

Секвенирование экзома

Технический обзор

Экзомное секвенирование — это целенаправленный метод секвенирования нового поколения (NGS), который ограничен областями генома, кодирующими белок. Экзом охватывает приблизительно 1% генома, но содержит около 85% вариантов нуклеотидной последовательности, вызывающих заболевания.

Биоинформатикам, пытающимся выявить среди множества находок гены, вовлеченные в более чем **6800 редких заболеваний**, секвенирование экзома позволяет быстро и экономически эффективно идентифицировать однонуклеотидные полиморфизмы и инделы (небольшие инсерции и делеции).

1%

генома охватывает
экзом

85%

вариантов
нуклеотидной
последовательности

6800

редких заболеваний

Можно выявить как унаследованные, так и мутации *de novo*, которые могут объяснить наследуемость менделевских и сложных расстройств. В некоторых случаях экзомный анализ позволяет выявить вариацию числа копий (CNV).

Показания

- При диагнозе с клинической неоднородностью

Примеры: эпилепсия, эпилептические энцефалопатии, мышечные дистрофии/мышечные расстройства, атаксия, невропатии, кардиомиопатии, дисплазии соединительной ткани, иммунодефициты, глухота, слепота при исключении основных синдром-ассоциированных вариантов

- С атипичными клиническими проявлениями или фенотипами. С клинической точки зрения трудно выделить конкретный ген или группу генов

Пример: Наследственные атаксии, атипичный паркинсонизм

- При генетически гетерогенных состояниях, когда число вовлеченных генов в заболевание велико

Примеры: умственная отсталость и тяжелый иммунодефицит, аутизм

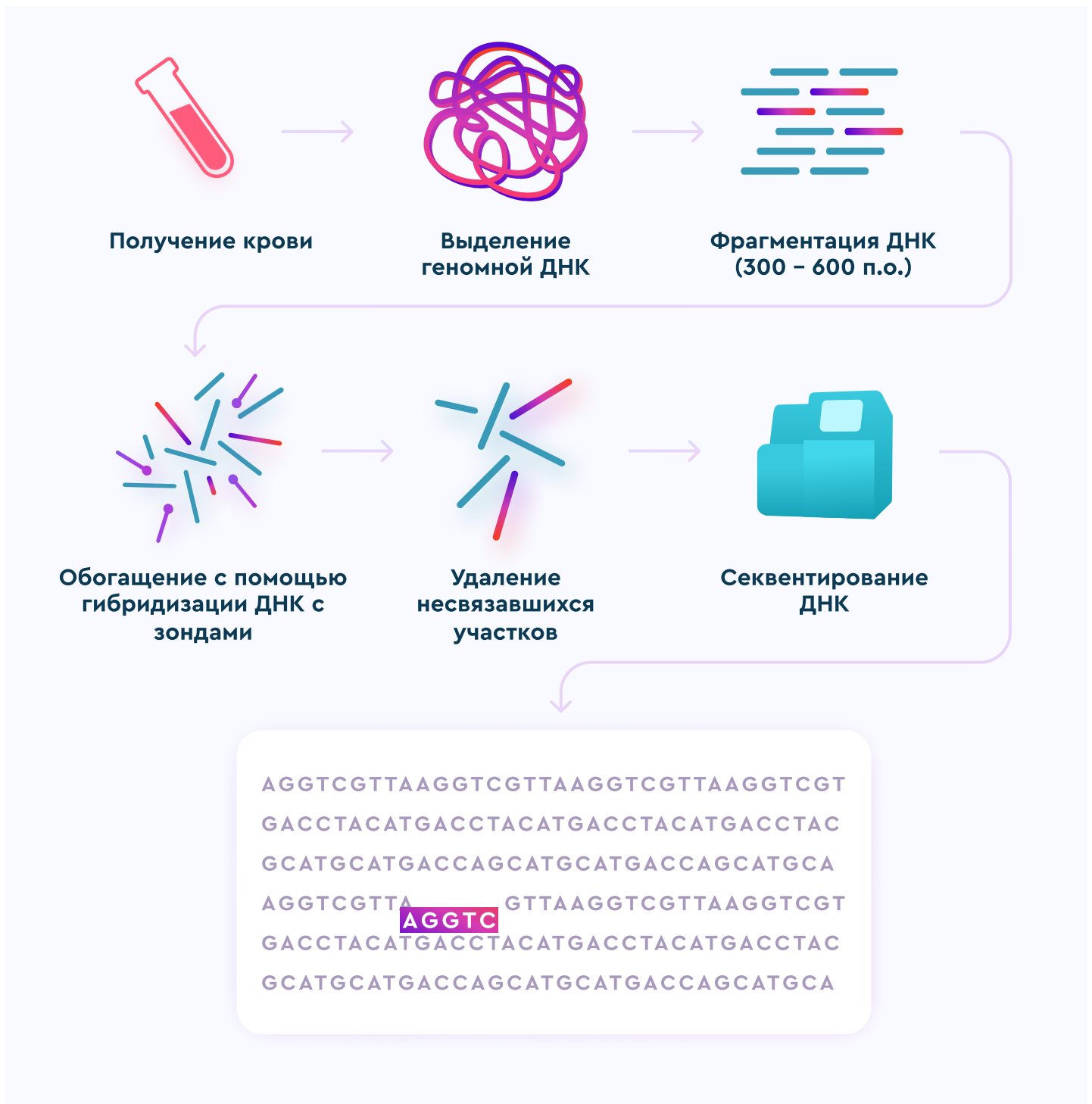
- При отягощенной наследственности, когда другие генетические исследования не позволили установить диагноз

Пример: пациент с задержкой нервно-психического развития и аналогично пораженные брат и сестра, хромосомный микроматричный анализ отрицателен.

О значимости клинической информации

В ходе интерпретации данных полноэкзомного секвенирования можно найти различные варианты — известные патогенные или доброкачественные, с неизвестной клинической значимостью или редкие варианты, не описанные ранее. Для того, чтобы определить клиническую значимость и сопоставить найденный вариант с генетическим заболеванием, необходимо владеть как можно большим объемом клинической информации о пробанде и его ближайших родственниках. Скрытие любой клинической информации, включая семейный анамнез пациента, может повлиять на результаты тестов и их интерпретацию. Отсутствие клинической информации может привести к исключению генетических вариантов, которые могут быть актуальны для пациента, а также к присвоению неверной клинической значимости выявленным вариантам.

Обогащение с помощью гибридизации ДНК с зондами



«Трио»

Включает анализ последовательности всего экзона пациента и родителей или других членов семьи.

Тройной подход в экзомном секвенировании улучшает диагностическую точность, облегчая анализ вариантов нуклеотидной последовательности и позволяя выявлять мутации de novo, которые лежат в основе многих заболеваний с ранней манифестацией и тяжелым течением

«Клинический экзом»

Секвенирование экзонов только тех генов, мутации в которых, приводят к развитию известных заболеваний

На сегодня в базе OMIM описано более 4700 таких генов. Несмотря на то, что данная разновидность анализа дешевле, список генов постоянно подвергается обновлению, следовательно, он менее информативен.

Панельное секвенирование

Основывается на анализе группы генов, объединенных в мультигенные панели. Данный вид диагностики сфокусирован на конкретном синдромальном показании.

Случайные результаты при таком подходе маловероятны. Панели выходят из употребления по мере открытия новых генов, связанных с заболеванием или выявления атипичных симптомов, пересекающихся с показаниями к использованию той или иной панели.

[Посмотреть сравнительную таблицу](#)

	Покрытие*	Объем исследования (количество генов)	Возможность сделать раз в жизни	Стоимость
Геном	Равномерное по всему геному	43 162	Есть**	от 99 000 Р
Экзом	Равномерное в кодирующих регионах	от 20 000	Есть**	от 42 000 Р
Клинический Экзом	Неравномерное	4 700	Нет***	от 40 000 Р
Панельное секвенирование	Равномерное Только в области экзонов исследуемых генов.	от 100 до 1000	Нет***	от 35 000 Р

* Покрытие кодирующих участков генома

** По мере добавления данных требуется только переанализ, но не повторное секвенирование.

*** Данные обновляются, добавляются новые гены.

Научное подтверждение Эффективность

Диагностическая эффективность экзомного секвенирования

Эпилепсия

Эпилепсия является общим знаменателем гетерогенной группы эпилептических расстройств с различными причинами, в том числе генетическими, и симптомами.

Сложности в определении эпилепсий без диагностических гипотез с неспецифическими симптомами возникают довольно часто. Диагностическая эффективность секвенирования экзома у больных с эпилепсией по разным данным составляет от 34 до 49% (Tumiené, B., et al., 2018), (Forman E.B., 2018), (Helbig KL., et al., 2016) -по сравнению с 8% при применении хромосомного микроматричного анализа (Кожанова Т.В., 2019). Секвенирование экзома в 1,9 раза более результативно, чем диагностический выход панели «Наследственные эпилепсии» (диагностическая эффективность 19,0%; P=0.0018) (Costain G., 2019). Установление генетического диагноза может повлиять на выбор лечения, как было продемонстрировано у пациентов с нарушениями в генах SCN1A, SCN8A, SLC2A1 (Snoeijen-Schouwenaars, F. M., et al., 2018).

На сегодняшний день генетическое исследование при эпилепсии рекомендуется начинать с секвенирования нескольких генов и/или целевых панелей и, наконец, выполнять экзомное секвенирование в оставшихся недиагностированных случаях.

Врожденные мышечные дистрофии (ВМД)

Врожденные мышечные дистрофии (ВМД) представляют собой гетерогенную группу расстройств, характеризующихся дебютом преимущественно в раннем детском или юношеском возрасте и наличием признаков дистрофии в первую очередь проксимальных мышц верхних и нижних конечностей. Частота генетической диагностики ВМД остается низкой и составляет примерно 24%. Семьи с с невыявленными патогенными вариантами ВМД сталкиваются с неопределенностью в отношении риска прогрессирования заболевания, а также передачи потомству и необходимостью непрерывного медицинского наблюдения. Диагностический коэффициент экзомной генетической диагностики пациентов с мышечной дистрофией, для которых прицельное секвенирование по Сэнгеру не позволило выявить генетическую причину нарушения, составил 40% для одиночных пробандов и от 34% до 60% для секвенирования «трио» (Ghaoui R., et al., 2015; Harris, E. et al., 2017).

Деменция

Деменция является наиболее частым нейродегенеративным расстройством, затрагивающим от 1% до 3% населения во всем мире. Большая генетическая гетерогенность является сложной задачей для диагностики, поскольку фенотип у многих пациентов либо не является синдромальным, либо молекулярно-генетическая причина все еще неизвестна.

Экзомное секвенирование является золотым стандартом диагностики нейродегенеративных расстройств. По литературным данным, у пациентов, которым не удалось установить диагноз после панельного исследования, диагностическая эффективность экзомного секвенирования составила 22%- 27% (E Chérot et al., 2018; Bojan Zalar, et al., 2018).

Актуальность пренатального тестирования

Приблизительно 2-4% беременностей осложняются значительными пороками развития плода. Стратегия пренатального тестирования и выбор тестов должны быть индивидуальны и соотнесены с результатами УЗИ и семейным анамнезом. Современные варианты включают: анализ кариотипа, флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) и хромосомный микроматричный анализ (ХМА) для анализа хромосомных аномалий.

Различные методы исследования кариотипа обеспечивают диагностическую эффективность около 35 % (Zhang S., 2017) (Hillman S.C., 2013). Таким образом, при использовании этих методик более половины плодов со структурными аномалиями остаются без диагноза.

В двух недавних крупномасштабных исследованиях сообщалось о результатах экзомного секвенирования «трио», выполненных на плодах с пороками развития и нормальным кариотипом (Petrovski S., et al., 2019, Lord J., et al., 2019). Оба исследования показывают, что экзомное секвенирование увеличивает диагностический выход при исследовании плода с врожденными пороками развития примерно на 8-19% после кариотипирования и результатов ХМА, а частота обнаружения патогенных вариантов сильно коррелирует с количеством аномалий развития плода.

Экзомное секвенирование является фенотип-зависимым тестом, поэтому врач должен предоставить лаборатории адекватную информацию, необходимую для получения наиболее точной интерпретации результатов. Клиническая информация должна включать подробные отчеты о визуализации плода, такие как магнитно-резонансная томография (МРТ) и/или ультразвуковое исследование плода, предварительные результаты комбинированного скрининга, этническая принадлежность, репродуктивный анамнез и семейный анамнез, включая кровное родство родителей.

Анализ «трио», предпочтительнее анализа синглтона (только для плода) или дуэта (плод и один родитель). Анализ трио имеет более высокие диагностические коэффициенты (на 20%) (Retterer K., 2016). Если аномалии развития плода в значительной степени наводят на мысль о конкретном диагнозе, в качестве теста первой линии более подходящим является тестирование одного гена или фенотипическая панель генов. Пренатальное экзомное секвенирование может проводиться только при наличии клинически значимых показаний к такому исследованию. А при отсутствии таких показаний, интерпретация полученных данных невозможна.

Экзомное секвенирование новорожденных

По данным ВОЗ, 4-6% новорожденных в мире ежегодно появляются на свет с тяжелыми врожденными пороками развития. Врожденные пороки развития, по оценкам, присутствуют в 13% всех случаев поступления в отделения интенсивной терапии новорожденных в развитых странах (Widmann R., et al., 2017) и остаются ведущей причиной неонатальной смертности. Анализ литературы, показывает, что экзомное секвенирование имеет высокий диагностический выход (36-48%) при диагностике младенцев с врожденными пороками развития в очень тяжелом состоянии при отсутствии молекулярно-цитогенетических нарушений (Trujillano, D., et al., 2017; Meng L., et al., 2017; Qi Zhi-Ye., et al., 2019). Атипичная и ранее не описанная форма генетических расстройств, наблюдаемая у детей раннего возраста, бросает вызов традиционной парадигме многоуровневого генетического тестирования в отделениях интенсивной терапии. Таргетные панели являются разумными в большинстве случаев, но неудача или длительность при выявлении каузативных вариантов у тяжелобольных детей является существенной проблемой, которая может быть преодолена с помощью секвенирования экзома.

Наличие минимального количества клинической информации, то есть только одного единичного симптома, снижает специфичность результатов. Поскольку сложно выявить полную клиническую картину в первые дни жизни ребенка, рекомендуется делать «трио» анализ и только в тех случаях, когда стандартные методы диагностики, такие как: анализ кариотипа, генные панели и ХМА бессильны.

Экзомное секвенирование может обнаружить некоторые генетические изменения, которые не связаны с текущими признаками и симптомами пациента (вторичные находки). Тем не менее, эти выводы могут иметь важные последствия для здоровья пациентов и членов их семей.

Эти расстройства включают:

- некоторые раковые синдромы,
- расстройства соединительной ткани,
- определенные типы сердечно-сосудистых заболеваний,
- высокий уровень холестерина и подверженность осложнениям от анестезии.

С другой стороны, некоторые виды генетических нарушений не имеют эффективного лечения и могут привести к смерти или пожизненной инвалидности. Вторичные находки могут быть включены в отчет пациента.

Мы не будем сообщать об этих результатах, если вы сообщите нам что вы не хотите быть проинформированы.

Экзомное секвенирование для несовершеннолетних

Когда экзомное секвенирование проводится для несовершеннолетних, информация о рисках неизлечимых будущих заболеваний должна быть отложена до тех пор, пока физические лица не достигнут законного возраста для получения согласия и не смогут принимать свои собственные решения на основе этой информации.

Случайно найденные варианты в генах

При интерпретации случайно найденных вариантов в генах, связанных с заболеваниями с неполной пенетрантностью и поздней манифестацией, сложно оценить риск для пациента. Так же, важно учитывать огромное количество вариантов, выявленных при секвенировании экзома пациентов, определяя их приоритетность для последующего наблюдения.

Особенности анализа «трио»

При экзомном секвенировании «трио» могут быть выявлены: неродство родителя и ребенка, а также факт близкородственного брака. Пациент должен быть так же об этом проинформирован.

NGS, или next generation sequencing

Секвенирование нового поколения. Термин означает определение нуклеотидной последовательности (исследование первичной структуры) ДНК или РНК. Размер одного прочитанного фрагмента варьирует от 25 до 500 пар оснований..

Вариация числа копий (CNV)

Вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов размером от 1 тыс. до нескольких млн. пар оснований.

Делеции

Потеря участка последовательности ДНК азотистых оснований и выпадение соответствующих нуклеотидов.

ДНК-библиотека (геномная библиотека)

Набор ДНК-фрагментов, подвергающихся секвенированию. Эти ДНК-фрагменты фланкированы идентичными ДНК-адаптерами– специальными последовательностями, необходимыми для одновременного секвенирования множества различных фрагментов ДНК.

Инсерция

Изменение в последовательности ДНК, когда происходит вставка последовательности ДНК. Минимальный размер такой вставки составляет один нуклеотид

Мутации de novo

Впервые возникшее изменение в последовательности ДНК, возникшее в половых клетках (гонадах) или при оплодотворении, в отличие от унаследованного.

Однонуклеотидный полиморфизм

Отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме , который встречается в популяции с частотой более 1% (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между участками гомологичных хромосом.

Секвенирование генома

Определение всей последовательности ДНК, включая некодирующие участки. По этому параметру отличается от сиквенса экзома.

Цитируемая литература:

- [1] Bojan Zalar, Aleš Maver, Ana Kovanda, Ana Peterlin & Borut Peterlin: CLINICAL EXOME SEQUENCING IN DEMENTIAS: A PRELIMINARY STUDY *Psychiatria Danubina*, 2018; Vol. 30, No. 2, pp 216-219.
- [2] Widmann R, Caduff R, Giudici L, et al. Value of postmortem studies in deceased neonatal and pediatric intensive care unit patients. *Virchows Arch*. 2017;470(2):217-223.
- [3] Costain G, Cordeiro D, Matviychuk D, Mercimek-Andrews S., Clinical Application of Targeted Next-Generation Sequencing Panels and Whole Exome Sequencing in Childhood Epilepsy. *Neuroscience*. 2019 Oct 15;418:291-310
- [4] E Chérot, B Keren, C Dubourg, W Carré, M Fradin, et al.. Using medical exome sequencing to identify the causes of neurodevelopmental disorders: Experience of 2 clinical units and 216 patients. *Clinical Genetics*, Wiley, 2018, 93 (3), pp.567-576.
- [5] Forman EB, Gorman KM, Conroy J, et al Cost of exome sequencing in epileptic encephalopathy: is it 'worth it'? *Archives of Disease in Childhood* 2018
- [6] Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, et al. Использование секвенирования цельной Экзома для диагностики мышечной дистрофии пояса конечностей : результаты и извлеченные уроки . *JAMA Neurol*. 2015;72(12):1424-1432.
- [7] Harris, E., Topf, A., Barresi, R. et al. Exome sequences versus sequential gene testing in the UK highly specialised Service for Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Orphanet J Rare Dis* 12, 151 (2017).
- [8] Helbig KL, Farwell Hagman KD, Shinde DN, et al. Diagnostic exome sequencing provides a molecular diagnosis for a significant proportion of patients with epilepsy. *Genet Med* 2016;18:898-905.
- [9] Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;41:610-620.
- [10] Lord J, McMullan DJ, Eberhardt RY, et al. Prenatal exome sequencing analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet*. 2019;393:747-757.
- [11] Meng L, Pammi M, Saronwala A, et al. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr*. 2017
- [12] Petrovski S, Aggarwal V, Giordano JL, et al. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet*. 2019;393:758-767.
- [13] Retterer K, Juusola J, Cho MT, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med*. 2016;18:696-704.
- [14] Snoeijs-Schouwenaars, F. M., van Ool, J. S., Verhoeven, J. S., van Mierlo, P., Braakman, H. M. H., Smeets, E. E., ... Willemsen, M. H. (2018). Diagnostic exome sequencing in 100 consecutive patients with both epilepsy and intellectual disability. *Epilepsia*.
- [15] Trujillano, D., Bertoli-Avella, A., Kumar Kandaswamy, K. et al. Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur J Hum Genet* 25, 176-182 (2017)
- [16] Tumiené, B., Maver, A., Writzl, K., Hodžić, A., Čturiilo, G., Kuzmanić-Šamija, R., (2018). Diagnostic exome sequencing of syndromic epilepsy patients in clinical practice. *Clinical Genetics*, 93(5), 1057-1062.
- [17] Qi Zhi-Ye, DUAN Jiang, HE Xiang-Ying et al. Clinical application of whole exome sequencing in monogenic hereditary disorders in critically ill newborns[J]. *CJCP*, 2019, 21(7): 640-643.
- [18] Zhang S, Lei C, Wu J, et al. A retrospective study of cytogenetic results from amniotic fluid in 5328 fetuses with abnormal obstetric sonographic findings. *J Ultrasound Med*. 2017;36:1809-1817.