

# Celogenómové sekvenovanie v onkológii – od klinických štúdií k rutinnému diagnostickému využitiu

Mgr. Beáta Katrincsová, PhD.<sup>1</sup>, Mgr. Matúš Durdík, PhD.<sup>1,2</sup>, Mgr. Jaroslav Budiš<sup>3,4</sup>, doc. RNDr. Tomáš Szemes, PhD.<sup>3,4</sup>, prof. MUDr. Alexandra Kolenová, PhD.<sup>5</sup>, RNDr. Katarína Skalická, PhD., MPH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratórium klinickej a molekulovej genetiky LF UK a NÚDCH, Bratislava

<sup>2</sup>Oddelenie rádiobiológie, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

<sup>3</sup>Vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

<sup>4</sup>Geneton, s.r.o., Bratislava

<sup>5</sup>Klinika detskej hematológie a onkológie LF UK a NÚDCH, Bratislava

**Genomické zmeny v nádoroch sú veľmi komplexné a významne ovplyvňujú odpoveď na cieľnú terapiu. Globálne profilovanie nádorových génomov metódou celogenómového sekvenovania (WGS) sa stalo nevyhnutnou súčasťou viacerých klinických štúdií, ktoré poukazujú na jeho pridanú hodnotu a potenciál v rutinnom diagnostickom testovaní. Vďaka klesajúcim nákladom na WGS a jeho schopnosti analyzovať varianty všetkých tried v rámci jedného testu možno predpovedať jeho plynulý prechod z klinických štúdií do rutinnej diagnostickej praxe. Začlenenie WGS do štandardnej klinickej onkologickej starostlivosti bude náročnou cestou s viacerými výzvami. Napriek tomu, úplné využitie potenciálu genomickej medicíny v onkológii prostredníctvom pokročilej diagnostiky sľubuje významný progres v diagnostike, prognostifikácii a liečbe onkologických pacientov.**

**Kľúčové slová:** tumorigenéza, klinické štúdie, celogenómové sekvenovanie, transkriptomika

## Whole-genome sequencing in oncology – from clinical trials to routine diagnostic use

**Genomic alterations in cancer are highly complex and significantly impact the response to targeted therapy. Comprehensive profiling of cancer genomes using whole-genome sequencing (WGS) has become an essential part of several clinical studies, highlighting its added value and potential in routine diagnostic testing. With the decreasing costs of WGS and its ability to analyze variants of all types in a single assay, a seamless transition from clinical trials to routine diagnostic practice can be anticipated. Integrating WGS into standard clinical cancer care will be a challenging process with multiple obstacles. Nevertheless, fully harnessing the potential of genomic medicine in oncology through advanced diagnostics promises significant progress in the diagnosis, prognosis and treatment of cancer patients.**

**Key words:** tumorigenesis, clinical trials, whole genome sequencing, transcriptomics

Lek. genet. diagn., 2025;2(1): 12-17

## Úvod

Tumorigenéza je komplexný mnohostupňový proces, ktorý začína onkogénnou (*driver*) mutáciou v jedinej somatickej bunke (1). Tento prvotný genetický zásah poskytuje bunkám selekčnú výhodu, ktorá je základom pre ich následnú klonálnu expanziu. Počas procesu tumorigenézy sa v pôvodnom nádorovom klone postupne akumulujú ďalšie mutačné zásahy, ktoré vedú k ireverzibilnej progresii nádorového tkaniva do vysoko heterogénnej a invazívnej lézie. Frekvencia genetických zásahov v priebehu evolúcie nádorov závisí od kombinácie fyzikálnych faktorov, ktoré určujú rýchlosť ich výskytu a selektívnych tlakov, ktoré ovplyvňujú ich fixáciu v prostredí a súhrnne smerujú k propagácii prežitia a proliferácie nádorových klonov (2). Analýzy párových vzoriek nádorového a normálneho tkaniva vykona-

né pokročilými technikami sekvenovania ukázali, že *driver* mutácie a klonálna expanzia môžu byť prítomné už v morfológicky normálnych tkanivách. K transformácii normálneho tkaniva na nádorové však dochádza pomerne zriedkavo. Tieto poznatky naznačujú, že samotná *driver* mutácia zvyčajne nie je pre úplnú onkogenénnu transformáciu postačujúca. Je známe, že ochranu pred vznikom nádorov fyziologicky zabezpečuje onkogénna bariéra. Jej narušenie vplyvom podnetov z prostredia, ako aj starnutia, prostredníctvom mechanizmov, ktoré sú zatiaľ nedostatočne pochopené, je kľúčovou hybnou silou nádorovej transformácie. Predpokladáme, že onkogenéza je výsledkom vzájomnej súhry genetických, epigenetických a environmentálnych faktorov (1).

Nedávne pokroky v oblasti analýzy ľudského genómu a transkriptómu

metódami masívneho paralelného sekvenovania, jednojadrového RNA sekvenovania (*single-cell-RNA-seq*) a priestorovej transkriptomiky sľubujú revolúciu v náhlade do genomiky/transkriptomiky nádorov. Tieto techniky umožňujú komplexne zhodnotiť význam časovej a priestorovej heterogenity nádorov. Skúmanie nádorového genómu pomocou celogenómového sekvenovania (*whole genome sequencing*, WGS) poskytuje ucelený pohľad na biológiu a patogenézu nádoru, čím posúva perspektívy diagnostiky, prognostifikácie a terapeutických intervencií bližšie k precíznej medicíne. Tento článok sa zameriava na celogenómové sekvenovanie a jeho aplikácie v klinickej diagnostike, s dôrazom na jeho potenciál pri diagnostike onkologických ochorení detí a dospelých, pri stratifikácii pacientov do rizikových skupín a rozvoji cieľných terapií. Cieľom

je poskytnúť ucelený prehľad o aktuálnom stave poznania, výhodách, výzvach a perspektívach využitia WGS v onkologickej diagnostike a liečbe.

### **Molekulárno-genetická diagnostika v onkológii: Aktuálne možnosti a perspektívy**

Evolúcia nádoru je sekvenčný proces, ktorý zahŕňa sled mutačných zásahov, ktoré sa v nádorovom klone postupne akumulujú, kombinujú a kooperujú tak, aby zabezpečili úspešnú onkogenézu a následne dlhodobé prežívanie nádoru (1, 2). Nádorovo špecifické mutácie tvoria zmeny na úrovni niekoľko nukleotidov (jednonukleotidové varianty, malé inzercie a/alebo delécie), ako aj numerické alebo štrukturálne odchýlky od normálneho karyotypu variabilného rozsahu (vyvážené a nevyvážené translokácie, inverzie, duplikácie, delécie), zmeny v počte kópií konkrétnych chromozómov (aneuploidie), násobky základnej sady chromozómov t. j. dupli/multiplikácie, resp. delécie celého jadrového genómu (euploidie), prípadne sa manifestujú ako rozsiahle preskupenia genómu (komplexné štrukturálne prestavby, napríklad v dôsledku chromotripsie/chromoplexie). Cytogenetické a molekulárne zmeny prítomné v čase diagnózy predstavujú významné diagnostické, prognostické a terapeutické ukazovatele priebehu onkologického ochorenia, prípadne sa radia medzi prospektívne genetické/molekulárne markery, ktorých klinický význam čaká na objasnenie.

Zlatým štandardom v laboratórnej diagnostike onkologických ochorení je multimodálne testovanie zamerané na identifikáciu *driver* mutácií. Tento prístup sa zameriava na analýzu karyotypu a vyšetrovanie špecifických cytogenetických zmien pomocou metód konvenčnej a molekulárnej cytogenetiky (fluorescenčná *in situ* hybridizácia/FISH, *array* komparatívna genómová hybridizácia/*aCGH*), ako aj na cieľnú analýzu nukleotidovej sekvencie na úrovni DNA a/alebo RNA. V posledných rokoch sa do diagnostiky hematologických aj solídnych nádorových ochorení úspešne implementovalo sekvenovanie špecifických génových panelov asociovaných

s konkrétnou skupinou onkologických ochorení. Paralelná analýza vybraných klinicky významných molekulárnych markerov typu jednonukleotidových variantov (SNV) a/alebo malých inzercií a/alebo delécií postupne nahrádza konvenčné metódy ako PCR a jej modifikácie a Sangerovu sekvenačnú analýzu. Napriek svojej perspektíve v diagnostike a prognostickej stratifikácii, ako aj pri smerovaní liečebných stratégií, je však diagnostický prístup založený na panelovom sekvenovaní informatívny iba v oblastiach vybraných na analýzu, čím cieľi na obmedzenú skupinu variantov. Preto v prípade negatívneho výsledku nemá panelové sekvenovanie dostatočnú výpovednú hodnotu. Mnohé laboratória preto ponúkajú alternatívu v podobe identifikácie kódujúcich variantov v kandidátnych génoch klinicky významne asociovaných s onkologickými ochoreniami na základe sekvenovania celého exómu (*whole exome sequencing*, WES).

Určité skupiny pediatrických aj dospelých pacientov sa však vyznačujú onkologickým ochorením s nízkou mutačnou záťažou, pričom štandardná cytogenetická a molekulárna diagnostika, ani využitie metód na báze MPS v zmysle panelového sekvenovania a WES, v týchto prípadoch neodhalia prognosticky významný marker ochorenia. Recentné štúdie naznačujú, že v tejto skupine pacientov je vhodné zamerať sa na analýzu variantov lokalizovaných mimo kódujúcu oblasť genómu (štrukturálne varianty), prípadne vyhľadávať kandidátne markery na základe zhodnotenia variability epigenómu, nakoľko bolo opakovane preukázané, že nádorové a nenádorové genómy sa môžu významne líšiť v metylačných profiloch. Vzhľadom na tieto poznatky je potrebné pristúpiť k inovácii laboratórnych diagnostických algoritmov, čo by mohlo prispieť k zlepšeniu klinického manažmentu a optimalizácii terapeutických stratégií u pacientov, ktorých onkologické ochorenie ešte nebolo geneticky/molekulárne charakterizované (3).

Metóda WGS je zameraná na sekvenovanie kompletného genómu, vrátane kódujúcich (exóny) a nekódujúcich (intróny, promótoary, iné regulačné elementy) oblastí. Ponúka simultánnu identifikáciu sekvenčných aj štrukturálnych variantov,

čím prepája centrálnu dogmu cytogenetiky a molekulárnej biológie. Okrem komplexných informácií o genetických variantoch v nádorovom genóme, umožňuje WGS analyzovať metyláciu DNA, teda kľúčový epigenetický mechanizmus, ktorý môže ovplyvniť expresiu génov v nádorových bunkách bez zmeny samotnej sekvencie DNA. Taktiež poskytuje kvantitatívne informácie o čistote nádorového materiálu (podiel nádorových buniek v analyzovanej vzorke, *tumor purity*) a nádorovej mutačnej záťaži (*tumor mutation burden*, TMD), čo je počet mutácií v genóme nádoru. TMB je významným ukazovateľom genetickej heterogenity nádoru a môže zohrávať dôležitú úlohu pri terapeutickom rozvahe. V súčasnosti je TMB prediktívnym markerom účinnosti imunoterapie (4).

### **Celogenómové sekvenovanie v klinických štúdiách: Nové horizonty v cielej terapii onkologických ochorení**

Klinické štúdie tvoria prvú líniu v hodnotení významu genetického profilovania pri stratifikácii pacientov do rizikových skupín a pri výbere vhodnej terapie. Prevažná väčšina klinických štúdií bola donedávna zameraná na jednotlivé histologické typy nádorov, špecifické genetické markery a konkrétne molekulárne liečivá, čo výrazne obmedzovalo počet onkologických pacientov vhodných na zaradenie do týchto štúdií. Navyše, počet perspektívnych molekulárnych agensov kontinuálne rastie, pričom recentné informácie o komplexite nádorového genómu a transkriptómu generujú neustále sa rozširujúci zoznam kandidátnych klinicky významných DNA variantov. Je preto nevyhnutné systematicky integrovať diagnostiku týchto nových variantov do klinických štúdií a vyhodnotiť ich potenciálnu prediktívnu hodnotu. Racionálnym riešením je využitie metódy WGS, ktorá umožňuje identifikovať genetické varianty všetkých tried v rámci jedného testu, vrátane pravdepodobne klinicky významných variantov, ktoré nekódujú proteíny.

V posledných rokoch sa objavujú inovované dizajny klinických štúdií, ktoré sa snažia zohľadniť dostupné poznatky o inter- a intra- individuálnej molekulár-

nej variabilite onkologických ochorení a potrebu hodnotenia väčšieho počtu genetických markerov. V rámci jedného protokolu klinickej štúdie môže byť združených niekoľko desiatok podštúdií, ktoré sa odlišujú charakteristikami randomizovanej populácie, ako aj liečebnými protokolmi, ktoré môžu byť v priebehu *follow-up* obdobia prispôsobené aktuálnemu stavu pacienta.

Príkladom sú *basket* štúdie, ktoré hodnotia účinnosť špecifických génových mutácií bez ohľadu na lokalizáciu a typ nádoru. V týchto štúdiách sa využíva rovnaká experimentálna liečba zameraná na konkrétnu mutáciu/variant, čo umožňuje hodnotiť účinnosť vybranej terapie pri rôznych ochoreniach alebo podtypoch ochorení. Konkrétne, multicentrická klinická štúdia *Basket of Baskets* (BoB) hodnotila účinnosť cieľných agensov v populáciách s pokročilými štádiami solídnych nádorov selektovaných na základe molekulárneho profilu primárneho nádoru a cirkulujúcej DNA metódami panelového/WGS/RNA sekvenovania (5). S podobným zameraním prebiehala prospektívna štúdia WIDE v Holandsku, ktorá hodnotila realizovateľnosť, validitu a pridanú hodnotu WGS v diagnostickom testovaní na základe analýzy vzoriek biopsií metastatických karcinómov v kohorte 1 200 pacientov (6, 7). Doba obratu molekulárneho profilovania pomocou WGS testu bola v tejto štúdií porovnateľná s aktuálnou molekulárnou diagnostikou, čo znamená, že čakacia doba pre lekárov a pacientov nebola predĺžená. Štúdia preukázala 99,2 % zhodu s výsledkami štandardných genetických vyšetrení a priniesla pridanú hodnotu, nakoľko na základe identifikácie terapeuticky cieliteľných genetických zmien bolo možné až 71 % pacientom ponúknuť aspoň jednu liečebnú modalitu.

Výsledky štúdie WIDE potvrdili, že WGS môže výrazne redukovať počet diagnostických chýb. Použitie WGS viedlo k zmene diagnózy u 14 % analyzovaných nádorov, čo následne umožnilo zmenu liečebného manažmentu pacientov. Navyše, táto metóda identifikovala nové terapeutické ciele u pacientov so sarkómom, čo prispelo k ich zaradeniu do štúdie s experimentálnou liečbou. Na základe výsledkov tejto štúdie sa holandský

onkologický inštitút stal v januári 2021 prvou nemocnicou v Holandsku, ktorá implementovala WGS do pravidelnej diagnostiky pre špecifické indikácie.

### Celogenómové sekvenovanie v onkologickej diagnostike: Prínos a potenciál identifikácie nových diagnostických a terapeutických markerov pre rutinnú diagnostiku

Zo štúdií zameraných na hodnotenie klinického významu WGS vyplýva, že genómové aberácie lokalizované v nekódujúcich oblastiach genómu môžu predstavovať dôležité diagnostické a prognostické ukazovatele onkologických ochorení. Interpretácia komplexných štruktúrnych variantov v nekódujúcich oblastiach genómu predstavuje zatiaľ neúplne prekonanú výzvu v interpretácii WGS dát. V tomto kontexte sa odporúča kombinovať WGS a transkriptómové sekvenovanie (*Whole Transcriptome Sequencing*, WTS). Finálne, prístup na báze WGTS (*Whole – Genome and Transcriptome Sequencing*) umožňuje detegovať štruktúrne varianty a zároveň hodnotiť ich funkčný význam na úrovni génovej expresie. Príkladom úspešnej klinickej aplikácie WGTS je nález identifikovaný v rámci komplexnej prestavby chromozómov (chromoplexie), ktorá viedla k nadmernej expresii onkogénu MYB prostredníctvom preskupenia enhancera (*enhancer hijacking*) génu NFIB do blízkosti tohto onkogénu vo vzorke adenoidného cystického karcinómu, ktorý iniciálne nevykazoval klinicky významné kódujúce varianty (8). Konvenčné diagnostické testy poukazujú na fúzne varianty MYB asi u 30 % prípadov adenoidného cystického karcinómu. Integrácia údajov o génovej expresii bola kľúčová pre anotáciu a reportovanie tohto nekódujúceho štruktúrneho variantu ako diagnostického markera v tejto skupine onkologických ochorení. V tej istej štúdií prispelo využitie prístupu WGTS k identifikácii taktiež nekódujúcich štruktúrnych variantov v oblasti TP53 (17p13.1) u pacientov s osteosarkómom, ktoré korelovali so stratou expresie génu TP53, čo poukázalo na ich funkčnú relevantnosť. Nález štandardnej

alely TP53 predstavuje inklúzne kritérium pre klinické štúdie zamerané na liečivá modulujúce p53 signálnu dráhu. Bez zaradenia WGTS do diagnostického algoritmu by mohlo dôjsť k chybnéj interpretácii mutačného profilu TP53 a nesprávnej indikácii terapie.

Priekopníkom v implementácii WGTS do diagnostiky hematologických a solídnych malignít sa stala pediatriká onkologická komunita americkej *St. Jude Children's Research Hospital* (9). V pilotnom systematickom hodnotení tohto prístupu dosiahla kombinácia metód WGS a WTS 98 % účinnosť pri detekcii patogénnych, diagnostických variantov v porovnaní s prístupom kombinujúcim WES a WTS, ktorý preukázal citlivosť na úrovni 78 % (10).

V štúdií zahŕňajúcej 210 vzoriek detskej B-bunkovej akútnej lymfoblastovej leukémie (B-ALL) metóda WGS spoľahlivo detegovala všetky klinicky významné cytogenetické markery B-ALL a jej výsledky plne korelovali s výsledkami štandardných diagnostických metód a s výsledkami WTS (11). Navyše umožnila identifikovať zatiaľ neopísané, cytogeneticky kryptické abnormality, vrátane nových fúzných génov a ďalších prestavieb, ktoré môžu slúžiť ako základ pre subklasifikáciu ďalších pacientov v rámci B-ALL (obrázok 1). Vďaka podrobnej charakterizácii genomických zmien metódou WGS sa v tejto práci podarilo identifikovať 294 subtyp-definujúcich genetických abnormalít celkom u 96 % (202/210) prípadov s B-ALL. Výsledky komparatívnej genomovej štúdie u pacientov s glioblastómom preukázali vyššiu účinnosť WGS/RNA-seq v porovnaní s cieľovými panelmi. Na rozdiel od panelového sekvenovania identifikovalo WGS o 39,5 % viac genetických variantov, avšak iba 10 % z identifikovaných potenciálne klinicky významných variantov ovplyvnilo liečebný manažment (12).

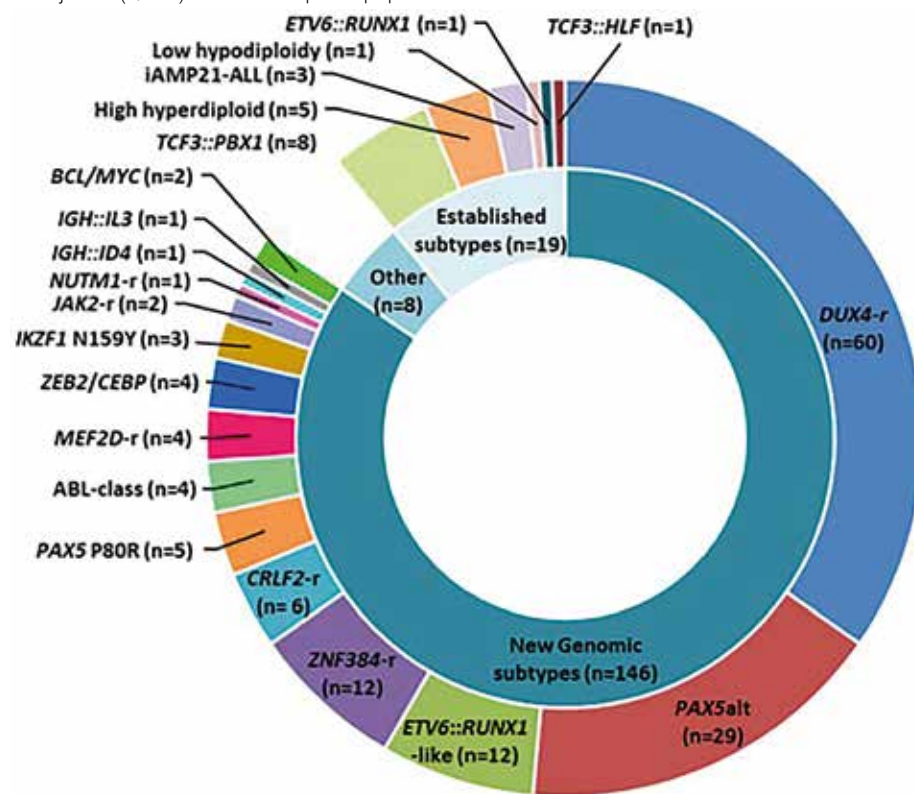
V oblasti systematickej implementácie algoritmu WGTS do diagnostiky onkologických ochorení u detí je významná švédka iniciatíva, ktorá zahrnuje do prospektívnej štúdie na báze WGTS všetky deti s primárnym alebo relabujúcim solídny nádorom (13). Algoritmus genomického profilovania v rámci tejto štúdie je zobrazený na obrázku 2. Pilotné výsledky získané analýzou 118

nádorových genómov poukazujú na prínos globálneho profilovania na báze WGTGS pri ďalšej subklasifikácii pacientov (50 % prípadov), ako aj pri identifikácii potenciálnych terapeutických cieľov (26 % prípadov) u detských onkologických pacientov.

### Prínos celogenómového profilovania pri liečebnej stratifikácii a optimalizácii cielej terapie onkologických pacientov

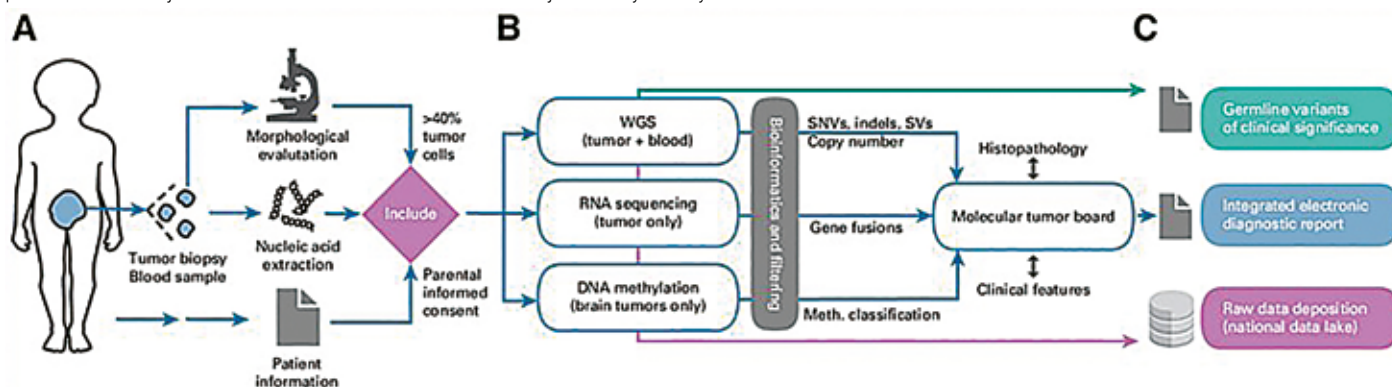
Genetická heterogenita nádorov významne ovplyvňuje efektívnosť liečby cielej na vybrané *driver* mutácie. Rôzne faktory, ako individuálne špecifické charakteristiky genómu a epigenómu, endogénne (napr. mechanizmy opravy DNA) a environmentálne faktory spoločne podmieňujú úspešnosť týchto terapií. Individuálne špecifické mutačné profily sú zodpovedné za variabilitu liečebnej odpovede a podmieňujú rezistenciu na terapiu aj v rámci geneticky a molekulárne definovaných prognostických podskupín. Príkladom je nález TP53 mutácií v kombinácii s prestavbou EML4::ALK u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC) (14). Nestabilita genómu vplyvom TP53 mutácií podmieňuje nedostatočnú liečebnú odpoveď na tyrozínkinázové inhibítory (ALK-TKIs) a má negatívny vplyv na celkové preží-

**Obrázok 1.** Genetické podtypy definované na základe globálneho profilovania B-ALL metódou WGS v súbore 173 detských pacientov bez rekurentného cytogenetického markera v čase diagnózy na základe štandardnej cytogenetickej diagnostiky. Prevzaté a upravené podľa (11). Aspoň 1 genetický marker bol identifikovaný u 165 pacientov, čo predstavuje 95 % (165/173) prípadov. V rámci tejto skupiny boli u 12 % (19/165) prípadov identifikované známe B-ALL špecifické genetické abnormality, pričom u ďalších 146 pacientov boli určené nové genetické zmeny. Pacientov bez cytogenetického markera B-ALL v čase diagnózy bolo možné na základe výsledkov genomického profilovania klasifikovať do 6 špecifických subtypov a zároveň bolo definovaných 15 nových subtypov B-ALL. Ani jednu zmenu na úrovni genómu nevykazovalo na základe genomického profilovania 8 pacientov, čo predstavuje 5 % (8/165) z celkového počtu prípadov.



Vysvetlivky: r – prestavba, alt – zmeny, other – prípady bez B-ALL špecifickej genetickej abnormality (n = 8)

**Obrázok 2.** Algoritmus komplexného WGTGS profilovania detských onkologických ochorení v rámci švédskej štúdie, prevzaté a upravené podľa (13). (A) Súbežne s diagnostickou biopsiou/resekciou nádoru sa odoberá vzorka čerstvého nádorového tkaniva a vzorka periférnej krvi. (B) DNA je extrahovaná z nádorového tkaniva a leukocytov periférnej krvi, RNA je extrahovaná len zo samotného nádorového tkaniva. Pacienti sú zaradení do štúdie po udelení informovaného súhlasu a overení životaschopnosti nádorových buniek (minimálny limit 40 %). Nádorová DNA je podrobená WGS, analýze metylácie DNA (iba nádory CNS) a RNA-Seq (v prípadoch s dostupným materiálom). (C) Údaje z WGS sú podrobené bioinformatickým analýzám, pričom sú vyvolané somatické varianty, germinálne varianty a klinicky významné varianty v rámci panelu génov asociovaných s onkologickými ochoreniami u detí typu SNV a malých inzercii a/alebo delécií. Paralelne sú identifikované varianty typu SV a CNV, a na základe RNA-Seq sa stanovujú fúzne gény. Pre každý nádor sú genetické nálezy posudzované v kontexte predbežnej histopatologickej diagnózy a klinického stavu pacienta v rámci molekulárnej nádorovej komisie. Následne je vydaná záverečná správa integrujúca histopatologické nálezy a molekulárne profily. Germinálna DNA je paralelne testovaná na známe varianty predisponujúce k nádorom u detí a na genetické varianty, ktoré by mohli ovplyvniť liečbu. Nespracované údaje zo sekvenčných a metylačných profilov sa ukladajú do národného dátového centra švédskej biobanky detských nádorov.



Vysvetlivky: DNA/RNA – deoxy/ribonukleová kyselina, CNS – centrálna nervová sústava, SNV – jednonukleotidový variant, SV – štrukturálny variant, CNV – variant v počte kópií

vane pacientov v porovnaní so skupinou s EML4::ALK pozitívnym (EML4::ALK<sup>+</sup>) nádorom bez TP53 mutácie. Nasledujúce štúdie využitím WGS poukázali na ďalšie štrukturálne varianty (translokácie) a varianty v počte kópií TP53 vo vzorkách EML4::ALK<sup>+</sup> NSCLC. Tieto poznatky poukázali na novú výzvu pri indikácii ALK-TKIs a zdôraznili potrebu ďalšej molekulárnej stratifikácie v tejto skupine onkologických pacientov.

Poznanie a pochopenie mechanizmov vzájomnej interakcie genetických/epigenetických zmien v nádorovom klone je kľúčovým faktorom pre výber vhodnej terapeutickú stratégiu a dosiahnutie želaných liečebných výsledkov. Vzhľadom na potenciál WGS usmerňovať ciele terapie a klinické rozhodovanie môžeme, za predpokladu zachovania trendu znižovania nákladov na komplexné genomické profilovanie, očakávať postupný prechod WGS z úrovne výskumu do klinickej praxe. Pred klinickou implementáciou WGS však bude potrebné okrem ekonomických otázok prekonať viaceré ďalšie výzvy. Najmä bude potrebné zjednodušiť laboratórne a analytické pracovné postupy tak, aby bolo možné spracovať obrovské množstvo dát v klinicky relevantnom čase. Zároveň bude nutné nastaviť citlivosť WGS a zabezpečiť správnu interpretáciu genetických nálezov v súlade s ich klinickým významom (15).

### **Analytické požiadavky spojené so začlenením celogenómového sekvenovania do precíznej onkologickej diagnostiky**

Hoci požiadavky na vstupný genetický materiál (DNA) pri testovaní jednotlivých génov sú v rozmedzí nanogramov (ng), multimodálny prístup molekulárneho testovania môže s rastúcim počtom vyšetovaných markerov rýchlo vyčerpať dostupný genetický materiál. Naopak, WGS vyžaduje jednorazovo 50 ng až 1 µg vstupnej DNA a umožňuje analyzovať všetky typy genetických variantov v jednom teste. Navyše, v prípade potreby je možné vykonať neobmedzený počet reanalýz genetických dát. Na dosiahnutie spoľahlivých výsledkov je však potrebné naplniť prísne požia-

davky na kvalitu vstupného genetického materiálu, vrátane koncentrácie, čistoty a integrity DNA (16). Keďže v priebehu formalínovej fixácie a konzervovania nádorových tkanív do parafínu (FFPE) dochádza k fragmentácii a chemickej modifikácii DNA, pre potreby WGS sa odporúča používať čerstvé alebo zamrznuté nádorové tkanivo. Pri diagnostike hematologických malignít je vstupným biologickým materiálom kostná dreň alebo periférna krv získaná v čase diagnózy.

Hoci ľudský genóm obsahuje niekoľko miliónov variantov, podiel získaných, nádorovo špecifických somatických variantov sa v závislosti od typu nádoru pohybuje na úrovni tisícov po státisíce. Kľúčovým aspektom WGS je v tejto súvislosti párová analýza vzoriek nádorového a morfológického normálneho (nenádorového) tkaniva, čo umožňuje optimálne rozlíšiť získané (somatické) nádorové varianty od germinálnych variantov. Kým somatické varianty sú špecifické pre nádorové bunky, germinálne varianty sú prítomné v zárodočnej línii, a teda v každej bunke organizmu. Tieto varianty sa zároveň môžu predávať potomstvu (dediť sa). Germinálne varianty vybraných génov, ktoré predisponujú k vzniku nádorov (hematologických aj solídnych), tvoria osobitnú skupinu familiárne viazaných nádorových syndrémov, ktoré však nie sú predmetom nášho súhrnu.

Pri diagnostike solídnych nádorov je vzorka germinálnej DNA získaná z periférnej krvi, zatiaľ čo výber optimálneho tkaniva v prípade hematologických malignít zostáva predmetom diskusií. Dôvodom sú riziká kontaminácie leukocytmi periférnej krvi, ktoré môžu byť prítomné v kandidátnych tkanivách, vrátane slín alebo kože. Preto sa pri identifikácii germinálnych variantov v prípade hematologických malignít odporúča uprednostniť pri párovej analýze ako zdroj germinálnej DNA kultivované kožné fibroblasty pred bukálnym sterom, prípadne zvoliť alternatívne zdroje (necht, vlasy). Ďalšou možnosťou je izolácia DNA zo sortovaných T lymfocytov (pri akútnej myeloblastovej leukémii, AML) alebo z periférnej krvi pacienta v období remisie akútnej leukémie (u ALL) (16, 17).

Veľmi dôležitým faktorom pri identifikácii genetických variantov je hĺbka čítania (*read depth*) sekvenovanej oblasti a podiel nádorových buniek v diagnostickej vzorke. Podľa odporúčaní Medzinárodného konzorcia pre genóm rakoviny (*International Cancer Genome Consortium*, ICGC) by mala byť diagnostická vzorka nádoru sekvenovaná v priemere 90 až 100x a vzorka zdravého tkaniva  $\geq 30x$  (16). V stanovení minimálneho podielu nádorových buniek v analyzovaných vzorkách sa rozsiahle genómové štúdie významne odlišujú. Kým ICGC pôvodne stanovil limit na úrovni 60 % nádorových buniek (histológia), projekt *Genomics of England* zameraný na zriedkavé ochorenia a nádory tento limit znížil na 40 %. V štúdiách zameraných na metastázujúce tumory alebo na leukémiu a lymfómy sa tento parameter pohyboval na úrovni 20 % (16). Je pritom dôležité poznamenať, že podiel nádorových buniek v histologickom preparáte nekoreluje vždy s hodnotami určenými na genomickej úrovni. Vo všeobecnosti platí, že sekvenovanie vzoriek s nízkym podielom nádorových buniek vyžaduje vyššiu hĺbku pokrytia na dosiahnutie požadovanej citlivosti a špecifity detekcie, čo však zvyšuje náklady za testovanie. Sekvenovanie exónov prostredníctvom WES dosahuje zvyčajne strednú priemernú hĺbku pokrytia (*coverage depth*) pre ciele kódujúce sekvencie (100 až 500x), pričom v tomto smere ponúka lepšie parametre v porovnaní s WGS (75 – 100). Avšak je potrebné zvážiť, že celkové pokrytie cieľových oblastí nebýva rovnomerné, na rozdiel od WGS. Pri diagnostickej rozvahe medzi WES/WGS je preto dôležité dôkladne zhodnotiť požiadavky na oblasti záujmu, typ variantov a hĺbku čítania (*read depth*) kandidátnych oblastí, nakoľko rovnomerné pokrytie celej sekvenovanej oblasti môže pri splnení podmienenej citlivosti detekcie významne kompenzovať obmedzenia spojené s nižšou priemernou hĺbkou pokrytia a poskytovať relevantné dáta na následnú bioinformatickú analýzu.

Dáta získané z WGS kladú vysoké nároky aj na výpočtovú infraštruktúru, skladovacie kapacity a kvalifikáciu personálu. Vybudovaná dátová infraštruktúra musí zabezpečiť efektívne spracovanie

a analýzu dát v primeranom časovom rámci, bezpečné dlhodobé uchovávanie dát a centralizáciu výsledkov, čo uľahčuje kontrolu kvality a anotáciu variantov. Rovnako je potrebné zabezpečiť flexibilitu, ale kontrolovaný prístup k dátam s dôrazom na ich bezpečnosť (18). Rozsiahle projekty sekvenovania ľudských genómov v okolitých krajinách, ako je Spojené kráľovstvo, Estónsko alebo Švédsko, túto potrebu vyriešili vybudovaním národných špecializovaných centier, ktoré poskytujú cloudovú infraštruktúru na centralizáciu spracovania a interpretácie genetických dát. Tieto iniciatívy znižujú náklady spojené s vývojom IT infraštruktúry v jednotlivých nemocničných zariadeniach. V krajinách s menej rozvinutou digitalizáciou zdravotníckych údajov by využívanie cloud computingu mohlo výrazne zefektívniť výpočtový výkon a kapacity na ukladanie údajov a zároveň poskytnúť bioinformatické expertízy prostredníctvom prekompilovaných kanálov (19). Bezpečnosť medicínskych údajov a ochrana súkromia pacientov sú v diagnostickom procese nevyhnutné aj z eticko-právneho hľadiska. Bez ohľadu na zvolenú výpočtovú platformu je nevyhnutné klásť vysoký dôraz na bezpečnosť údajov, predovšetkým zamedziť kombinované uchovávanie biologických dát s inými klinickými údajmi.

## Záver

Precízna medicína si vyžaduje nielen vysokoúčinné a dobre tolerované terapie, ale spolieha sa aj na presnú laboratórnu diagnostiku. Implementácia WGS do klinickej praxe predstavuje významný krok vpred pre onkologickú diagnostiku a liečbu. Hoci existujú výzvy,

ako napríklad náklady, zložitosť analýzy dát a etické otázky, potenciál tejto technológie pre zlepšenie prognózy pacientov a ich liečebných výsledkov je obrovský. Budúcnosť onkologickej starostlivosti bude pravdepodobne čoraz viac závislá od využívania multi-omických technológií, ktoré umožnia simultánne zachytiť všetky relevantné genetické zmeny a prispôsobiť liečbu individuálnej genetickej výbave každého pacienta. Kľúčom k úspechu bude ďalší výskum, zjednodušenie laboratórnych a analytických metód a zlepšenie etického rámca pre využívanie týchto pokročilých diagnostických nástrojov v každodennej klinickej praxi.

**PodĎakovanie:** Táto práca bola podporená Agentúrou pre vedu a výskum, grant: APVV-23-0657

*Autori článku čestne vyhlasujú, že nie sú v žiadnom potenciálnom konflikte záujmov.*

## Literatúra

- Zhang S, Xiao X, Yi Y, et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Jun 19;9(1):149.
- Baker TM, Waise S, Tarabichi M, et al. Aneuploidy and complex genomic rearrangements in cancer evolution. *Nat Cancer.* 2024 Feb;5(2):228-39.
- Duncavage EJ, Schroeder MC, O'Laughlin M, et al. Genome Sequencing as an Alternative to Cytogenetic Analysis in Myeloid Cancers. *N Engl J Med.* 2021 Mar 11;384(10):924-35.
- Ruel LJ, Li Z, Gaudreault N, et al. Tumor Mutational Burden by Whole-Genome Sequencing in Resected NSCLC of Never Smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2022 Dec 5;31(12):2219-27.
- BoB: Pioneering Basket Trials for Advanced Solid Tumors [Internet]. 2024 [cited 2025 Mar 11]. Available from: <https://www.cancercoreurope.eu/bob-pioneering-basket-trials-solid-tumors/>
- Samsom KG, Schipper LJ, Roepman P, et al. Feasibility of whole-genome sequencing-based tumor diagnostics in routine pathology practice. *J Pathol.* 2022 Oct;258(2):179-88.
- Samsom KG, Bosch LJW, Schipper LJ, et al. Study protocol: Whole genome sequencing Implementation in standard

- Diagnosics for Every cancer patient (WIDE). *BMC Med Genomics.* 2020 Nov 10;13(1):169.
- Shukla N, Levine MF, Gundem G, et al. Feasibility of whole genome and transcriptome profiling in pediatric and young adult cancers. *Nat Commun.* 2022 May 18;13(1):2485.
  - Rusch M, Nakitandwe J, Shurtleff S, et al. Clinical cancer genomic profiling by three-platform sequencing of whole genome, whole exome and transcriptome. *Nat Commun.* 2018 Sep 27;9(1):3962.
  - Berglund E, Barbany G, Orsmark-Pietras C, et al. A Study Protocol for Validation and Implementation of Whole-Genome and -Transcriptome Sequencing as a Comprehensive Precision Diagnostic Test in Acute Leukemias. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:842507.
  - Ryan SL, Peden JF, Kingsbury Z, et al. Whole genome sequencing provides comprehensive genetic testing in childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2023 Mar;37(3):518-28.
  - Frank MO, Koyama T, Rhrissorakrai K, et al. Sequencing and curation strategies for identifying candidate glioblastoma treatments. *BMC Med Genomics.* 2019 Apr 25;12(1):56.
  - Wadensten E, Wessman S, Abel F, et al. Diagnostic Yield From a Nationwide Implementation of Precision Medicine for all Children With Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2023 Jun;7:e2300039.
  - Chan SWS, Zeng J, Young J, et al. A Poor Prognostic ALK Phenotype: A Review of Molecular Markers of Poor Prognosis in ALK Rearranged Nonsmall Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2025 Jan;26(1):e22-e32.e2.
  - Thangavelu T, Wirta V, Orsmark-Pietras C, et al. Micro-costing of genetic diagnostics in acute leukemia in Sweden: from standard-of-care to whole-genome sequencing. *J Med Econ.* 2024;27(1):1053-60.
  - Meggendorfer M, Jobanputra V, Wrzeszczynski KO, et al. Analytical demands to use whole-genome sequencing in precision oncology. *Semin Cancer Biol.* 2022 Sep;34:16-22.
  - Berglund E, Barbany G, Orsmark-Pietras C, et al. A Study Protocol for Validation and Implementation of Whole-Genome and -Transcriptome Sequencing as a Comprehensive Precision Diagnostic Test in Acute Leukemias. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:842507.
  - Rehm HL, Page AJH, Smith L, et al. International policies and standards for data sharing across genomic research and healthcare. *Cell Genom.* 2021 Nov 10;1(2):100029.
  - Tandon S, Sharma M, Kasar P, et al. A cloud-based precision oncology framework for whole genome sequence analysis. *Comput Biol Chem.* 2024 Jun;110:108062.

## Mgr. Beáta Katrincšáková, PhD.

Laboratórium klinickej a molekulovej genetiky  
LF UK a NÚDCH  
Limbová 1, 833 40 Bratislava  
[beata.katrincsakova@nudch.eu](mailto:beata.katrincsakova@nudch.eu)

