

Перспективы применения метода секвенирования следующего поколения (NGS) в клинической практике скрининга новорожденных

А.М. Смирнов, М.А. Зайцева, А.Е. Павлов

Секвойя дженетикс (Sequoia genetics); Группа компаний Алкор био, Санкт-Петербург

Prospects for the use of next-generation sequencing methods in the clinical practice of neonatal screening

A.M. Smirnov, M.A. Zaitseva, A.E. Pavlov

Sequoia Genetics, Alkor bio Companies Group, Saint Petersburg

Особый интерес с точки зрения ДНК-диагностики представляют моногенные заболевания, особенно входящие в программу массового скрининга новорожденных. Для многих из них (муковисцидоз, фенилкетонурия, галактоземия, аденогенитальный синдром) известны мутации, ассоциированные с развитием болезни, что позволяет использовать ДНК-диагностику для подтверждения диагноза, в пренатальной диагностике, а также при планировании семьи. Развитие технологий молекулярно-генетического анализа привело к созданию перспективного метода секвенирования следующего поколения (next generation sequencing, NGS). Постоянное снижение себестоимости и увеличение производительности данного метода, а также повышение точности анализа дают основание для решения вопроса о возможности его применения в клинической практике. Разработка и внедрение клинических решений для проведения точной и исчерпывающей генодиагностики на базе технологий NGS представляет большой интерес именно в случае моногенных заболеваний, так как данные об обнаруженных генетических вариантах могут быть непосредственно интерпретированы врачом-генетиком при получении положительных или пограничных результатов неонатального скрининга.

Ключевые слова: дети, моногенные болезни, неонатальный скрининг, генетическая диагностика, метод секвенирования следующего поколения, NGS.

Monogenic diseases, particularly those included in a mass neonatal screening program, are of special interest in terms of DNA diagnosis. Mutations associated with diseases are known to be present in many of them (cystic fibrosis, phenylketonuria, galactosemia, adrenogenital syndrome), which allows DNA analysis to be used for verification of their diagnosis, in prenatal diagnosis, and for family planning. The evolution of molecular genetic technologies has given rise to the promising technique — next-generation sequencing (NGS). The continuously reduced cost, increased efficiency, and higher analytical accuracy of this method lead one to decide whether it may be used in clinical practice. To develop and introduce clinical tests for precise and exhaustive gene diagnosis based on NGS technologies are of great interest just in case of monogenic diseases as data on found genetic variants may be directly interpreted by a medical geneticist after obtaining the positive or borderline results of neonatal screening.

Key words: infants, monogenic diseases, neonatal screening, next-generation sequencing method.

Во многих странах проводится неонатальный скрининг на заболевания, диагностика которых особенно важна в первые месяцы жизни. Список тестируемых патологий значительно различается в разных странах и даже в разных регионах одной страны, но, как правило, в панели включены заболевания, ранняя терапия которых значительно улучшает качество жизни пациента [1]. В США программы неонатального скрининга формируются на уровне штатов и обычно включают несколько десятков болезней [2],

в странах Европы число тестируемых заболеваний варьирует от 1 до 29 [1]. В России проводится неонатальный скрининг на муковисцидоз, фенилкетонурию, галактоземию, аденогенитальный синдром и врожденный гипотиреоз. Для четырех из пяти заболеваний установлена выраженная генетическая составляющая, что позволяет проводить генетическое тестирование, выявляя, таким образом, больных и носителей заболеваний.

Схемы проведения скрининга также могут различаться и, как правило, состоят из нескольких этапов, где ДНК-тестирование обычно присутствует, но часто не является обязательным [1]. В частности, во многих европейских странах при скрининге на муковисцидоз ДНК-диагностика применяется на втором этапе тестирования, в то время как в России поиск мутаций обычно осуществляется в последнюю очередь и не регламентируется методическими указаниями.

Несмотря на различия в программах неонаталь-

© Коллектив авторов, 2013

Ros Vestn Perinatol Pediat 2013; 2:37–40

Адрес для корреспонденции: Смирнов Арсений Михайлович — рук. медико-генетического направления ООО «Секвойя дженетикс», группа компаний «Алкор Био»

Зайцева Мария Александровна — специалист по молекулярно-генетическому анализу

Павлов Александр Евгеньевич — рук. проекта

192148 Санкт-Петербург, пр-т. Железнодорожный, д. 40 лит А

ного скрининга в разных странах, очевидно, что ДНК-диагностика играет важную роль в подтверждении диагноза, и с развитием методов генетического анализа эта позиция будет только усиливаться.

В течение последних десятилетий основным методом прямого анализа нуклеотидной последовательности ДНК был автоматизированный метод секвенирования по Сэнгеру. Однако возможности этого метода ограничиваются максимальной длиной прочтения около 1000 нуклеотидов, следовательно, он не подходит для рутинного секвенирования протяженных регионов генома. Кроме того, данный метод достаточно трудоемкий и дорогостоящий при его введении как обязательного этапа тестирования. Развитие технологий анализа ДНК привело к разработке методов секвенирования следующего поколения, или next-generation sequencing (NGS), главное преимущество которых состоит в их высокой производительности. Стоимость секвенирования продолжает снижаться, и это дает основание предполагать, что в ближайшем будущем данная методика может стать рутинной процедурой в молекулярно-генетических центрах и будет широко использоваться для целей клинической диагностики и персонализированной медицины [3, 4]. Принципиальным отличием метода NGS от так называемого капиллярного секвенирования, или секвенирования по Сэнгеру, является массовое параллельное прочтение огромного количества относительно небольших фрагментов ДНК.

На данный момент на рынке представлено несколько различных NGS-платформ, однако в основе большинства технологий лежит общий алгоритм постановки анализа. Сначала анализируемую ДНК обрабатывают для создания «библиотек», представляющих собой фрагменты ДНК, предназначенные для секвенирования. Затем эти фрагменты подвергаются клональной амплификации для получения «матрицы» для секвенирования, после чего следует непосредственно прочтение нуклеотидной последовательности [5]. К настоящему моменту технология NGS позволила снизить стоимость секвенирования индивидуального генома человека до 5 тыс. долларов США. Однако по-прежнему довольно высокая стоимость, а также сложность обработки получаемых данных препятствуют широкомасштабному внедрению полногеномного секвенирования в клиническую диагностику в ближайшее время.

Существенно больший интерес в данный момент представляет метод таргетного NGS ресеквенирования, заключающийся в фокусировке аналитического потенциала технологии в пределах заданных «регионов интереса». Благодаря использованию референсного генома значительно облегчается процесс обработки данных NGS и снижаются требования к объему и качеству получаемых данных. Для целевого исследования генома в пределах интересующих регионов

на этапе приготовления «библиотек» применяется метод таргетного обогащения, позволяющий наработать только те фрагменты ДНК, которые необходимо проанализировать для данного пациента. Разработано большое количество методик таргетного обогащения, основанных на двух разных принципах: ПЦР (полимеразной цепной реакции) и гибридизационного захвата [6, 7]. При использовании ПЦР происходит специфичная амплификация целевых регионов в геноме, после чего из продуктов амплификации получают «библиотеки» для секвенирования. Во многих работах продемонстрировано успешное использование метода таргетного NGS ресеквенирования, основанного на ПЦР, для поиска мутаций, приводящих к развитию генетических заболеваний [8, 9].

Методика гибридизационного захвата основана на принципах специфической гибридизации фрагментов анализируемой ДНК с синтезированными зондами заданной последовательности на твердой или в жидкой фазе. Одним из применений данного метода является экзомное секвенирование — определение белоккодирующей последовательности генома [10, 11]. Экзомное секвенирование используется при диагностике генетических заболеваний неясной этиологии [12], а также при дифференциальной диагностике раковых опухолей [13].

Наибольший интерес в диагностике методом таргетного секвенирования представляют менделевские (моногенные) заболевания со значительным количеством редких клинических мутаций, встречающихся в популяции. Анализ подобных генов с помощью классических молекулярных методов затруднен, поскольку они позволяют анализировать фиксированное количество мутаций и обладают ограниченными возможностями мультиплексирования (см. таблицу).

Основные преимущества NGS по сравнению с другими методами молекулярно-генетического анализа:

1. Возможность идентификации новых вариантов. Традиционные методы генетического анализа (например, ПЦР, микрочипы) позволяют выявлять, хотя и большое, но все же ограниченное количество мутаций. Поэтому редкие варианты, обычно не входящие в панель исследуемых генетических маркеров в большинстве методов, останутся необнаруженными. Например, в гене муковисцидоза на данный момент известно чуть менее 2000 мутаций, из них более 100 являются патогенными [14]. В то же время существующие методы позволяют однозначно выявлять не более 30 мутаций.

2. Высокая производительность. В отличие от капиллярного секвенирования, при котором можно установить последовательность не более 1000 нуклеотидов, различные платформы NGS способны за один запуск определять от нескольких десятков тысяч до нескольких миллиардов нуклеотидов в зависимо-

Таблица. Сравнение распространенных методов анализа последовательности ДНК

Метод	Мультиплексность (анализ большого количества маркеров)	Производительность (анализ большого количества образцов)	Стоимость (при пересчете на количество анализируемых маркеров)	Возможность обнаружения неизвестных мутаций
ПЦР (различные модификации)	Низкая	Средняя	Низкая	Нет
Микрочипы	Высокая	Низкая	Высокая	Нет
Капиллярное секвенирование (по Сэнгеру)	Высокая	Низкая	Высокая	Есть
NGS	Очень высокая	Очень высокая	Низкая	Есть

сти от стоящих перед исследователем задач. Благодаря высокой производительности возможно тестирование сразу нескольких генетических заболеваний у нескольких десятков пациентов за одну реакцию секвенирования, что значительно снижает себестоимость анализа [15].

3. Чувствительность. NGS технология позволяют находить мутации, представленные лишь в небольшой популяции клеток анализируемого биоматериала, что важно при дифференциальной диагностике раковых опухолей [16].

Однако технология NGS имеет ряд недостатков. В первую очередь, это по-прежнему значительная стоимость оборудования и реагентов. Вследствие высокой производительности метода возникает проблема анализа данных, включающего оценку качества прочтения, поиска мутаций и полиморфных вариантов. Для решения этой проблемы необходимо создание программного обеспечения, позволяющего непосредственно врачу, не обладающему знаниями в области биоинформатики, анализировать полученные результаты. Большой объем получаемых данных требует наличия сложной компьютерной инфраструктуры [17]. Эта проблема, в первую очередь, касается данных полногеномного секвенирования и в меньшей степени — таргетного ресеквенирования.

Помимо чисто технических задач, остаются вопросы по процедуре проведения валидации метода NGS для клинического применения. В разных странах соответствующие процедуры могут немного различаться, однако к методикам, используемым в клинической лабораторной диагностике, повсеместно предъявляются значительно более строгие требования, чем к результатам научных исследований. Эти вопросы активно обсуждаются, и появляются первые рекомендации по валидации NGS.

Использование решений на основе технологий NGS как подтверждающего теста при неонатальном скрининге может значительно улучшить качество проводимых исследований, а также сократить время до постановки диагноза при использовании генетической диагностики уже на втором этапе скрининга

среди пациентов с положительным или пограничным результатом первого этапа.

В рамках проекта «Неонатальная NGS-генодиагностика», запущенного компанией Sequoia genetics ГК Алкор Био на основе технологии таргетного обогащения, была разработана панель для секвенирования кодирующих частей генов, отвечающих за развитие трех заболеваний, включенных в программу обязательного скрининга новорожденных в России: муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии. Эти моногенные заболевания могут быть вызваны сотнями различных мутаций, что делает секвенирование целесообразным для их идентификации. В общей сложности в трех генах, связанных с возникновением этих заболеваний, известно около трехсот мутаций, достоверно ассоциированных с развитием тяжелых клинических форм. Для повышения производительности и снижения себестоимости анализа была использована технология молекулярного баркодирования образцов, позволяющая осуществить тестирование несколько десятков пациентов за одну постановку анализа. Для облегчения процесса анализа разработано программное обеспечение для обработки и визуализации обнаруженных генетических вариантов. На данный момент технология проходит испытания на реальных образцах ДНК пациентов из российских коллекций и регистров. Завершением разработки будет являться верификация и валидация решения для применения в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря постоянно снижающейся стоимости, высокой производительности, а также широким возможностям мультиплексирования по образцам и тестируемым регионам технология NGS в ближайшем будущем должна прийти на смену целому спектру методов ДНК-диагностики. В свою очередь внедрение метода таргетного ресеквенирования для тестирования социально значимых моногенных наследственных заболеваний, включенных в программу обязательного неонатального скрининга, может

значительно улучшить качество диагностики этих заболеваний и стать отправной точкой в процессе

широкого внедрения технологии в клиническую лабораторную практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burgard P., Cornel M., Filippo F. Di et al. Report on the practices of newborn screening for rare disorders implemented in Member States of the European Union, Candidate, Potential Candidate and EFTA Countries. 2012; 238.
2. Therrell B., Lorey F., Eaton R. et al. Impact of Expanded Newborn Screening — United States, 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008; 57: 1012—1015.
3. Marian A.J. Medical DNA sequencing. Curr Opin Cardiol 2011; 26: 3: 175—180.
4. The Future of NGS Market Study. Cambridge Healthtech Institute, 2011; 57.
5. Metzker M.L. Sequencing technologies — the next generation. Nat Rev Genet 2010; 11: 31—46.
6. Gnirke A., Melnikov A., MacGuire J. et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted resequencing. Nat Biotech 2009; 27: 2: 182—189.
7. Mamanova L., Coffey A.J., Scott C.E. et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. Nat Methods 2010; 7: 111—1118.
8. Jones M.A., Bhide S., Chin E. et al. Targeted polymerase chain reaction-based enrichment and next generation sequencing for diagnostic testing of congenital disorders of glycosylation. Genet Med 2011; 13: 921—932.
9. Hollants S., Redeker E.J., Matthijs G. Microfluidic amplification as a tool for massive parallel sequencing of the familial hypercholesterolemia genes. Clin Chem 2012; 58: 717—724.
10. Clark M.J., Chen R., Lam H.Y. et al. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies. Nat Biotechnol 2011; 29: 908—914.
11. Casci T. DNA sequencing: exome sequencing technologies compared. Nat Rev Genet 2011; 12: 741.
12. Veltman J.A., Brunner H.G. De novo mutations in human genetic disease. Nat Rev Genet 2012; 13: 565—575.
13. Banerji S., Cibulskis K., Rangel-Escareno C. et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. Nature 2012; 486: 405—409.
14. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>
15. Kingsmore S.F., Lantos J.D., Dinwiddie D.L. et al. Next-generation community genetics for low- and middle-income countries. Genome Medicine 2012; 4: 25.
16. Desai A.N., Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? Clin Genet 2012; 81: 503—510.
17. Baker M. Next-generation sequencing: adjusting to data overload. Nature Methods 2010; 7: 495—499.

Поступила 21.02.13