

# Co nám řeknou geny?

V současné době jsme svědky prudkého rozvoje personalizace zdravotní péče. Narůstající množství dat o pacientovi a jeho onemocnění klade významné nároky na správnou analýzu těchto dat a implementaci výsledků této analýzy do rozhodování v klinické praxi. Za účelem zlepšení porozumění možnostem personalizované medicíny (tj. léčebného postupu na základě detailní znalosti pacienta a jeho onemocnění) a jejího optimálního využití byl proto iniciován projekt Discover Personalized Healthcare. První část nazvaná Co nám řeknou geny? ze seriálu věnujícího se diagnostice a prediktivnímu testování proběhla virtuálně dne 25. února 2021. V rámci webináře vystoupili prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D. (Ústav patologie LF MU a FN, Brno), prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D. (Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN, Hradec Králové), RNDr. Ivana Stružinská, Ph.D. (Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha) a MUDr. Pavel Fabian, Ph.D. (MOÚ, Brno). Jednotlivé přednášky přiblížily posluchačům názornou a edukativní formou problematiku genomových alterací a možnosti jejich detekce, které nabízí molekulární patologie. Autoři zvolili netradiční formát, kdy prezentace vytvořené odborníky byly audiovizuálně zpracovány a namluveny profesionálním mluvčím.

## Co to jsou genomové varianty a jak vznikají?

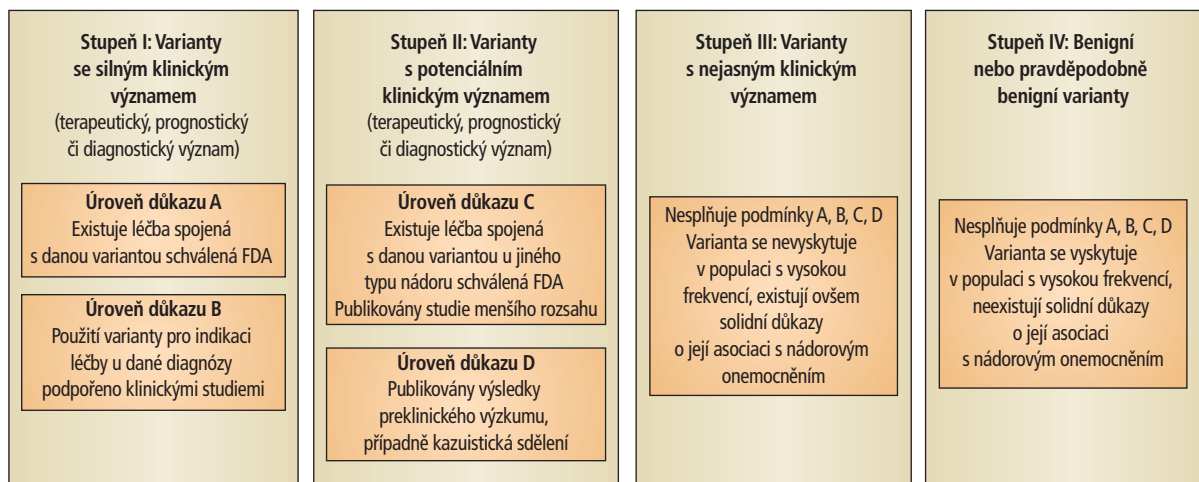
První prezentace, jejímž autorem byl prof. Slabý, se zabývala genomovými variantami a jejich klasifikací. Haploidní lidský genom obsahuje 3,2 miliardy párů bází, lidský exom (soubor exonů, tj. částí genů kódujících proteiny) pak čítá 30–40 milionů párů bází (tj. méně než 2 % lidského genomu). Vyskytuje-li se varianta v kódující části DNA, může se projevit také v sekvenci aminokyselin příslušného proteinu a ovlivnit jeho funkci.

Genomové varianty lze dělit z různých hledisek do různých kategorií. Jedním ze základních dělení je klasifikace na zárodečné (germline) a somatické varianty. **Zárodečné** varianty jsou vrozené, vyskytují se ve všech buňkách a jsou dědičné (mohou způsobovat hereditární nádorové syndromy), naproti tomu **somatické** varianty jsou získané, vyskytují se pouze v nádorových buňkách (reflektují biologii nádoru, a jsou proto potenciálně terapeuticky využitelné) a nejsou dědičné. Zárodečné varianty se vždy vyskytují i v DNA nádorové. Diagnostickým záměrem při vyšetřování zárodečných variant je stanovení rizika nádorového onemocnění. Zárodečné varianty se klasifikují dle IARC (International Agency for Research on Cancer) z hlediska patogenity do 5 tříd na patogenní (třída 5), pravděpodobně patogenní (třída 4), varianty nejasného významu (třída 3), pravděpodobně benigní (třída 2) a benigní (třída 1).<sup>1</sup> Patogenní

varianty jsou obvykle inaktivační (postihují tumor-supresorové geny) a jsou vysoce penetrantní. Somatické varianty vznikají v buňkách v průběhu celého života, a pokud se jich nahromadí dostatečné množství, mohou vést k maligní transformaci a vzniku nádoru. Vyšetřují se se zcela jiným diagnostickým záměrem než varianty zárodečné, a to především za účelem nalezení individualizované léčebné strategie – tedy pro účely precizní onkologie. **Somatické** varianty lze dělit podle jejich významu v karcinogenezi na **řídící** (driver) a **doprovodné** (passenger). Řídící varianty jsou kauzálně zapojeny do patogeneze nádoru, naproti tomu doprovodné varianty nejsou kauzálně zapojeny do patogeneze nádoru a vznikají náhodně v důsledku genomové nestability nádorové buňky. V nádorovém genomu bývá až 10 000 doprovodných variant a 5–10 řídících variant, z nichž pouze 1–2 jsou klinicky relevantní („actionable“).<sup>2</sup> Je třeba mít na paměti, že nádorový genom je extrémně dynamický a velmi nestabilní, výsledek vyšetření nádorového genomu tedy vypovídá pouze o nádoru v daném čase. Pro účely genomových analýz je vždy žádoucí provádět opakované biopsie (možnost vzniku dalších variant způsobujících diverzitu nádorových buněk).

Genomové varianty lze dále třídit **dle charakteru změny DNA** na jednonukleotidové záměny, inserce a delece, variabilitu v počtu kopií a genomové přestavby. Nejčastějšími variantami jsou **jednonukleotidové záměny**, při nichž dochází k výměně jedné báze v sekvenci DNA za jinou (klinicky významnými příklady jsou mutace EGFR T790M vedoucí k rezistenci vůči inhibitorům EGFR u nemalobuněčného karcinomu plic [NSCLC] či mutace BRAF V600E navozující citlivost vůči inhibitorům BRAF u maligního melanomu). Může se přitom jednat o synonymní (tichou, silent) variantu (sekvence aminokyselin se nemění), variantu měnící smysl (missense – mění se sekvence aminokyselin, což může ovlivnit funkci kódovaného proteinu) či nesmyslnou (nonsense) variantu, která vede ke vzniku stop kodonu a předčasnému ukončení syntézy proteinu (vzniká defektní protein, který je obvykle ihned degradován). **Krátké inserce a delece** zahrnují změny o rozsahu 1–40 bází (klinicky významným příkladem je delece EGFR v exonu 19, která je prediktivním biomarkerem léčebné odpovědi na inhibitory EGFR u NSCLC). **Variabilita v počtu kopií genů** (CNV – copy number variation) je varianta založená na amplifikaci nebo deleci jednotlivého genu nebo chromozomální oblasti (typickým příkladem je amplifikace HER2 spojená s citlivostí na léčbu trastuzumabem u karcinomu prsu). Při **genomových přestavbách** dochází ke zlomům chromozomů, které vedou ke kolokalizaci dvou genů (nebo jejich částí), jež normálně neleží vedle sebe, a vzniku fúzních genů. To má následně dopad na expresi či funkci těchto genů (klinik-

obrázek 1 Klasifikace genomových variant dle stupně klinického významu podle americké Asociace pro molekulární patologii (Podle 3)



ky významnými příklady jsou fúze EML4-ALK navozující citlivost k inhibitoru ALK u NSCLC či fúze NTRK1–3, která predikuje citlivost vůči inhibitorům NTRK neohledě na typ nádoru).

Somatické genomové varianty lze rovněž klasifikovat dle **stupně klinického významu**. Nejrozšířenější je systém zavedený americkou Asociací pro molekulární patologii (AMP), který zavádí čtyři stupně: stupeň 1 představují varianty se silným klinickým významem (úroveň důkazu A a B), stupeň 2 varianty s potenciálním klinickým významem, stupeň 3 varianty s nejasným klinickým významem a stupeň 4 varianty benigní či pravděpodobně benigní (obrázek 1).<sup>3</sup> Takto je například přítomnost varianty BRAF V600E u maligního melanomu (kde je v souvislosti s touto variantou schválené použití inhibitoru BRAF) řazena do kategorie IA (stupeň 1, úroveň důkazu A), zatímco u low-grade gliomu do kategorie IIC. Jak je patrné, stejná varianta u různých diagnóz může mít různý stupeň klinické významnosti. Právě klasifikace genomových variant dle stupně klinického významu je podkladem pro tvorbu individuálních terapeutických plánů a je jedním ze základů konceptu precizní onkologie. Díky přítomnosti genomových variant je každý nádor unikátní – zmapování a pochopení této unikátnosti je základním předpokladem moderní protinádorové léčby.

## Jak můžeme detekovat prediktivní markery?

Prezentace prof. Ryšky se věnovala způsobům testování prediktivních markerů. Současná diagnostika nádorových onemocnění často již nevystačí s pouhým morfologickým vyšetřením, stále častěji tak jsou využívány další metody, především imunohistochemické a molekulárně genetické. Ty slouží rovněž k detekci prediktivních markerů, které napomáhají k výběru pacientů, u nichž je vhodná specifická cílená léčba.

Prediktivní markery lze detekovat na třech různých úrovních: na úrovni DNA (bodové mutace, amplifikace

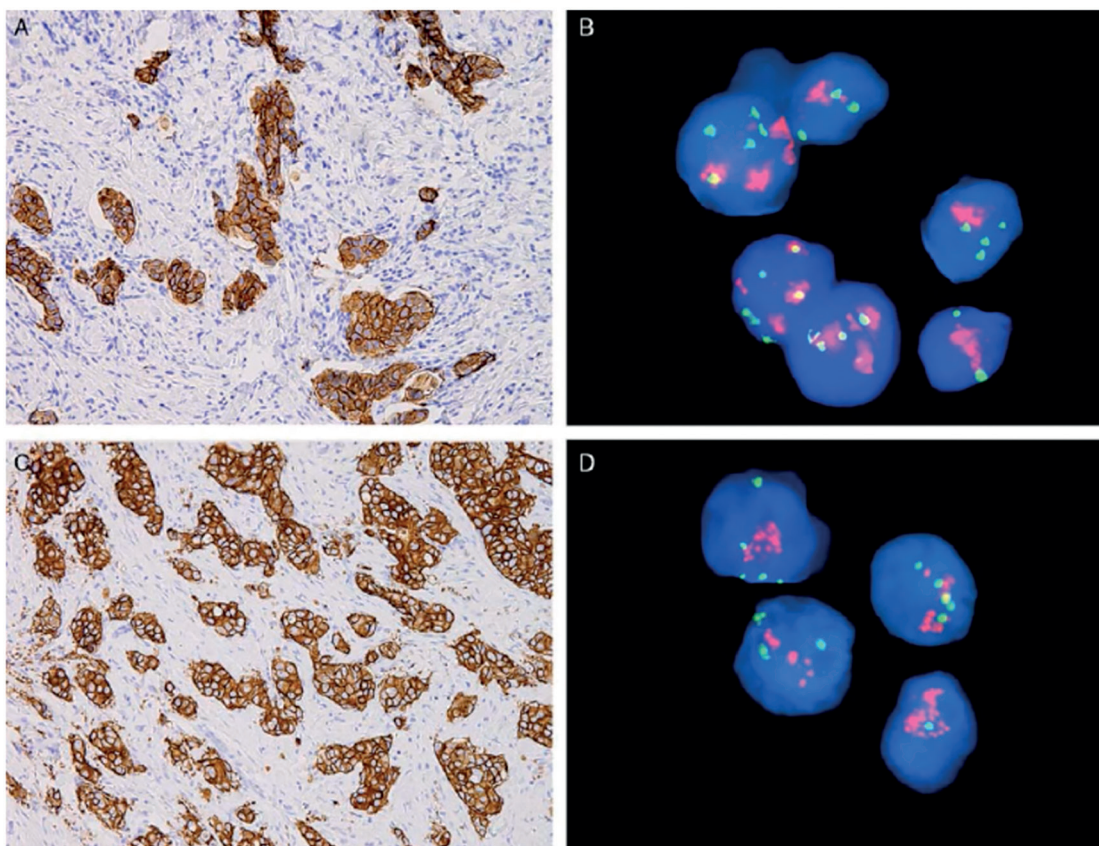
genů či genové přestavby), na úrovni RNA (přestavby vedoucí ke vzniku fúzních genů) a na úrovni proteinů (zvýšená či abnormální exprese různých bílkovin). Co se týká vyšetřovacích metod, **na úrovni DNA** se používá fluorescenční či chromogenní *in situ* hybridizace (FISH/CISH), metody polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenování. Při FISH/CISH jsou jednotlivé geny detekovány přímo v mikroskopickém preparátu; tato metoda je vhodná k průkazu amplifikací genů či chromozomálních přestaveb. Extrahovaná DNA může být vyšetřena pomocí PCR (vhodná pro detekci známých mutací) či sekvenování, ať již klasického (Sangerova), či sekvenování nové generace (NGS) – tyto metody jsou vhodné pro detekci nejrůznějších mutací, známých i neznámých. **Na úrovni RNA** lze provádět RT-PCR, kdy se po zpětném přepisu RNA na DNA (tzv. cDNA) použije opět PCR či sekvenování. Tato metoda je ideální pro detekci fúzních genů. **Na úrovni proteinů** pak je etablovanou metodou imunohistochemie (IHC), která je schopna identifikovat expresi různých bílkovin přímo ve tkáni či v buňkách. Zatímco u metod, u nichž se extrahuje DNA či RNA, lze využít vzorky histologické i cytologické, u ISH a IHC jsou výrazně preferovány (resp. výhradně použitelné) histologické vzorky. Spolehlivost výsledků jakéhokoliv prediktivního vyšetření se přitom vždy odvíjí od kvality vzorku. Limitace vzorku jsou jednak ovlivnitelné, dané zacházením s tkání (termické poškození, autolýza), a jednak inherentní, dané jeho velikostí a absolutní/relativní buněčností.

Každá z výše uvedených vyšetřovacích metod má své výhody i nevýhody. Co se týká **imunohistochemie**, její velkou výhodou je, kromě nízkých nákladů, přímá vizuální kontrola (hodnotí se exprese proteinů pouze tam, kde je skutečně očekávána, což je důležité zejména u markerů s heterogenní expesí). Nevýhody IHC spočívají ve výrazném vlivu preanalytické fáze (v důsledku poškození vzorku před samotným testováním lze dojít k falešně negativnímu, vzácněji falešně pozitivnímu výsledku) a vlivu subjektivního faktoru. Přesto je IHC velmi spolehlivou a zaužívanou me-

todou – tradiční je její využití při průkazu exprese HER2 u karcinomu prsu. Využití metod *in situ* hybridizace je nejvhodnější zejména v případech, kde dochází ke zlomům chromozomů na různých místech a kde se na vzniku fúzních genů podílejí různé partnerské geny (například při detekci přestavby EML4-ALK). Je třeba si uvědomit, že exprese proteinů přímo souvisí s genetickými změnami, tj. například amplifikace genu s přítomností jeho nadpočetných kopií vede k nadměrné expresi kódovaného proteinu – nádory se silnou expresí HER2 tedy vykazují i výraznou amplifikaci genu HER2 (obrázek 2). K identifikaci pacientů, u nichž je vhodná anti-HER2 léčba, lze proto využít metodu ISH i IHC, z pragmatických důvodů se však jako první používá imunohistochemie (u nádorů silně IHC pozitivních, 3+, je tato informace pro další postup dostačující a ISH se dále neprovádí). Metoda FISH se tak s výhodou používá také v případech, kdy je třeba objektivizovat či blíže upřesnit výsledek IHC (např. je-li výsledek IHC 2+). U některých markerů (již zmíněný HER2 u karcinomu prsu nebo ALK u NSCLC) se provádí pouze IHC, neboť konkordance mezi IHC a ISH je velmi vysoká, a ověřují se proto jen případy, kdy jsou výsledky IHC slabé, sporné či nejisté. Naproti tomu při detekci ROS1 u NSCLC je konkordance mezi oběma metodami výrazně nižší, jako první se tak provádí imunohistochemie a pozitivní výsledek IHC je následně potvrzován pomocí FISH.

Další metodou je vyšetřování genomických alterací v extrahované DNA (či RNA). Možností je **sekvenční testování** (hledání mutací v jednom genu po druhém), které může být rychlé a levné – pokud je výsledek pozitivní, testování se zastaví, neboť lze nasadit příslušnou léčbu. Pokud je však výsledek negativní, pokračuje testování dalších genů. Délka testování se tím může neúměrně prodlužovat, náklady vzrůstají a u velikostně limitovaných vzorků (např. karcinom plic) hrozí rovněž nedostatek tkáně. Proto se v současné době více uplatňuje **sekvenování nové generace** prostřednictvím panelů, ve kterých se testuje mnoho relevantních genů v jednom běhu. Trvání tohoto vyšetření i jeho cena jsou stejné bez ohledu na počet markerů a vyšetření umožňuje nalézt i vzácné mutace (na které by se při sekvenčním testování pravděpodobně vůbec nedostalo); u některých markerů navíc nemá alternativu (BRCA1/2). Jako relativní nevýhodu NGS lze vnímat vyšší cenu, jde však opravdu o nevýhodu relativní, neboť při „rozpočítání“ na jeden marker vychází toto vyšetření levněji než sekvenční testování. Sekvenování nové generace rovněž klade vysoké nároky na interpretaci získaných dat a nelze jej použít u všech markerů – není vhodné například pro testování PD-L1 (exprese proteinu PD-L1, který lze detekovat jedině imunohistochemicky, není podmíněna mutací genu, nýbrž se jedná o reaktivní expresi nádorovými či imunitními buňkami). Nicméně, NGS je budoucností genetického testování.

obrázek 2 Výsledek imunohistochemie (A, C) a FISH (B, D) – je patrná silná membránová exprese HER2 (hodnoceno jako 3+) a výrazná amplifikace genu HER2 (Podle 4)



Specifickou metodou je vyšetření **tekuté biopsie**, tedy cirkulujících fragmentů DNA uvolněných z nádorových buněk do krve (ctDNA). Toto vyšetření má stále limitované využití a v současné době se využívá téměř výhradně k průkazu mutací EGFR u NSCLC. Výhodou tohoto přístupu je absence nutnosti intervence (biopsie, cytologie), vysoká specifita a hromadný „sampling“ (vyšetření uvolněné ctDNA z více nádorových ložisek najednou). Přestože množství ctDNA koreluje s množstvím nádorové masy, není ctDNA uvolňována u všech pacientů, a i při pokročilém stadiu onemocnění může být v krvi jen málo ctDNA. Vyšetření tekuté biopsie také není schopno rozlišit nádorovou a nenádorovou DNA, má omezenou senzitivitu (riziko falešně negativních výsledků) a hůře se při něm detekují změny na úrovni RNA.<sup>5</sup> Tekutá biopsie proto v žádném případě nenahrazuje vyšetření prediktivních markerů z nádorové tkáně, v určitých situacích však může být vhodným doplňkem.

Pro správné vyhodnocení získaných dat (včetně dat získaných pomocí NGS) je naprosto zásadní multidisciplinární spolupráce v rámci tzv. molecular tumour boards.

## Sekvenování nové generace v klinické praxi

Prezentace dr. Stružinské přiblížila účastníkům webináře metodu NGS. Metoda sekvenování byla zavedena již v roce 1977. Od té doby prošla technologie sekvenování dramatickým vývojem, v rámci kterého se výrazně prodlužovaly úseky DNA, jež bylo možné najednou vyšetřit (od jednotek a desítek až po miliardu bází), zvyšovala se rychlost i spolehlivost tohoto vyšetření a zároveň se snižovala jeho cena. Rozvoj metod molekulární biologie byl provázen rovněž rozvojem personalizované medicíny včetně cílené terapie.

Sekvenování nové generace (next generation sequencing/second generation sequencing), nebo také masivně paralelní sekvenování (high throughput sequencing), je hromadné označení metod, které umožňují analýzu více DNA/RNA cílů najednou, za využití různých strategií amplifikace templátu a různých sekvenačních přístupů (nejrozšířenější je multigenové sekvenování a sekvenování syntézou pomocí fluorescenčně značených nukleotidů). Ve světě se NGS rutinně používá od roku 2007 (sekvenování DNA), resp. 2009 (sekvenování RNA), v laboratořích molekulární patologie v ČR se tato vyšetření rutinně provádí od roku 2015, resp. 2019. Zjednodušeně lze NGS rozdělit na sekvenování DNA a RNA. **Sekvenování DNA** je možné dále dělit na sekvenování celogenomové, exomové (sekvenovány jsou pouze kódující oblasti genů) a panelové (sekvenovány jsou kódující oblasti vybraných genů). S ohledem na **sekvenování RNA** se rozlišuje sekvenování transkriptomů (tj. veškeré mRNA) a panelové sekvenování (vybrané mRNA včetně fúzních transkriptů), mimoto existují i další, zatím spíše experimentální metody (např. sekvenování miRNA).

Jak probíhá NGS v prediktivní diagnostice? V běžné praxi se vyšetřují panely, které obsahují stovky vybraných genů pro různé diagnózy – **panelové sekvenování** je tč.

jediným použitelným nástrojem pro rutinní prediktivní a diagnostické testování z hlediska ceny, rychlosti i komplexity informace. Analýza jednoho vzorku (sekvenování DNA či RNA) trvá nejméně 5–7 dní, přičemž celý proces lze rozdělit do pěti kroků. V prvním kroku se shromáždí vzorky a izoluje se DNA/RNA, ve druhém kroku se připraví DNA/RNA sekvenační knihovny. K „nabohacení“ cílových oblastí paralelního sekvenování při přípravě sekvenačních knihoven se přitom využívají dva hlavní přístupy – vychytávání cílové sekvence pomocí hybridizačních sond (tzv. **capture NGS**) a amplifikace cílových sekvencí pomocí multiplexní PCR (**amplikonové NGS**). Použití tzv. capture NGS je výhodnější u větších panelů a FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) vzorků, vyžaduje však delší laboratorní přípravu. Naproti tomu amplikonové NGS lze použít jen u menších panelů, je však levnější a vyžaduje kratší laboratorní přípravu. Při použití amplikonového NGS u FFPE vzorku je riziko falešně pozitivních nálezů. Příprava různých DNA/RNA knihoven probíhá zvlášť a na jeden sekvenační běh lze poolovat různé typy připravených DNA/RNA knihoven až do naplnění sekvenační kapacity. Třetí krok zahrnuje samotné sekvenování syntézou pomocí fluorescenčně značených nukleotidů v NGS sekvenátoru, ve čtvrtém kroku následuje biostatistická analýza dat. V posledním, pátém kroku se provádí hodnocení filtrovaných variant, jejich interpretace a verifikace patogenity. Podkladem hodnocení variant je report, který je výsledkem biostatistické analýzy. Každý řádek reportu odpovídá jedné detekované variantě a obsahuje informaci o mutaci a její frekvenci, kvalitě čtení, zda je mutace známou patogenní variantou aj. Filtrováním dle určitých charakteristik pak lze označit patogenní varianty, varianty nejasného významu a benigní varianty; zbytek detekovaných variant je odfiltrován jako nevýznamný. Průměrně jsou v kvalitním vzorku na jednu megabázovou knihovnu detekovány desítky až stovky variant, počet ovšem závisí i na typu nádoru. Pomocí NGS lze detekovat mutace, které se ve vzorku nachází s frekvencí alespoň 5 %, záleží však i na pokrytí (tj. počtu čtení dané oblasti).

Kvalita sekvenačních dat úzce souvisí s kvalitou vzorku. Zásadní je preanalytická fáze a získání kvalitně fixovaného vzorku, který bude vhodný pro molekulární analýzu či jiné přezkoumání i za několik let. Důležitý je reprezentativní odběr (dostatečné množství vzorku), dodržení podmínek fixace (typ fixativa a doba fixování) a poskytnutí kompletní doprovodné dokumentace včetně klinických údajů. Materiál pro testování pomocí NGS může pocházet z různých zdrojů (chirurgický resekát, biopsie, cytologický preparát aj.), obvykle se však jedná o fixované vzorky. **Požadavky na množství a kvalitu tkáně** pro vyšetření somatického genomu pomocí NGS jsou závislé na typu testu a mění se s vývojem technologií. Nicméně obecně je pro tento typ analýzy požadováno alespoň 5 000 buněk s > 20 % nádorové populace; pro stanovení nádorové mutační nálože (TMB) je pak zapotřebí > 40 % nádorových buněk ve vzorku (čím více, tím lépe). V tomto je stěžejní úloha patologa, který je schopen odlišit nádorové buňky od nenádorového pozadí (nenádorovou frakci DNA mohou při přehlédnutí

necvičeným okem nechtěně navyšovat především infiltrující lymfocyty). Ideální vstup do NGS knihovny je pak 100 ng DNA nebo 40 ng RNA.

Výhodou NGS oproti sekvenčnímu testování je, že poskytuje velké množství informací za relativně krátký čas a při limitované spotřebě biologického materiálu. Tato metoda je dostatečně citlivá pro detekci somatických variant, pomocí NGS však nelze odlišit germinální a somatické mutace. Má i své další limity – některé vzorky nejsou pro testování vhodné (nízký podíl nádorových buněk, nekvalitní DNA/RNA) a existují varianty, které pomocí panelového NGS nelze detekovat (balancované translokace, varianty hluboko v intronových a regulačních sekvencích či rozsáhlé genové přestavby > 40 bp; limitováno je také hodnocení CNV). Časová náročnost metody je dána především strojovým sekvenačním časem, časem pro výpočetní analýzu a interpretaci detekovaných variant.

## Jak číst data získaná při analýze genomových alterací

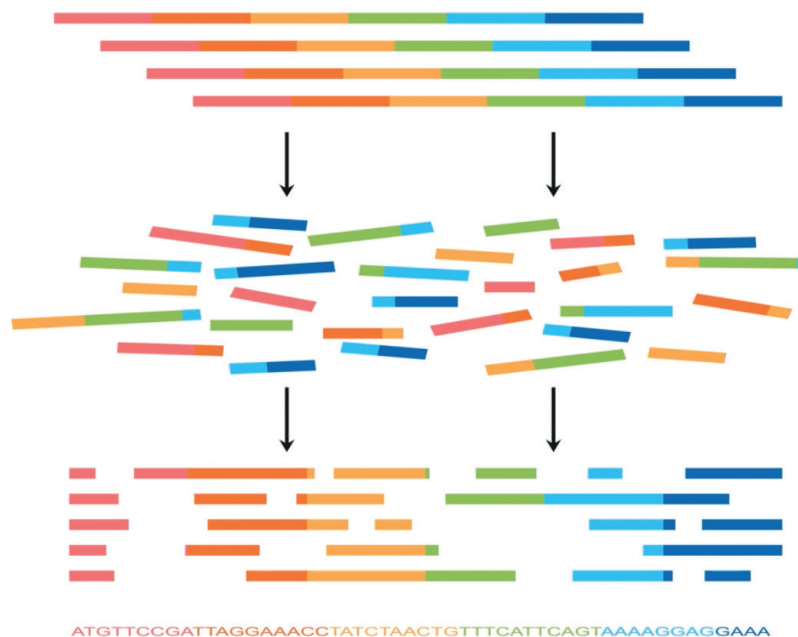
Poslední prezentace, jejímž autorem byl prim. Fabian, byla zaměřena na způsob čtení dat získaných pomocí NGS. Principy, jakými se získávají údaje o pořadí nukleotidů v DNA, jsou různé. Primárním zdrojem dat v sekvenátoru může být kamera, která postupně snímá měnící se fluorescenční signály v určitém bodu skleněné destičky – fluorescenční signál (resp. jeho barva) odpovídá vždy jednomu z nukleotidů tvořících DNA. Měnící se pořadí barevných signálů je dokumentováno uloženými obrazy a současně

zapisováno v datovém formátu, který je specifický dle výrobce sekvenátoru. Objem těchto dat se pohybuje v jednotkách Gb na jeden běh sekvenace. Aby bylo možné s těmito daty dále pracovat, jsou převedena do formátu FASTQ, který obsahuje pořadí nukleotidů v písmenech CGAT (každý vzorek má dva soubory FASTQ, neboť DNA se sekvenuje obousměrně). S tímto formátem již může pracovat jakýkoliv další software. **FASTQ** je standardizovaný formát datového výstupu ze sekvenátoru, který popisuje mnohočetné krátké úseky (několika „slov“ či „vět“) genetického kódu, o nichž však přesně nevíme, do jaké sekvenované části genomu patří. Proto se tyto vytržené krátké úseky pomocí softwaru přirovnávají k předloze – referenčnímu genomu (jedná se o mezinárodní konsenzuální sekvenci „modelového příslušníka homo sapiens“). Podle této předlohy zařadí software jednotlivé úseky („slova“ či „věty“) genetického kódu za sebe, a to i v případě, že jsou některá místa špatně přečtená nebo nejsou přečtená vůbec (obrázek 3).

Důležitým parametrem je počet **opakovaných čtení** („readů“) jednoho úseku DNA – NGS může generovat náhodné chyby, jedno čtení by tedy znamenalo vysokou pravděpodobnost chybného výsledku. V nádorových buňkách, vzhledem k jejich genetické nestabilitě, také často vznikají náhodné chyby, mimoto při sekvenování nádorů je v sekvenátoru směs úseků DNA ze zdravých buněk a potenciálně mutované DNA z nádorových buněk. Je tedy zapotřebí, aby byla DNA čtena mnohokrát (minimálně 100x, optimálně 300x) tak, aby byla jistota, že budou eliminovány náhodné chyby a zároveň budou rozpoznány opakující se nenáhodné chyby, tj. hledané mutace. S dosažitelným po-

obrázek 3 Řazení jednotlivých sekvenovaných úseků DNA podle referenčního genomu

Sekvence krátkých přečtených úseků se seřadí podle předlohy (jako puzzle podle obrázku) – sekvence tzv. referenčního genomu



čtem čtení opět souvisí kvalita vstupní DNA, která je ovlivněna zejména preanalytickou fází (viz výše).

Pokud se mezi přečtenými sekvencemi opakovaně vyskytuje stejná změna, jedná se pravděpodobně o biologický jev. Čím častěji se přitom změna vyskytuje (procento výskytu konkrétní genomické změny udává tzv. **alelická frekvence**), tím je náhoda méně pravděpodobná a tím spíše jde o skutečnou mutaci. Při hodnocení výsledků sekvenace molekulární biolog v softwaru nastavuje takovou hranici alelické frekvence, pod kterou se určitá změna v sekvenci považuje za nepravdivý (náhodný, falešný) výsledek – v běžných podmínkách je tato hranice stanovena na 5 %. Tato hranice je rovněž velmi závislá na kvalitě a množství vstupní DNA a na poměru nádorových a nenádorových buněk v analyzované tkáni. Zastoupení nádorových buněk by proto ve vyšetřovaném vzorku nemělo klesnout pod 20 %, v opačném případě již nelze odlišit mutaci od metodické chyby nebo šumu pozadí. Pokud se určitá změna vyskytuje v nízké alelické frekvenci, může se jednat o metodickou chybu nebo jde o skutečnou mutaci, která je však přítomna jen v minoritním klonu v nádoru (subklonální mutace). Poté, co je v sekvenci DNA jednoznačně identifikována specifická varianta, je třeba zjistit, zda je tato klinicky významná (přispívá ke vzniku nebo progresi nádorového růstu), či nikoliv. K tomuto určování jsou využívány velké světové databáze jako COSMIC či ClinVar. Některé varianty jsou patogenní, jiné nepatogenní, u jiných jejich klinický význam neznáme (viz výše).

V závislosti na typu a velikosti použitého panelu lze pomocí NGS identifikovat i změny obecnějšího charakteru, jako jsou mikrosatelitová nestabilita (MSI) či TMB. Na dru-

hou stranu, pomocí NGS nelze zjistit expresi PD-L1, HER2 ani jiného proteinu a nelze s jistotou odlišit zárodečnou mutaci od somatické. Metoda NGS je stran výsledků a jejich interpretace velmi závislá na tom, jaká je položena otázka ze strany ošetřujícího lékaře. Podle toho je volena metodika odpovědi. Na interpretaci sekvenačních výsledků se musí podílet patolog, neboť jedna mutace v různém tkáňovém a morfologickém kontextu může mít zcela odlišný význam (např. mutace BRAF může být přítomna nejen v melanomech, ale i v běžných névech, tyreoidálním karcinomu, vlasatobuněčné leukemii aj.) a její nález může vést i k přehodnocení diagnózy.

Konečným cílem sekvenačního úsilí v onkologii je zejména predikce vhodné cílené léčby. Nacházení vhodného léčiva k určitým mutacím či poruchám je ovšem proces nesmírně komplikovaný, se kterým snad v budoucnu pomůže umělá inteligence.

■ Zpracovala MUDr. Jana Fabiánová

#### Literatura

- 1 Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al.; IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008;29:1282–91.
- 2 Stratton MR. Journeys into the genome of cancer cells. *EMBO Mol Med* 2013;5:169–72.
- 3 Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4–23.
- 4 D'Alfonso T, Liu YF, Monni S, et al. Accurately assessing her-2/neu status in needle core biopsies of breast cancer patients in the era of neoadjuvant therapy: emerging questions and considerations addressed. *Am J Surg Pathol* 2010;34:575–81.
- 5 Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224.