. 2013 Dec;206(12):432-40. doi: 10.1016/j.cancergen.2013.11.002. Epub 2013 Nov 20. PMID: 24405614; PMCID: PMC4441822
25. Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2014 Feb;15(2):121-32. doi: 10.1038/nrg3642. PMID: 24434847
26. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*. 2011 Feb;12(2):87-98. doi: 10.1038/nrg2934. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21191423; PMCID: PMC3031867



27. Bonkowsky JL, Pastinen T, White P. The post-diagnostics world: charting a path for pediatric genomic medicine in the twenty-first century. *Pediatr Res.* 2023 Feb;93(3):457-459. doi: 10.1038/s41390-022-02144-2. Epub 2022 Jun 11. PMID: 35690684; PMCID: PMC9187847
28. Bainbridge MN, Hu H, Muzny DM, Musante L, Lupski JR, Graham BH, et al. De novo truncating mutations in ASXL3 are associated with a novel clinical phenotype with similarities to Bohring-Opitz syndrome. *Genome Med.* 2013 Feb 5;5(2):11. doi: 10.1186/gm415. PMID: 23383720; PMCID: PMC3707024
29. Hoischen A, van Bon BWM, Rodríguez-Santiago B et al: De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat Genet* 2011; 43: 729–731
30. Oberklaid F, Danks DM: The Opitz trigonocephaly syndrome. A case report. *Am J Dis Child* 1975; 129: 1348–1349
31. Bohring A, Silengo M, Lerone M et al: Severe end of Opitz trigonocephaly (C) syndrome or new syndrome? *Am J Med Genet* 1999; 85: 438–446
32. Hastings R, Cobben JM, Gillessen-Kaesbach G et al: Bohring-Opitz (Oberklaid-Danks) syndrome: clinical study, review of the literature, and discussion of possible pathogenesis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 513–519
33. Kuechler A, Czeschik JC, Graf E, Grasshoff U, Hüffmeier U, Busa T, et al. Bainbridge-Ropers syndrome caused by loss-of-function variants in ASXL3: a recognizable condition. *Eur J Hum Genet.* 2017 Feb;25(2):183-191. doi: 10.1038/ejhg.2016.165. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27901041; PMCID: PMC5255962
34. Sahtoe DD, van Dijk WJ, Ekkebus R, Ovaa H, Sixma TK. BAP1/ASXL1 recruitment and activation for H2A deubiquitination. *Nat Commun* 2016;7:10292
35. Gilissen, C., Hehir-Kwa, J.Y., Thung, D.T., van de Vorst, M., van Bon, B.W., Willemsen, M.H., et al. (2014) Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 511, 344–347 <https://doi.org/10.1038/nature13394>
36. Ropers, H.H. (2010) Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 11, 161–187 <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141640>

37. Alomaim MM, Mushiba AM. A Novel De Novo Mutation of the DHX30 Gene in a Patient With Neurodevelopmental Disorder, Severe Motor Impairment, and Absent Language (NEDMIAL). *Cureus*. 2023 Jan 12;15(1):e33682. doi: 10.7759/cureus.33682. PMID: 36643085; PMCID: PMC9837457
38. Lessel D, Schob C, Küry S, et al.: De novo missense mutations in DHX30 impair global translation and cause a neurodevelopmental disorder. *Am J Hum Genet*. 2017, 101:716-24. 10.1016/j.ajhg.2017.09.014
39. Berry JG, Poduri A, Bonkowsky JL, Zhou J, Graham DA, Welch C, et al. Trends in resource utilization by children with neurological impairment in the United States inpatient health care system: a repeat cross-sectional study. *PLoS Med*. 2012 Jan;9(1):e1001158. doi: 10.1371/journal.pmed.1001158. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22272190; PMCID: PMC3260313
40. Maese L, Schiffman JD. The evidence for expanded genetic testing for pediatric patients with cancer. *Future Oncol*. 2018 Feb;14(3):187-190. doi: 10.2217/fon-2017-0467. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29327612.
41. Brandler WM, Antaki D, Gujral M, Kleiber ML, Whitney J, Maile MS, et al. Paternally inherited cis-regulatory structural variants are associated with autism. *Science*. 2018 Apr 20;360(6386):327-331. doi: 10.1126/science.aan2261. PMID: 29674594; PMCID: PMC6449150.
42. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med*. 2020 Oct 15;383(16):1522-1534. doi: 10.1056/NEJMoa2020283. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32558485; PMCID: PMC7315890
43. Vanderver A, Bernard G, Helman G, Sherbini O, Boeck R, Cohn J, et al. Randomized Clinical Trial of First-Line Genome Sequencing in Pediatric White Matter Disorders. *Ann Neurol*. 2020 Aug;88(2):264-273. doi: 10.1002/ana.25757. Epub 2020 Jun 9. PMID: 32342562; PMCID: PMC8061316
44. Schoch K, Esteves C, Bican A, Spillmann R, Cope H, McConkie-Rosell A, et al. Clinical sites of the Undiagnosed Diseases Network: unique contributions to genomic medicine and

- science. *Genet Med.* 2021 Feb;23(2):259-271. doi: 10.1038/s41436-020-00984-z. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33093671; PMCID: PMC7867619
45. Balciuniene J, DeChene ET, Akgumus G, Romasko EJ, Cao K, Dubbs HA, et al. Use of a Dynamic Genetic Testing Approach for Childhood-Onset Epilepsy. *JAMA Netw Open.* 2019 Apr 5;2(4):e192129. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.2129. PMID: 30977854; PMCID: PMC648145
46. Chakravarti A. Magnitude of Mendelian versus complex inheritance of rare disorders. *Am J Med Genet A.* 2021 Nov;185(11):3287-3293. doi: 10.1002/ajmg.a.62463. Epub 2021 Aug 21. PMID: 34418293
47. Gaither JBS, Lammi GE, Li JL, Gordon DM, Kuck HC, Kelly BJ, Fitch JR, White P. Synonymous variants that disrupt messenger RNA structure are significantly constrained in the human population. *Gigascience.* 2021 Apr 5;10(4):giab023. doi: 10.1093/gigascience/giab023. PMID: 33822938; PMCID: PMC8023685
48. Scherr CL, Ramesh S, Marshall-Fricker C, Perera MA. A Review of African Americans' Beliefs and Attitudes About Genomic Studies: Opportunities for Message Design. *Front Genet.* 2019 Jun 14;10:548. doi: 10.3389/fgene.2019.00548. PMID: 31258547; PMCID: PMC6587098
49. Suther S, Kiros GE. Barriers to the use of genetic testing: a study of racial and ethnic disparities. *Genet Med.* 2009 Sep;11(9):655-62. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181ab22aa. PMID: 19752639
50. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Grand Rounds: Newborn screening and improved outcomes. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012 Jun 1;61(21):390-3. PMID: 22647744

# 11. ŽIVOTOPIS

## Marijana Udovičić

Datum rođenja: 22/02/1994 | Državljanstvo: hrvatsko | Spol: Žensko | Telefonski broj: (+385) 0 (Mobilni telefon) |

Adresa: Zagreb, Hrvatska (Kućna)

### ● RADNO ISKUSTVO

12/2016 – 10/2017 Zagreb, Hrvatska  
PRVOSTUPNICA MEDICINSKO-LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE KLINIKA ZA DJEČJE BOLESTI ZAGREB

Poduzeće ili sektor Zdravstvo I Socijalna Skrb

### ● OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2017 – 2023 Zagreb  
DOKTOR MEDICINE Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa Šalata ul. 2, 10 000, Zagreb

01/08/2022 – 02/09/2022 London, Ujedinjena Kraljevina  
STUDENT Imperial College London

Adresa Sir Alexander Fleming Building, Imperial College Rd, SW7 2AZ, London, Ujedinjena Kraljevina

2012 – 2016 Zagreb, Hrvatska  
BACC. MED. LAB. DIAGN. Zdravstveno veleučilište

Adresa Mlinarska cesta 38, 10 000, Zagreb, Hrvatska

2008 – 2012 Zagreb, Hrvatska  
MURANT GIMNAZIJE Prva gimnazija

Adresa Avenija Dubrovnik 36, 10 000, Zagreb, Hrvatska

### ● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
<b>ENGLESKI</b>	C1	C1	C1	C1	C1
<b>ŠPANJOLSKI</b>	A2	A2	A2	A2	A1
<b>FRANCUSKI</b>	A1	A1	A1	A1	A1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

### ● DIGITALNE VJEŠTINE

MS Office (Word Excel PowerPoint) | Internet | Windows | Social Media/Social Network

### ● DODATNE INFORMACIJE

#### VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: AM

Vozačka dozvola: B1

Vozačka dozvola: B