

ný zostrih a pod. Navyše, WES podobne ako génové panely nie je ideálnou metódou na identifikáciu polygénového pozadia epilepsií (napríklad pri výpočte skóre polygénového rizika uvedeného nižšie), nakoľko pri nich môžu byť klinicky relevantné aj varianty nachádzajúce sa mimo proteín kódujúcich oblastí génov.

Sekvenovanie celého genómu (WGS)

WGS umožňuje hodnotenie takmer celého genómu vrátane nekódujúcich sekvenčii. Umožňuje tak odhaliť prípadné varianty v intrónoch, ktoré môžu ovplyvňovať RNA zostrih, či varianty v promótorových a iných regulačných oblastiach, ktoré môžu mať vplyv na reguláciu génovej expresie. Z hľadiska typu sekvenčných variantov predstavuje WGS najcitlivejšiu metódu a pri použití špecializovaných bioinformatických nástrojov umožňuje hodnotiť SNV a malé indely, CNV, mikrosatelity, ale aj rôzne SV. Predstavuje tak zatiaľ najkomplexnejší prístup k hodnoteniu genetického pozadia epilepsií. V porovnaní s WES je potrebné zvážiť mierne vyššiu cenu analýz, výrazne vyššie nároky na výpočtové kapacity, ako aj na interpretáciu získaných výsledkov. Pri WGS môže byť nateraz limitujúcim faktorom tiež problematické sekvenovanie niektorých oblastí genómu, neúplnosť dostupnej sekvencie ľudského referenčného genómu a limitované vedomosti ohľadom klinického potenciálu sekvenčných variantov nachádzajúcich sa mimo proteín kódujúcich oblastí génov. Preto v mnohých klinických aplikáciách je analýza WGS dát často zameraná len na exómové oblasti („pseudoexómová/panelová analýza“), nakoľko je stále náročné interpretovať efekt nekódujúcich variantov.

Na druhej strane nesie WGS v sebe potenciál na opustenie rámcov diagnostiky monogénových foriem epilepsií smerom k polygénovým a komplexným formám. Pri týchto prístupoch sa aplikujú tzv. výpočty skóre polygénového rizika (PRS – polygenic risk scores). Pri nich sa integrujú nálezy z viacerých veľkých celogenómových asociačných štúdií (GWAS – genome wide association studies), ktoré využívajú špecifické mikročipové analýzy umožňujúce súbežnú genotypizáciu veľkého počtu SNV rozložených po celom genóme. Takéto štúdie sú evidované napr. v databáze

GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Zároveň na veľkých kohortách jedincov s GGE a FE boli uskutočnené GWAS štúdie skúmajúce už úlohu bežných sekvenčných variantov ako rizikových faktorov ochorenia, následne megaanalýza kombinujúca niekoľko týchto štúdií identifikovala v celom genóme 16 lokusov významných pre sledované epilepsie, pričom niektoré z nich sa nachádzajú v blízkosti známych epileptických génov alebo priamo v nich (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2018). Pri výpočte PRS osoby pre určité konkrétne ochorenie sa z WGS dát sumarizuje celkový počet variantov zvyšujúcich a znižujúcich riziko spolu s veľkosťou ich vplyvu. Na základe uvedených štúdií boli vyvinuté PRS výpočty pre FE a GGE (Leu et al., 2020). V blízkej budúcnosti môže byť dostupné testovanie genetických markerov citlivosti na hodnotenie rizika z WGS dát aj pre iné druhy epilepsie.

Súčasný limit genetického testovania epilepsií a perspektívy ich prekonania

Z dôvodu veľkej klinickej a genetickej heterogenity je pri epilepsii limitované využitie konvenčných genetických analýz, ktoré tvoria veľkú časť v súčasnosti klinicky dostupných testov a sú zamerané na individuálne gény, prípadne na rôzne veľké génové panely. Je pri nich potrebná prioritizácia génov pre gén-po-géne prístup, čo často vedie k tzv. diagnostickej odysei bez včasného uzavretia diagnózy. V tomto smere veľkým pokrokom, aspoň v prípade monogénových epilepsií, je zavedenie MPS technológií, najmä vo forme WES a WGS. Tie zlepšili našu schopnosť detegovať varianty v známych aj nových génoch a tým zvýšiť diagnostický výťažok na približne 45–48 % (Krey et al., 2022).

Limitácií je však stále niekoľko. Jednou z nich môže byť nezachytenie variantov mimo cieľovej oblasti analýz, napr. v hlbokých intrónových, medzigénových, resp. v regulačných oblastiach, čo je najtypickejšie pre menšie génové panely aj pre WES. Riešením môže byť tranzícia na WGS analýzy.

Spoločnou limitáciou všetkých analytických postupov je možnosť, že variant je síce odhalený, ale na základe nástrojov a znalostí dostupných v čase analýzy zostáva opísaný

ako variant neznámeho významu (VUS), čiže jeho klinická signifikancia je neznáma. V tomto smere sa však situácia zlepšuje, keďže genomické štúdie pribúdajú a opisuje sa klinický význam čoraz väčšieho počtu variantov. Táto limitácia preto môže byť prekonaná opätovnou analýzou a interpretáciou sekvenčných údajov s odstupom času, na základe nových informácií z literatúry, nových bioinformatických nástrojov a neustále aktualizovaných databáz ochorení a variantov. Predchádzajúce štúdie ukázali, že opätovná analýza údajov WES a WGS môže zvýšiť diagnostický výťažok o 5 % až 26 % (Johannesen et al., 2023).

Postupne pribúdajú informácie aj o variantoch nachádzajúcich sa mimo proteín kódujúcich oblastí, čo v budúcnosti má potenciál ďalej zvyšovať diagnostický výťažok, a to špecificky pri WGS. Pre presnejšiu funkčnú interpretáciu variantov identifikovaných v intrónoch a odhalenie ich prípadného vplyvu na zostrih mRNA môžu poslužiť novovyvíjané nástroje na hodnotenie variantov v nekódujúcich častiach genómu (Zhou et Troyanskaya, 2015; Kurosawa et al., 2023), ako aj hodnotenie transkriptómu pomocou sekvenovania RNA (RNA-seq), ktoré v posledných rokoch nachádza uplatnenie v klinickej diagnostike (Johannesen et al., 2023). Táto metóda tiež deteguje zmeny génovej expresie a expresiu dlhých nekódujúcich RNA (lncRNAs), ktoré by mohli zodpovedať otázkam ohľadom chýbajúcej dedičnosti epilepsií.

Určitou limitáciou pre WES aj WGS môže byť aj to, že použité bioinformatické nástroje nepodporujú identifikáciu a interpretáciu dostatočne širokej palety možných typov sekvenčných zmien z MPS dát (napr. CNV, mikrosatelity, prípadne iné SV). Dnes sú dostupné špecializované bioinformatické postupy, ktoré umožňujú tieto limitácie prekonať, je však potrebné stále viac ich zahrnúť do rutinného použitia pri interpretovaní a hodnotení WES/WGS dát.

Potrebný je naďalej aj vývoj stále nových a efektívnejších nástrojov, ktoré poskytnú riešenia pre špecifika analýzy určitých druhov variantov, ako sú expanzie či iné zmeny tandemových repetícií (TR). Napríklad pri genetickej determinácii familiárnych adultných myoklonických epilepsií (FAME) zohrávajú úlohu veľmi špecifické zmeny mikrosatelitových