



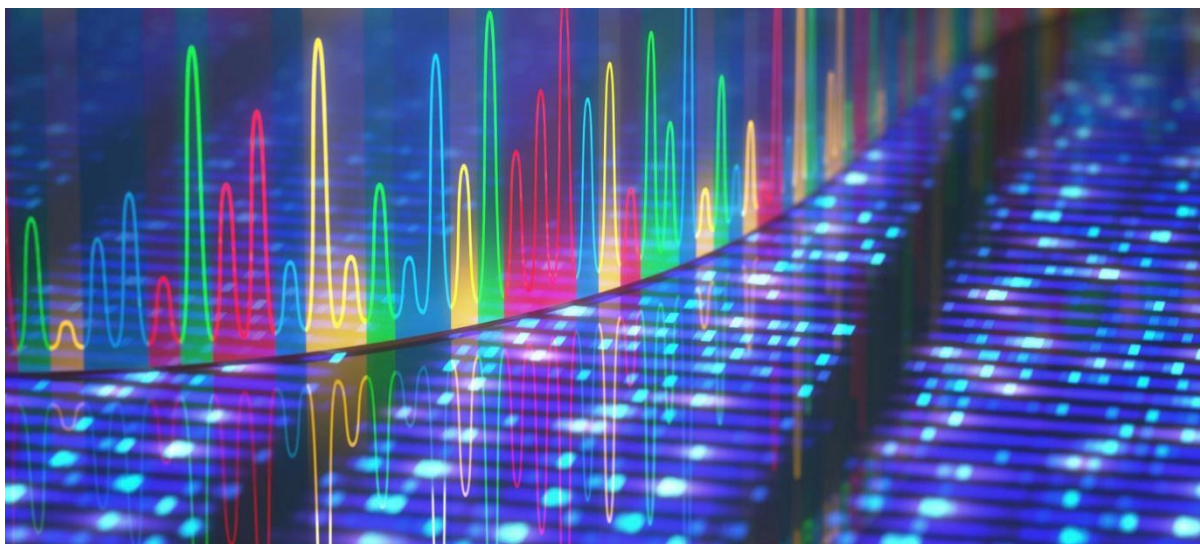
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η χρήση των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς
στα πλαίσια της εξατομικευμένης ιατρικής**



Όνοματεπώνυμο Φοιτητή (Α.Μ.)

Αουρόρα Ισεμπέρι (20678084)

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα

Δρ. Άννα Κολλιοπούλου

ΑΘΗΝΑ, 2024

ΠΗΓΗ ΕΙΚΟΝΑΣ ΕΞΩΦΥΛΛΟΥ

[DNA sequencing methods: from Sanger to NGS | INTEGRA \(integra-biosciences.com\)](https://www.integra-biosciences.com/en/dna-sequencing-methods-from-sanger-to-ngs)



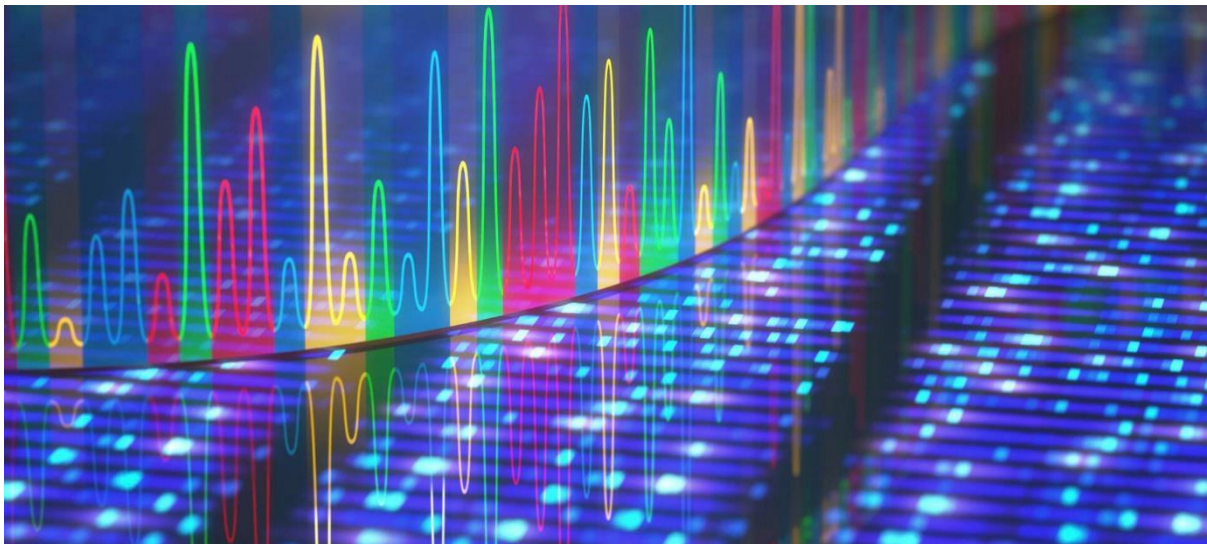
UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES



Section of Medical Laboratories

DISSERTATION

**The use of next generation sequencing technologies
in the context of personalized medicine**



Student Name (C.N.)

Aurora Iseberi (20678084)

Name of Supervisor

Dr. Anna Kolliopoulou

ATHENS, 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Άννα Κολλιοπούλου

Ακαδημαϊκή Υπότροφος-Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια,
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών
Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Απόστολος Μπελούκας

Αναπληρωτής Καθηγητής,
Αντιπρόεδρος Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών,
Διευθυντής του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και
Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών,
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών,
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP

Anna Kolliopoulou

Academic Fellow-Postdoctoral Researcher,
Department of Biomedical Sciences,
Section of Medical Laboratories, University of West Attica

Apostolos Beloukas

Associate Professor,
Vice President of the Department of Biomedical Sciences,
Director of the Laboratory of Molecular Microbiology and
Immunology, Department of Biomedical Sciences,
Section of Medical Laboratories, University of West Attica

Chrysanthi Voyiatzaki


Assistant Professor, Department of Biomedical Sciences,
Section of Medical Laboratories, University of West Attica

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα ΙΣΕΜΠΕΡΙ ΑΟΥΡΟΡΑ του ΦΑΤΟΣ με αριθμό μητρώου 20678084 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα


ΑΟΥΡΟΡΑ ΙΣΕΜΠΕΡΙ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Δρ. Άννα Κολλιοπούλου για την καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια συγγραφής της εργασίας. Οι συμβουλές και η βοήθεια που μου πρόσφερε αποτέλεσαν σημαντικό κομμάτι για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα αξιότιμα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Μπελούκα Απόστολο και την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη που δέχθηκαν να αξιολογήσουν τη διπλωματική μου εργασία.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την διαρκή αγάπη και στήριξη που μου προσφέρουν.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AML-MR: Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-related changes, Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία σχετιζόμενη με Μυελοδυσπλαστικού τύπου διαταραχές

BAL: Bronchoalveolar Lavage, Βρογχοκυψελιδική Έκπλυση

BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid, Υγρό Βρογχοκυψελιδικής Έκπλυσης

CCD: Charge-Coupled Device, Ανιχνευτής Συζευγμένου Φορτίου

cfDNA: cell-free DNA, DNA ελεύθερο κυττάρων

ClinVar: Clinical variant database, Βάση δεδομένων κλινικών παραλλαγών

CMT: Charcot-Marie-Tooth disease, Νόσος Charcot-Marie-Tooth (Κληρονομική αισθητικοκινητική νευροπάθεια)

CMV: Cytomegalovirus, Κυτταρομεγαλοϊός

CNV: Copy Number Variation, Παραλλαγή Αριθμού Αντιγράφων

ctDNA: Circulating tumor DNA, Κυκλοφορούν καρκινικό DNA

CUP: Cancer of Unknown Primary site, Καρκίνωμα Αγνώστου Πρωτοπαθούς εστίας

DCM: Dilated Cardiomyopathy, Διατατική Μυοκαρδιοπάθεια

DNA: Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ

DMSO: Dimethyl Sulfoxide, Διμεθυλοσουλφοξείδιο

dNTP: Deoxynucleotide Trisphosphate, Τριφωσφορικό Δεοξυριβονουκλεοτίδιο

ddNTP: Dideoxynucleotide Trisphosphate, Τριφωσφορικό Διδεοξυριβονουκλεοτίδιο

EBV: Epstein-Barr virus, Ιός Epstein-Barr

EOAD: Early on-set Alzheimer's disease, Alzheimer πρώιμης έναρξης

ESMO PMWG: European Society for Medical Oncology Precision Medicine Working Group, Ομάδα Ιατρικής Ακριβείας της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Ιατρικής Ογκολογίας

GenCC: Gene curation coalition, Συνασπισμός γονιδιακής επιμέλειας

HCM: Hypertrophic Cardiomyopathy, Υπερτροφική Μυοκαρδιοπάθεια

HRD: Homologous Recombination Deficiency, Ανεπάρκεια Ομόλογου Ανασυνδυασμού

HRR: Homologous Recombination Repair Pathway, Μονοπάτι Επιδιόρθωσης μέσω Ομόλογου Ανασυνδυασμού

ICGC: International Cancer Genome Consortium, Διεθνής Ένωση Καρκινικών Γονιδιωμάτων

LDL: Low Density Lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη Χαμηλού Μοριακού Βάρους

LOAD: Late Onset Alzheimer's Disease, Νόσος Alzheimer Όψιμης Έναρξης

LOH: Loss of Heterozygosity, Απώλεια Ετεροζυγωτίας

LQTS: Long QT Syndrome, Σύνδρομο Μακρού QT

MMR: Mismatch Repair, Επιδιόρθωση Αταίριαστου Ζεύγους

mNGS: Metagenomic Next Generation Sequencing, Μεταγονιδιωματική Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς

MS: Multiple Sclerosis, Πολλαπλή Σκλήρυνση

MSI: Microsatellite Instability, Μικροδορυφορική Αστάθεια

NGS: Next Generation Sequencing, Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer, Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα

NTRK: Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor, Νευροτροφικός Υποδοχέας Κινάσης Τυροσίνης

PCR: Polymerase Chain Reaction, Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

rRNA: Ribosomal Ribonucleic Acid, Ριβοσωμικό Ριβονουκλεϊκό Οξύ

SBS: Sequencing by Synthesis, Αλληλούχιση μέσω Σύνθεσης

SCA: Spinocerebellar Ataxia, Νωτιαία Παρεγκεφαλιδική Αταξία

SMS: Single Molecule Sequencing, Μονομοριακή Αλληλούχιση (ή Αλληλούχιση Μεμονωμένου Μορίου)

SMRT: Single Molecule Real Time Sequencing, Μονομοριακή Αλληλούχιση σε Πραγματικό Χρόνο

SNP: Single Nucleotide Polymorphism, Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός

SNV: Single Nucleotide Variant, Μονονουκλεοτιδική Παραλλαγή

ssDNA: Single Stranded DNA, Μονόκλωνο DNA

TAAD: Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection, Ανεύρυσμα και Διαχωρισμός Θωρακικής Αορτής

TCGA: The Cancer Genome Atlas, Άτλας Καρκινικών Γονιδιωμάτων

TMB: Tumor Mutation Burden, Φορτίο Μεταλλαγών του Όγκου

tNGS: Targeted Next Generation Sequencing, Στοχευμένη Αλληλούχιση Επομένης Γενιάς

tRNA: Transfer Ribonucleic Acid, Μεταφορικό Ριβονουκλεϊκό Οξύ

VUS: Variant of Uncertain Significance, Μεταλλαγή Αγνώστου Κλινικής Σημασίας

WGS: Whole Genome Sequencing, Αλληλούχιση Πλήρους Γονιδιώματος

ZMW: Zero Mode Waveguide, Κυματοδηγός Μηδενικής Κατάστασης

OML: Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Σκοπός	1
1.2 Σύντομη ιστορική ανασκόπηση	2
2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
2.1 Μέθοδοι αλληλούχισης 1ης γενιάς.....	3
2.1.1 Αλληλούχιση κατά Maxam – Gilbert (Μέθοδος χημικής αποικοδόμησης)	3
2.1.2 Αλληλούχιση κατά Sanger (Μέθοδος τερματισμού αλυσίδας)	4
2.2 Μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς.....	6
2.2.1 Μέθοδοι αλληλούχισης 2ης γενιάς.....	7
2.2.1.1 Roche 454	7
2.2.1.2 Illumina	9
2.2.1.3 SOLiD	11
2.2.1.4 Ion Torrent	13
2.2.2 Μέθοδοι αλληλούχισης 3ης γενιάς.....	14
2.2.2.1 Μονομοριακή αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο - Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT)	14
2.2.2.2 Αλληλούχιση με τη χρήση νανοπόρων - Nanopore sequencing	15
2.2.3. Είδη αλληλούχισης NGS που χρησιμοποιούνται στα κλινικά εργαστήρια.....	17
2.2.3.1 Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος - Whole genome sequencing (WGS) ..	17
2.2.3.2 Αλληλούχιση ολόκληρων των εξωνίων - Whole exome sequencing (WES)	17
2.2.3.3 Στοχευμένη αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Targeted next generation sequencing (tNGS).....	18
2.2.3.4 Μεταγονιδιωματική αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Metagenomic next generation sequencing (mNGS)	18
3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
3.1 Μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς στη διάγνωση και αντιμετώπιση ανθρώπινων ασθενειών	19
3.1.1 Κιτ NGS	19
3.1.2 Βάσεις δεδομένων	19
3.1.3 Λοιμώξεις.....	20
3.1.3.1 Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος	22
3.1.3.2 Λοιμώξεις κυκλοφορικού συστήματος.....	24
3.1.3.3 Λοιμώξεις νευρικού συστήματος	25
3.1.3.4 Λοιμώξεις των υπόλοιπων συστημάτων του ανθρώπου.....	26
3.1.3.5 Ανίχνευση γονιδίων αντοχής.....	27

3.1.4 Καρκίνος	28
3.1.4.1 Πρόγνωση - Διάγνωση	28
3.1.4.1.1 Καρκίνος του πνεύμονα.....	30
3.1.4.1.2 Καρκίνος του μαστού	31
3.1.4.1.3 Καρκίνος θυρεοειδούς.....	31
3.1.4.1.4 Καρκίνοι αναπαραγωγικού συστήματος	32
3.1.4.1.5 Καρκίνοι πεπτικού συστήματος.....	32
3.1.4.1.6 Αιματολογικές κακοήθειες	33
3.1.4.2 Υγρή βιοψία	34
3.1.4.3 Θεραπεία	34
3.1.5 Καρδιαγγειακές νόσοι.....	37
3.1.5.1 Οικογενής υπερχοληστερολαμία (Familial hypercholesterolemia, FH).....	38
3.1.5.2 Μυοκαρδιοπάθειες.....	39
3.1.5.3 Κληρονομικές διαταραχές του ηλεκτρικού συστήματος της καρδιάς (inherited channelopathies).....	40
3.1.5.4 Ανεύρυσμα και διαχωρισμός θωρακικής αορτής (Thoracic aortic aneurysm and dissection-TAAD).....	40
3.1.6 Νευροεκφυλιστικά νοσήματα.....	41
3.1.6.1 Νόσος Alzheimer	41
3.1.6.2 Νόσος Parkinson.....	42
3.1.6.3 Επιληψία	43
3.1.6.4 Πολλαπλή σκλήρυνση - Multiple Sclerosis (MS).....	43
3.1.6.5 Κληρονομική αισθητικοκινητική νευροπάθεια - Charcot-Marie-Tooth disease (CMT)	44
3.1.6.6 Νωτιαία παρεγκεφαλιδική αταξία - Spinocerebellar ataxia (SCA)	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
4.1 Πλεονεκτήματα των NGS	46
4.2 Μειονεκτήματα- περιορισμοί.....	46
4.3 Ο σημαντικός ρόλος των NGS στην εξατομικευμένη ιατρική.....	47
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	49
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	50
ABSTRACT	51
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Next generation sequencing-NGS) αποτελεί μια επαναστατική ανακάλυψη για τους τομείς τόσο της Μοριακής Βιολογίας όσο και της Ιατρικής. Οι μέθοδοι αυτές δίνουν τη δυνατότητα της πλήρους ανάλυσης του γονιδιώματος με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια, γεγονός που έδωσε στους επιστήμονες την ευκαιρία να εξερευνήσουν τις πολυπλοκότητες που παρουσιάζουν οι γενετικές πληροφορίες με πρωτοφανείς τρόπους. Έχουν αναπτυχθεί πολλές πλατφόρμες NGS 2ης γενιάς (Illumina, Roche 454, SOLiD, Ion torrent) και 3ης γενιάς (Nanopore sequencing, Single molecule sequencing), οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων έως και δισεκατομμυρίων θραυσμάτων DNA. Το γεγονός αυτό έδωσε στους επιστήμονες νέες ευκαιρίες να κατανοήσουν καλύτερα, μεταξύ άλλων, τη γενετική και μικροβιακή ποικιλομορφία καθώς και τη γονιδιακή έκφραση.

Οι μέθοδοι NGS πλέον παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στο κομμάτι της έρευνας όσο και στο κλινικό κομμάτι. Είναι γνωστό το πόσο σημαντική είναι η εφαρμογή της εξατομικευμένης ιατρικής, δηλαδή η αντιμετώπιση του κάθε ασθενή ξεχωριστά και η δημιουργία ατομικής θεραπείας ανάλογα με τις ανάγκες του. Μέσω των μεθόδων NGS γίνεται εύκολη η πλήρης ανίχνευση και ταυτοποίηση όλων των γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που έχουν πιθανό ρόλο στην ανάπτυξη κάποιου νοσήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο κλινικός γιατρός να μπορεί να χορηγήσει συγκεκριμένη θεραπεία με βάση τυχόν ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει ο κάθε ασθενής, η οποία θα είναι και πιο αποτελεσματική καθώς είναι «ραμμένη στα μέτρα του». Επίσης, μέσω των μεθόδων NGS διευκολύνεται και η πρόληψη ασθενειών καθώς η λεπτομερής ανάλυση του γενετικού προφίλ ενός ανθρώπου βοηθάει στην αναγνώριση γενετικών προδιαθέσεων που έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες νόσους. Έτσι ασθενείς που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για την εμφάνιση κάποιας ασθένειας μπορούν να εφαρμόσουν τα κατάλληλα προληπτικά μέτρα και να βρίσκονται σε πιο στενή παρακολούθηση από τον γιατρό.

1.1 Σκοπός

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως σκοπό τη διερεύνηση των μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς και των εφαρμογών τους στο πεδίο της εξατομικευμένης ιατρικής.

Υπάρχουν διάφορα είδη τεχνικών NGS τόσο 2ης όσο και 3ης γενιάς, καθεμία από τις οποίες έχει διαφορετική αρχή μεθόδου και ξεχωριστά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η χρήση των τεχνικών αυτών έχει ήδη βοηθήσει στην κατανόηση ασθενειών όπως λοιμώξεων που αφορούν διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, διαφόρων τύπων καρκίνου, καρδιοαγγειακών νοσημάτων και νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Η διευκρίνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου εμφανίζονται τα νοσήματα αυτά έδωσε την ευκαιρία ανάπτυξης εγκεκριμένων θεραπειών για την αντιμετώπισή τους, ενώ επίσης η παροχή τέτοιου είδους εξατομικευμένων θεραπειών έχει αποδειχτεί πολύ αποτελεσματική.

1.2 Σύνοψη ιστορική ανασκόπηση

Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στην ιστορία της επιστήμης είναι η ανακάλυψη του μοντέλου της διπλής έλικας του DNA το 1953 από τους Franklin, Watson και Crick, κάτι που αποτέλεσε ένα πρώτο βήμα στην κατανόηση του μηχανισμού της αντιγραφής του DNA και της κωδικοποίησης πρωτεϊνών από γονίδια (Watson & Crick, 1953). Η δυνατότητα ανάγνωσης όμως του DNA ήταν ακόμα δύσκολο να επιτευχθεί, λόγω της πολυπλοκότητάς του. Οι αρχικές προσπάθειες αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων έγιναν σε τύπους RNA όπως είναι τα ριβοσωμικά RNA των μικροοργανισμών, τα μεταφορικά RNA (tRNA) και εκείνα που προέρχονται από τους βακτηριοφάγους, καθώς το γενετικό τους υλικό ήταν λιγότερο πολύπλοκο και μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με εκείνο των ευκαρυωτικών οργανισμών. Το 1965 ο Robert Holley και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν την πρώτη αλληλούχιση νουκλεϊκού οξέος, και πιο συγκεκριμένα του tRNA της αλανίνης του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* (Holley et al., 1965). Την ίδια περίοδο ο Sanger και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια νέα τεχνική που βασιζόταν στην ανίχνευση ραδιοσημασμένων θραυσμάτων μετά από πέψη (Sanger et al., 1965). Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική το εργαστήριο του Walter Fiers κατάφερε το 1973 να επιτύχει την πρώτη πλήρη αλληλούχιση γονιδίου, αυτού της πρωτεΐνης του περιβλήματος του βακτηριοφάγου MS2 (Fiers et al., 1976). Από τότε υπήρξαν πολλές μικρές επιτυχίες στην αλληλούχιση μικρών γονιδιωμάτων, όμως η μεγάλη ανακάλυψη που άλλαξε για πάντα την πρόοδο της τεχνολογίας αλληλούχισης του DNA ήταν η ανάπτυξη της τεχνικής αλληλούχισης με τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας από τον Sanger το 1977 (Sanger et al., 1977). Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές της εποχής

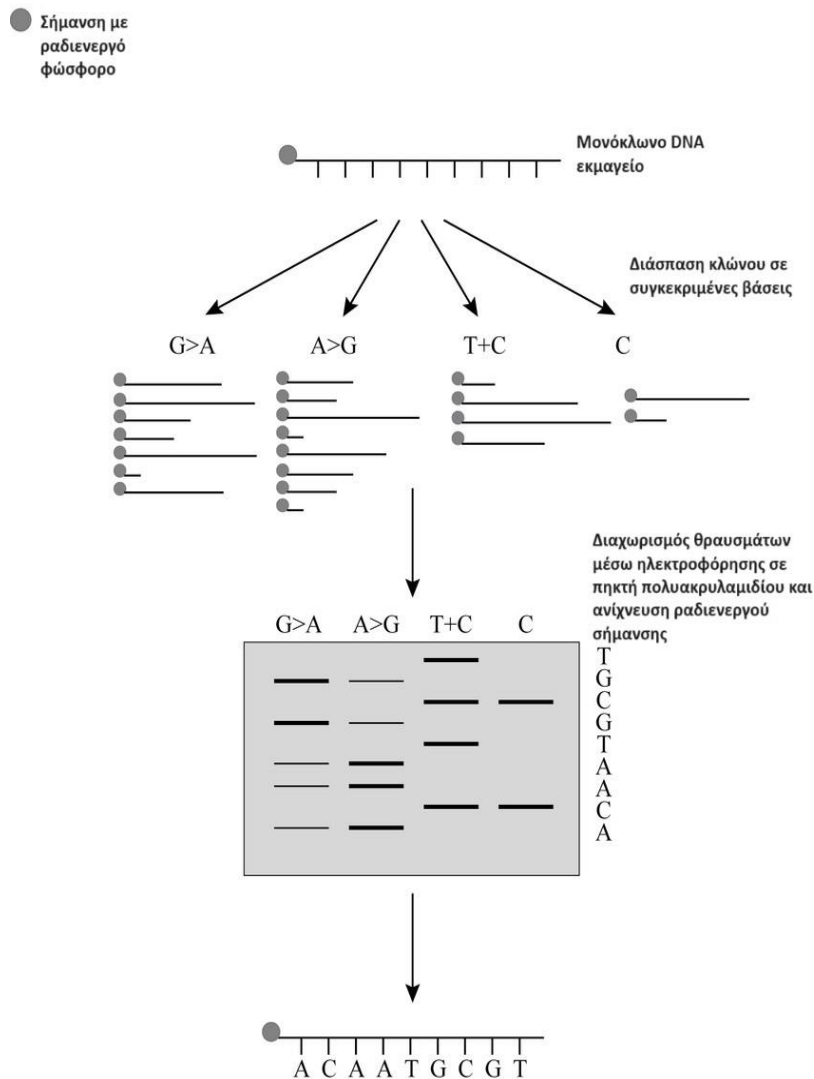
πρόσφερε μεγαλύτερη ακρίβεια και ήταν πιο εύκολο να εφαρμοσθεί. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια ακόμα και στις μέρες μας, με παραλλαγές και βελτιώσεις που έγιναν κατά το πέρασμα των χρόνων και αποτελεί πρότυπο για την ανάπτυξη των τεχνολογιών αλληλούχισης 2ης και 3ης γενιάς (Heather & Chain, 2016).

2. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Μέθοδοι αλληλούχισης 1ης γενιάς

2.1.1 Αλληλούχιση κατά Maxam – Gilbert (Μέθοδος χημικής αποικοδόμησης)

Μία από τις πρώτες τεχνικές αλληλούχισης του DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η τεχνική αλληλούχισης μέσω χημικής αποικοδόμησης, την οποία δημοσίευσαν οι Maxam και Gilbert το 1977. Με βάση αυτή τη μέθοδο, ένα δίκλωνο μόριο DNA σημαίνεται με ραδιενεργό φωσφόρο στο 3' ή το 5' άκρο κάθε αλυσίδας. Στη συνέχεια γίνεται αποδιάταξη του dsDNA με τη χρήση διαλύματος διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και θέρμανση στους 90°C. Έτσι σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τους 2 κλώνους και εν συνεχεία αυτοί διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Ένας από τους δύο κλώνους καθαρίζεται και χωρίζεται σε 4 μέρη. Ακολούθως πραγματοποιούνται 4 αντιδράσεις, η καθεμία με τη χρήση διαφορετικών χημικών αντιδραστηρίων, τα οποία αντιδρούν και διασπών τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς συγκεκριμένων βάσεων ή συνδυασμών τους. Οι 4 αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι: 1) στο νουκλεοτίδιο αδενίνης, 2) στα νουκλεοτίδια αδενίνης-γουανίνης, 3) στο νουκλεοτίδιο κυτοσίνης και 4) στα νουκλεοτίδια κυτοσίνης-θυμίνης (Verma et al., 2017). Έπειτα, τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και γίνεται ανίχνευση της αλληλουχίας του DNA μέσω απεικόνισης με αυτοραδιογραφία (**Εικόνα 1**) (Maxam & Gilbert, 1977). Η ανακάλυψη αυτής της μεθοδολογίας ήταν πολύ σημαντική για την εποχή εκείνη, όμως λόγω αφενός της χρήσης επικίνδυνων αντιδραστηρίων αφετέρου δε των τεχνικών της δυσκολιών αντικαταστάθηκε από την τεχνική αλληλούχισης κατά Sanger (Dorado et al., 2019).



Εικόνα 1. Μέθοδος αλληλούχησης κατά Maxam-Gilbert. Το μονόκλωνο DNA σημαίνεται με ραδιενεργό φώσφορο και στη συνέχεια διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσω 4 διαφορετικών αντιδράσεων, με τη χρήση ειδικών χημικών αντιδραστηρίων για την καθεμία. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βάση το μέγεθός τους. Η αλληλουχία του DNA-στόχου προσδιορίζεται μέσω αυτοραδιογραφίας. [Προσαρμογή από (Eidefors & Ab, 2015)].

2.1.2 Αλληλούχηση κατά Sanger (Μέθοδος τερματισμού αλυσίδας)

Η μέθοδος αλληλούχησης κατά Sanger αποτέλεσε σημαντική ανακάλυψη για την κατανόηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και ήταν το πρότυπο για την ανάπτυξη τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Μάλιστα, χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα σε πολλά

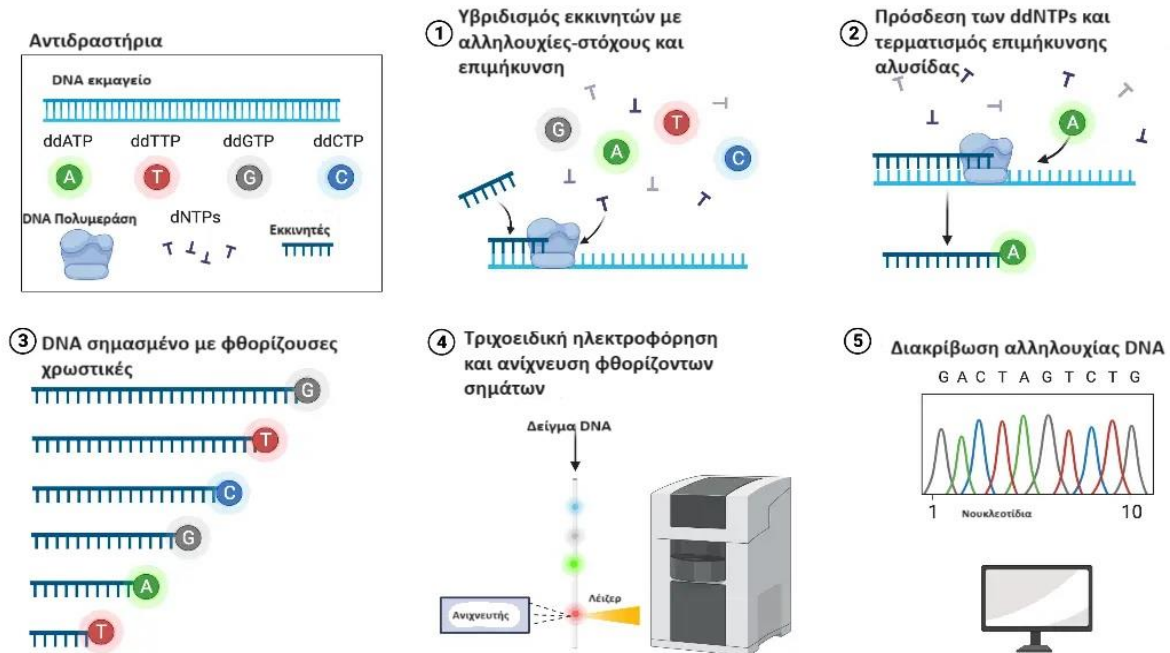
εργαστήρια. Η μέθοδος αυτή ανακαλύφθηκε από τον Sanger το 1975 και έγινε εμπορικά διαθέσιμη το 1977.

Το μίγμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αποτελείται από: μονόκλωνο DNA (single stranded DNA, ssDNA) που πρόκειται να αλληλουχηθεί, ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή (primer), DNA πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τριφωσφορικά διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) και διάλυμα DMSO (Verma et al., 2017). Τα ddNTPs είναι ραδιοσημασμένα χημικά ανάλογα των dNTPs, από τα οποία απουσιάζει η ομάδα υδροξυλίου -OH στο 3' άκρο, με αποτέλεσμα η ενσωμάτωσή τους κατά την αντίδραση σύνθεσης του DNA να οδηγεί στον τερματισμό της σύνθεσης. Τα ddNTPs προστίθενται σε πολύ μικρότερες ποσότητες από τα dNTPs και ενσωματώνονται τυχαία καταστέλλοντας την αντίδραση και παράγοντας θραύσματα διαφορετικού μήκους ανάλογα με το σημείο στο οποίο ενσωματώθηκαν. Πραγματοποιούνται 4 παράλληλες αντιδράσεις, η καθεμία από τις οποίες περιέχει διαφορετικό ddNTP που αντιστοιχεί σε μία από τις 4 βάσεις (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) (Sanger et al., 1977). Στη συνέχεια τα θραύσματα που προκύπτουν ηλεκτροφορούνται σε 4 διαφορετικές διαδρομές σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μία για κάθε αντίδραση. Τα θραύσματα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους και έτσι διαβάζοντας την πηκτή από κάτω προς τα πάνω, με τη βοήθεια φιλμ ακτίνων X είναι δυνατή η διακρίβωση της αλληλουχίας του DNA (**Εικόνα 2**) (McCombie et al., 2019).

Τα επόμενα χρόνια έγιναν πολλές νέες ανακαλύψεις που βοήθησαν στη βελτίωση της μεθόδου αλληλούχισης κατά Sanger. Κάποιες από αυτές ήταν η εφεύρεση της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, η χρήση φθορίζουσών χρωστικών για τη σήμανση των ddNTPs, η αλληλούχιση με τη μέθοδο των θερμικών κύκλων, η χρήση θερμοσταθερών DNA πολυμερασών και η ανάπτυξη ειδικού λογισμικού για την ανάλυση των αλληλουχιών (Slatko et al., 2018).

Η πρώτη αυτοματοποιημένη μηχανή για αλληλούχιση του DNA, βασισμένη στην μέθοδο κατά Sanger, παρουσιάστηκε πρώτη φορά το 1987 από την εταιρεία Applied Biosystems. Η μηχανή AB370 λειτουργούσε με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και μπορούσε να διαβάσει 96 βάσεις την φορά, 500 χιλιάδες βάσεις σε μια μέρα και το μήκος κάθε αλληλουχίας έφτανε

τις 600 βάσεις. Το σύγχρονο μοντέλο ABI3730x έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης 2,88 εκατομμυρίων βάσεων την ημέρα με μήκος αλληλουχιών μέχρι 900 βάσεις (Liu et al., 2012).



Εικόνα 2. Μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger. Το μίγμα για την αλληλούχιση DNA κατά Sanger αποτελείται από το DNA εκμαγείο, την DNA πολυμεράση, εκκινητές, dNTPs, και ddNTPs. Αρχικά πραγματοποιείται υβριδισμός εκκινητή και αλληλουχίας-στόχου. Στη συνέχεια η DNA πολυμεράση επιμηκώνει την αλυσίδα προσθέτοντας είτε dNTPs ή ddNTPs. Όταν γίνεται προσθήκη ενός ddNTP, η σύνθεση της αλυσίδας τερματίζεται. Έτσι προκύπτουν πολλά θραύσματα του ζητούμενου DNA σημασμένα με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική το καθένα, ανάλογα με το ddNTP που περιέχεται στην εκάστοτε αντίδραση. Τα θραύσματα αυτά υφίστανται τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή φθορισμού γίνεται η διακρίβωση της αλληλουχίας του DNA [Προσαρμογή από (Sanger Sequencing Method: Principle and Steps • Microbe Online, n.d.)]

2.2 Μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς

Οι μέθοδοι αλληλούχισης 1ης γενιάς, και κυρίως η μέθοδος κατά Sanger, έκαναν δυνατή την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Χρησιμοποιώντας αυτές τις τεχνικές το ερευνητικό Πρόγραμμα Αλληλούχισης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project) ολοκλήρωσε τη χαρτογράφηση και την αλληλούχιση όλων των γονιδίων του

ανθρώπου το 2004, δηλαδή περισσότερο από 10 χρόνια μετά την έναρξή του. Λόγω του μεγάλου κόστους και χρόνου που απαιτήθηκαν για την ολοκλήρωσή του ήταν προφανής η μεγάλη ανάγκη για νέες και καλύτερες τεχνικές αλληλούχισης του DNA. Αυτό οδήγησε σταδιακά στην ανάπτυξη νέων μεθόδων αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Thermes, 2014).

2.2.1 Μέθοδοι αλληλούχισης 2ης γενιάς

Οι τεχνολογίες αλληλούχισης 2ης γενιάς έφεραν σημαντικές αλλαγές στην αλληλούχιση του DNA καθώς επέτρεψαν την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων θραυσμάτων με αυξημένη ταχύτητα και ακρίβεια και επέτρεψαν την μαζικά παράλληλη αλληλούχιση. Οι 4 σημαντικότερες πλατφόρμες είναι οι Roche 454, Ion Torrent, Illumina και SOLiD (Satam et al., 2023). Τα βασικά βήματα που ακολουθεί κάθε τεχνική αλληλούχισης 2ης γενιάς είναι η θραυσματοποίηση του DNA, η δημιουργία βιβλιοθήκης και η ενίσχυσή της, με τελικό βήμα την αλληλούχιση και την ανάλυση των δεδομένων μέσω ειδικών λογισμικών (McCombie et al., 2019).

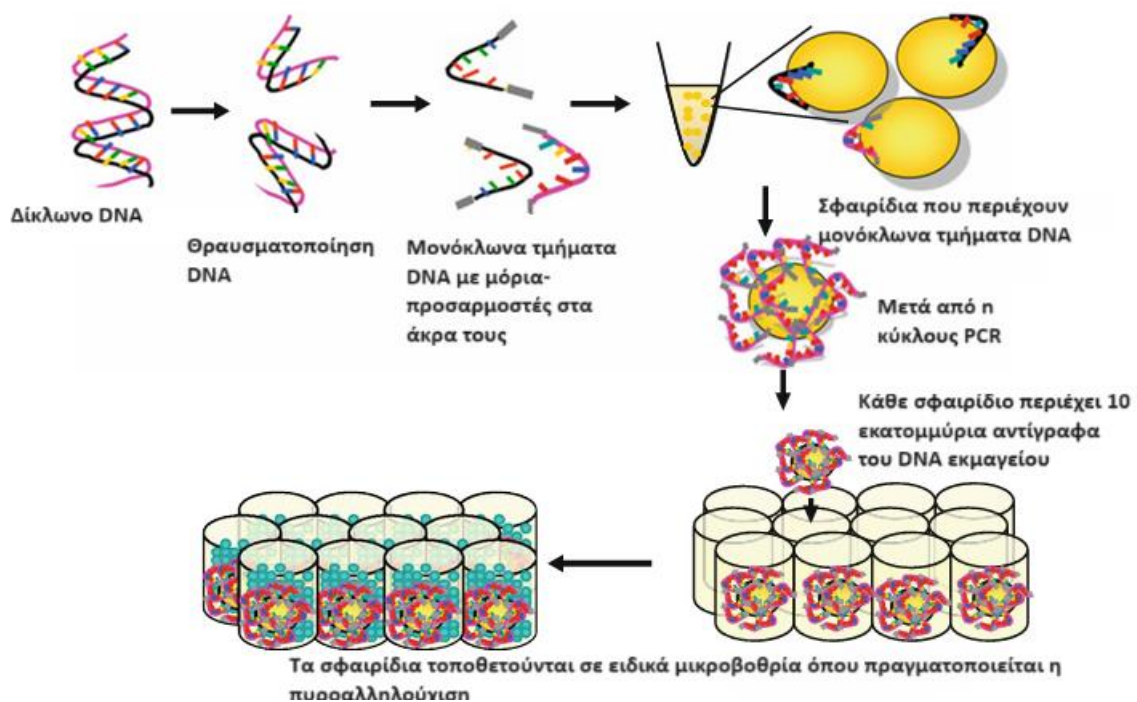
2.2.1.1 Roche 454

Η εταιρεία Roche παρουσίασε το πρώτο μηχάνημα τεχνολογίας αλληλούχισης 2ης γενιάς 454 το 2005, παρόλο που πλέον η παραγωγή του έχει διακοπεί, ήδη από το 2013. Η τεχνολογία πάνω στην οποία βασίζεται το σύστημα Roche 454 βασίζεται στην πυροαλληλούχιση. Η πυροαλληλούχιση αναπτύχθηκε αρχικά στη Σουηδία από την Pyrosequencing AB, αγοράστηκε από την 454 Life Sciences και τελικά κατέληξε στην Roche (Slatko et al., 2018).

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει τις τεχνικές της PCR σε γαλάκτωμα και της πυροαλληλούχισης (**Εικόνα 3**). Αφού δημιουργηθεί η βιβλιοθήκη με θραυσματοποίηση του DNA σε μικρότερα τμήματα, κάθε τμήμα ssDNA συνδέεται με σφαιρίδια και γίνεται παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων κάθε θραύσματος μέσω της τεχνικής PCR σε γαλάκτωμα (emulsion PCR). Στη συνέχεια γίνεται πυροαλληλούχιση πάνω σε ειδικές πλάκες μικροβοθρίων (picotiter plates), κατά την οποία κάθε φορά που ενσωματώνεται ένα καινούριο νουκλεοτίδιο, η σουλφουρυλάση του ATP μετατρέπει το πυροφωσφορικό σε ATP, το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για την πρωτεΐνη λουσιφεράση. Έτσι, εξαιτίας της λουσιφεράσης παράγεται φως

το οποίο μετρείται σε πραγματικό χρόνο με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και έτσι είναι δυνατή η αλληλούχιση του DNA (Heather & Chain, 2016).

Το πρώτο μοντέλο του συστήματος 454 είχε τη δυνατότητα να διαβάσει αλληλουχίες μήκους 400-500 bp, ενώ το τελευταίο μπορεί να διαβάσει έως και 1 εκατομμύριο βάσεις με μήκος αλληλουχιών έως και 1000 bp ανά κύκλο λειτουργίας. Όμως, ένα σημαντικό μειονέκτημά του είναι η αδυναμία ανάγνωσης των ομοπολυμερών. Ειδικότερα, αντιμετωπίζει δυσκολία στον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού των ίδιων νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται διαδοχικά, λόγω της μη γραμμικότητας που παρατηρείται μεταξύ του παραγόμενου σήματος και του μήκους των ομοπολυμερών κατά την ενσωμάτωση περισσότερων από 3-4 νουκλεοτιδίων (Xuan et al., 2013). Επίσης, τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για τη λειτουργία του είναι ιδιαίτερα ακριβά και η απόδοση χαμηλή (Thermes, 2014).

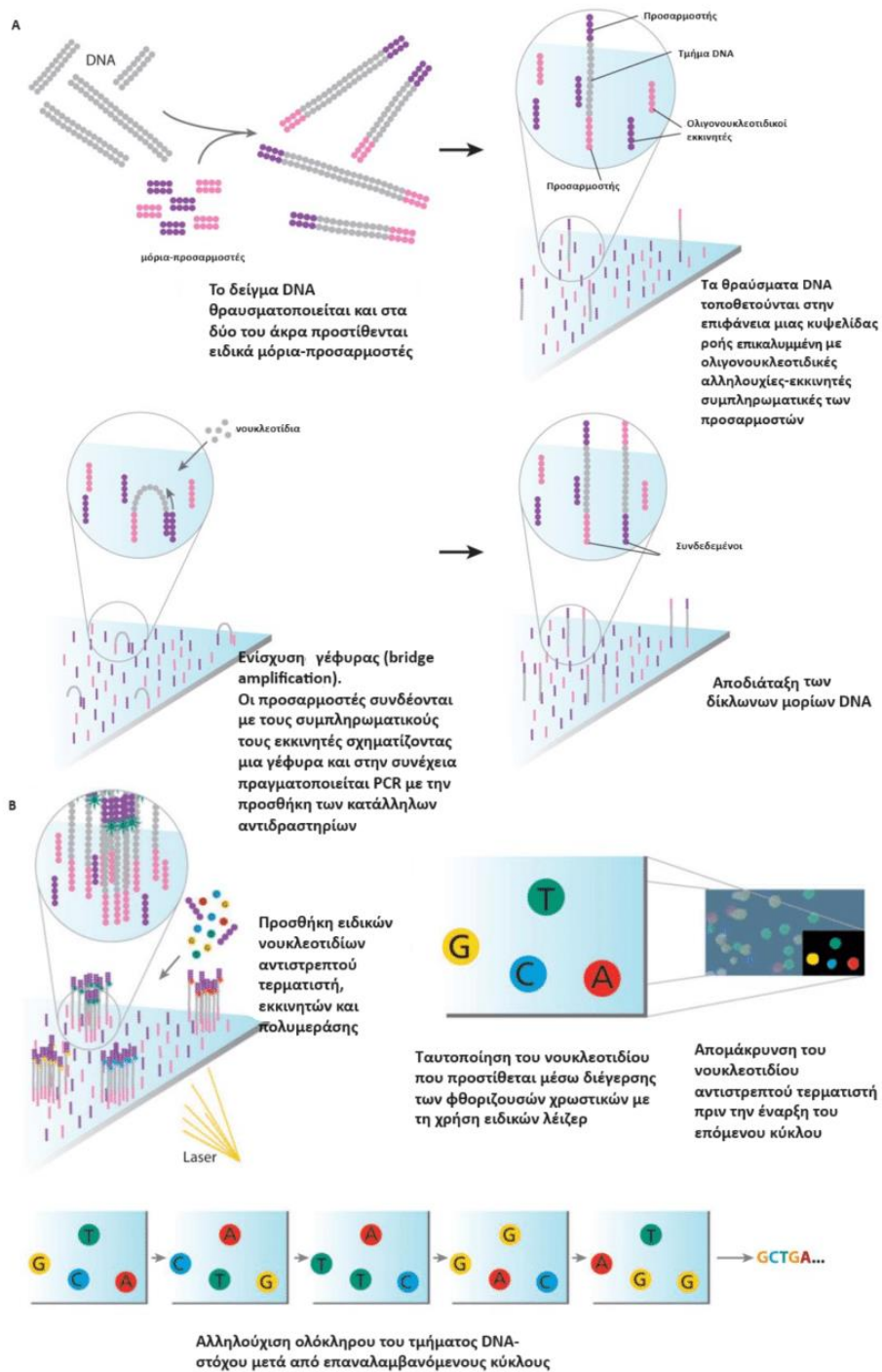


Εικόνα 3. Μέθοδος αλληλούχισης Roche 454. Το δίκλωνο DNA θραυσματοποιείται και γίνεται αποδιάταξη του σε μονόκλινα τμήματα, καθένα από τα οποία συνδέεται με μόρια-προσαρμοστές στα άκρα του. Κάθε θραύσμα DNA ενώνεται με σφαιρίδια και, μέσω PCR σε γαλάκτωμα, γίνεται παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πυροαλληλούχιση σε ειδικά μικροβοθρία (Προσαρμογή από Verma et al., 2017).

2.2.1.2 Illumina

Τα βασικά βήματα της τεχνολογίας αλληλούχισης της Illumina είναι 3: ενίσχυση, αλληλούχιση και ανάλυση. Αρχικά, το DNA θραυσατοποιείται και μόρια-προσαρμοστές προστίθενται στα δύο άκρα των θραυσμάτων. Στη συνέχεια τα θραύσματα τοποθετούνται στην επιφάνεια μιας κυψελίδας ροής η οποία είναι επικαλυμμένη με ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες συμπληρωματικές των μορίων-προσαρμοστών. Επειδή κάθε θραύσμα DNA έχει δύο διαφορετικούς προσαρμοστές, έναν στο κάθε άκρο του, κάθε προσαρμοστής συνδέεται με διαφορετικό ολιγονουκλεοτίδιο, ανάλογα με τη συμπληρωματικότητά τους, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας «γέφυρας». Στη συνέχεια μέσα στην κυψελίδα προστίθενται DNA πολυμεράση και νουκλεοτίδια, και πραγματοποιείται PCR, κατά την οποία παράγεται ο συμπληρωματικός κλώνος της αλυσίδας. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ενίσχυση γέφυρας (bridge amplification) (Pettersson et al., 2009). Κατά το επόμενο στάδιο γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA και προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες, η καθεμία από τις οποίες έχει υβριδίσει διαφορετικό ολιγονουκλεοτίδιο της κυψελίδας, που θα λειτουργήσουν ως πρότυπα για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης γέφυρας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται διαρκώς με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία εκατομμυρίων ομάδων ή συστάδων (clusters) δίκλωνου DNA σε κάθε κανάλι της κυψελίδας ροής (Pereira et al., 2020). Μια κυψελίδα ροής περιέχει 8 κανάλια, καθένα από τα οποία μπορεί να περιέχει την ίδια ή διαφορετική βιβλιοθήκη DNA, ή και συνδυασμό τους.

Η μέθοδος αλληλούχισης της Illumina είναι μια μέθοδος αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (Sequencing by Synthesis, SBS), κατά την οποία χρησιμοποιούνται ειδικά νουκλεοτίδια αντιστρεπτού τερματιστή (reversible terminator dNTPs). Αυτά τα dNTPs είναι σημασμένα με ειδική φθορίζουσα χρωστική, διαφορετική για κάθε βάση, ενώ το -OH στο 3' άκρο τους είναι χημικά τροποποιημένο με τέτοιο τρόπο ώστε η ενσωμάτωση ενός dNTP στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα να εμποδίζει την ενσωμάτωση δεύτερου dNTP και να σημάνει τον τερματισμό της σύνθεσής της (Mardis, 2008). Η ταυτοποίηση του dNTP που προστίθεται κάθε φορά γίνεται με ανιχνευτές συζευγμένου φορτίου (Charge-coupled device, CCD), μέσω διέγερσης των φθορίζουσών χρωστικών με τη χρήση ειδικών λέιζερ, και στο τέλος τα dNTP απομακρύνονται με ενζυμικό τρόπο έτσι ώστε να ακολουθήσει ένας νέος κύκλος (**Εικόνα 4**) (Heather & Chain, 2016).



Εικόνα 4. Μέθοδος αλληλούχισης Illumina. Α. Το DNA θραυσατοποιείται και ενώνεται με ειδικά μόρια-προσαρμοστές τα οποία, όταν τα θραύσματα τοποθετηθούν σε κυψελίδα ροής επικαλυμμένη με ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, συνδέονται μαζί τους με βάση τη συμπληρωματικότητά τους. Έτσι πραγματοποιείται PCR με τη μέθοδο ενίσχυσης γέφυρας και στο τέλος το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται για την έναρξη ενός νέου κύκλου. Β. Όταν στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα προστίθεται νουκλεοτίδιο αντιστρεπτού τερματιστή, η σύνθεση της αλυσίδας τερματίζεται και το νουκλεοτίδιο

ταυτοποιείται μέσω διέγερσης των φθορίζουσών χρωστικών με τη χρήση ειδικών λέιζερ. Έπειτα, μέσω ειδικών χημικών ουσιών, γίνεται απομάκρυνση του νουκλεοτιδίου αντιστρεπτού τερματιστή, για να είναι δυνατή η έναρξη ενός καινούριου κύκλου (Προσαρμογή από *Mardis, 2008*).

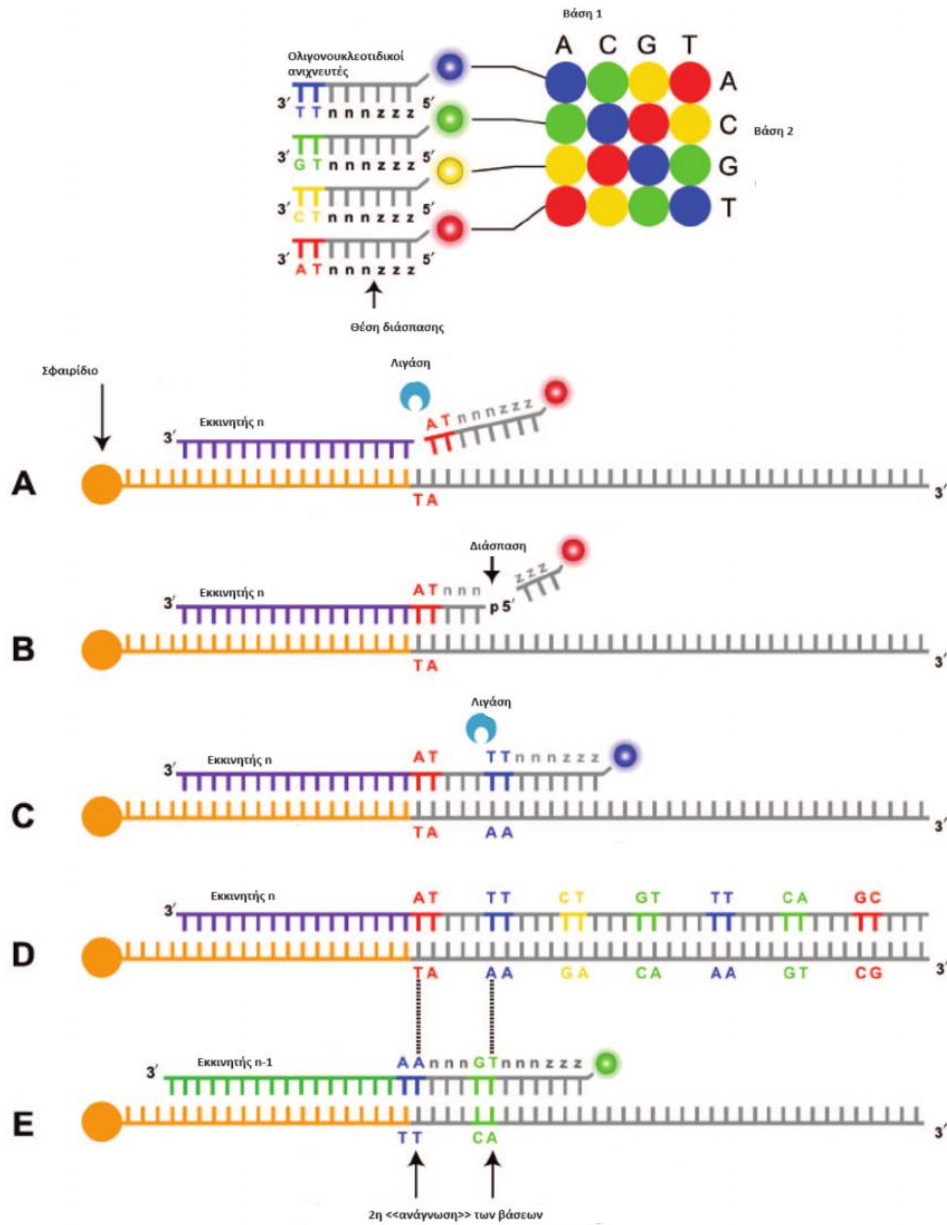
Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνολογίας Illumina είναι η δυνατότητα αλληλούχισης τύπου paired-end, δηλαδή η αλληλούχιση ενός μορίου DNA και από τις δύο κατευθύνσεις μιας αλυσίδας, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη αποτελεσμάτων μεγαλύτερης ποιότητας και ακρίβειας (Hu et al., 2021). Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς καθώς προσφέρει την υψηλότερη απόδοση με το χαμηλότερο κόστος. Κάποια από τα μειονεκτήματά της είναι η δυσκολία της φόρτωσης του δείγματος και η προϋπόθεση ότι τα δείγματα θα έχουν πολύπλοκες αλληλουχίες (Thermes, 2014).

2.2.1.3 SOLiD

Η εταιρεία Applied Biosystems ανέπτυξε μια καινούρια μέθοδο αλληλούχισης, η οποία διέφερε από τις άλλες της 2ης γενιάς, καθώς αντί για αλληλούχιση μέσω SBS βασιζόταν στην αλληλούχιση μέσω σύνθεσης με λιγάση. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε με βάση προηγούμενες ανακαλύψεις που είχαν γίνει από την ομάδα του George Church (Heather & Chain, 2016).

Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης γίνεται με PCR σε γαλάκτωμα και η αλληλούχιση με την βοήθεια του ενζύμου της DNA λιγάσης. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ειδικοί 8-μερείς ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, ο καθένας από τους οποίους αποτελείται από έναν συνδυασμό δύο βάσεων (AG, GA, TC, CT) και εκπέμπει ειδικό φθορίζον χρώμα για κάθε συνδυασμό. Ο εκκινητής συνδέεται με έναν ανιχνευτή με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων τους και έτσι ξεκινάει η διαδικασία της αλληλούχισης με τη βοήθεια της DNA λιγάσης. Τα δινουκλεοτίδια διαβάζονται ανά 5 βάσεις σε κάθε κύκλο, έτσι μετά από 5 κύκλους κάθε νουκλεοτίδιο έχει διαβαστεί 2 φορές από 2 διαφορετικά φθορίζοντα σήματα (**Εικόνα 5**). Αυτός είναι ο λόγος που η μέθοδος SOLiD έχει το μικρότερο ποσοστό λαθών σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, αλλά παρουσιάζει το μειονέκτημα της αντικατάστασης νουκλεοτιδίων, δηλαδή υπάρχει ο κίνδυνος κατά την αλληλούχιση του DNA ο αναλυτής να

κάνει λάθος κατά την ανάγνωση και να αντικαταστήσει μια βάση με κάποια άλλη (Xuan et al., 2013).

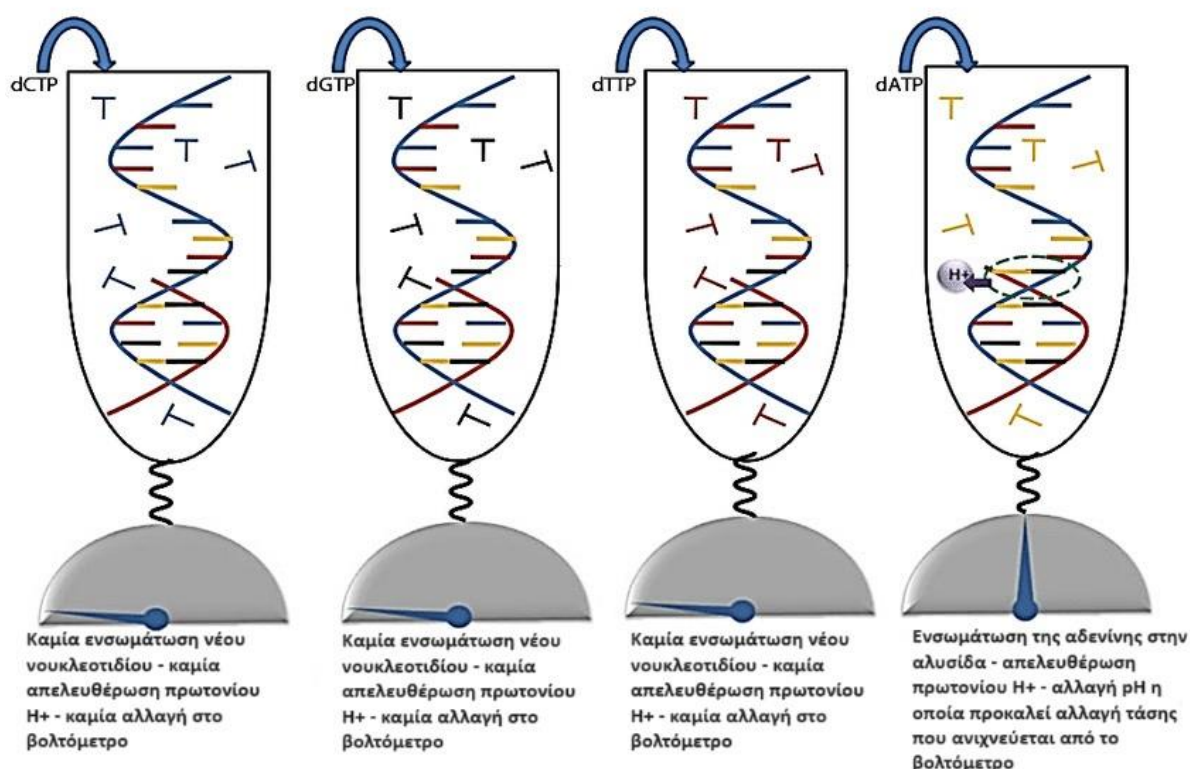


Εικόνα 5. Μέθοδος αλληλούχισης SOLiD. Κάθε οκταμερής ανιχνευτής αποτελείται από διμερή βάσεων που εκπέμπουν ειδικό φθορίζον χρώμα. Ο ανιχνευτής συνδέεται πάνω στο DNA εκμαγείο με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας και η DNA λιγάση τον συνδέει με τον εκκινητή. Στη συνέχεια γίνεται διάσπασή του κατά την οποία εκπέμπεται φθορίζον χρώμα. Έπειτα, προστίθεται νέος ανιχνευτής και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Κατά τον 2ο γύρο ανάγνωσης ο νέος εκκινητής είναι μετατοπισμένος κατά 1 βάση, με αποτέλεσμα τελικά κάθε νουκλεοτίδιο να έχει διαβαστεί δύο φορές από δύο διαφορετικούς ανιχνευτές [Προσαρμογή από (Voelkerding et al., 2009)].

2.2.1.4 Ion Torrent

Η Ion Torrent το 2010 παρουσίασε έναν καινούριο τρόπο αλληλούχισης, την αλληλούχιση μέσω ημιαγωγού ιόντων. Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης γίνεται με PCR σε γαλάκτωμα, και στη συνέχεια τα σφαιρίδια μεταφέρονται σε μικροβοθρία πάνω σε μια συστοιχία ημιαγωγού, το CMOS chip. Κατά τη σύνθεση του DNA, κάθε φορά που ένα καινούριο νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στην αλυσίδα απελευθερώνεται ένα πρωτόνιο H^+ . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του pH η οποία μετρείται από τον ημιαγωγό ιόντων ως αλλαγή τάσης και μεταφράζεται σε νουκλεοτιδική αλληλουχία (**Εικόνα 6**) (Pereira et al., 2020).

Το σύστημα Ion torrent πλεονεκτεί στο ότι δεν χρειάζεται κάμερα, πηγή φωτός ή κάποιου είδους σαρωτή για την ανίχνευση των νουκλεοτιδίων, κάτι που κάνει τη διαδικασία πολύ πιο γρήγορη (Slatko et al., 2018). Ωστόσο, όπως και στο σύστημα Roche, παρατηρείται δυσκολία στην αλληλούχιση ομοπολυμερών. Όταν γίνεται επαναλαμβανόμενη ενσωμάτωση του ίδιου νουκλεοτιδίου πολλές φορές, το σύστημα δυσκολεύεται να μετρήσει σωστά την αλλαγή της τάσης, με αποτέλεσμα στην τελική αλληλουχία να υπάρχουν ενθέσεις ή απαλοιφές βάσεων (Hu et al., 2021).



Εικόνα 6. Μέθοδος αλληλούχισης Ion Torrent. Όταν προστίθενται στο δείγμα νουκλεοτίδια μη

συμπληρωματικά της αλληλουχίας-στόχου δεν γίνεται ενσωμάτωση τους στην αλυσίδα, και άρα δεν απελευθερώνεται κανένα πρωτόνιο και δεν υπάρχει μεταβολή τάσης. Όταν γίνεται προσθήκη συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου, ενσωματώνεται στην αλυσίδα και ταυτόχρονα απελευθερώνεται ένα πρωτόνιο H^+ , το οποίο προκαλεί μεταβολή του pH η οποία μετρείται ως μεταβολή τάσης από το βολτόμετρο (Προσαρμογή από Verma et al., 2017).

2.2.2 Μέθοδοι αλληλούχισης 3ης γενιάς

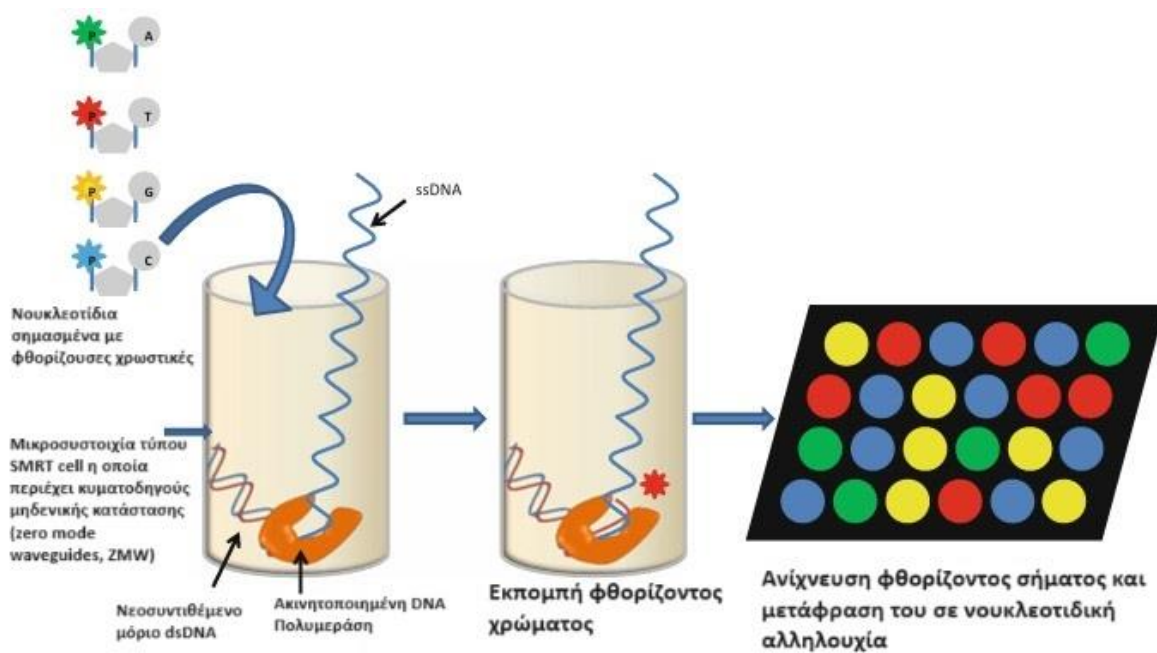
Το κύριο χαρακτηριστικό που κάνει τις τεχνολογίες αλληλούχισης 3ης γενιάς να διαφέρουν από αυτές της 2ης είναι η δυνατότητα αλληλούχισης ενός μορίου DNA χωρίς να χρειάζεται να γίνει ενίσχυσή του (Single Molecule Sequencing, SMS). Άρα δεν υπάρχει η ανάγκη του βήματος της PCR και ο χρόνος προετοιμασίας του DNA μειώνεται σημαντικά. Επίσης οι τεχνολογίες αλληλούχισης 3ης γενιάς έχουν τη δυνατότητα αλληλούχισης DNA μήκους χιλιάδων βάσεων ανά κύκλο λειτουργίας, καθώς και τη δυνατότητα ανίχνευσης του σήματος σε πραγματικό χρόνο. Οι δύο κύριες τεχνολογίες αλληλούχισης 3ης γενιάς είναι η SMRT της Pacific Bioscience και η Nanopore sequencing της Oxford Nanopore Technologies (L. Liu et al., 2012).

2.2.2.1 Μονομοριακή αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο - Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT)

Η τεχνολογία αλληλούχισης SMRT παρουσιάστηκε πρώτη φορά από την εταιρεία Pacific Biosciences στην αρχή της δεκαετίας του 2010. Προσαρμοστές SMRTbell τοποθετούνται στα δύο άκρα του DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί δημιουργώντας ένα κυκλικό μονόκλωνο DNA που ονομάζεται εκμαγείο SMRTbell (SMRTbell template). Η αλληλούχιση πραγματοποιείται σε μια μικροσυστοιχία τύπου SMRT cell η οποία περιέχει μικρούς πόρους που ονομάζονται κυματοδηγοί μηδενικής κατάστασης (zero mode waveguide, ZMW) μέσα στους οποίους βρίσκεται ακινητοποιημένη μια DNA πολυμεράση. Το κάθε νουκλεοτίδιο που χρησιμοποιεί η πολυμεράση εκπέμπει διαφορετικό φθορίζον χρώμα όταν ενσωματωθεί στην αλυσίδα, και το σήμα αυτό μετρείται και «μεταφράζεται» σε νουκλεοτιδική αλληλουχία (**Εικόνα 7**) (Hu et al., 2021).

Τα μηχανήματα SMRT μπορούν να παράγουν 10gb πληροφοριών ανά κύκλο λειτουργίας διαβάζοντας περισσότερα από 15.000 έως και πάνω από 100.000 νουκλεοτίδια (Levy &

Boone, 2019). Όμως παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό λαθών, μεγάλο κόστος και χαμηλή ακρίβεια σε σύγκριση με τις τεχνολογίες 2ης γενιάς (Pereira et al., 2020).



Εικόνα 7. Μέθοδος αλληλούχισης SMRT. Η DNA πολυμεράση βρίσκεται ακινητοποιημένη σε μικροσυστοιχία SMRT cell που περιέχει κυματοδηγούς μηδενικής κατάστασης. Κάθε νουκλεοτίδιο είναι σημασμένο με ειδική φθορίζουσα χρωστική και κάθε φορά που γίνεται ενσωμάτωσή του στην αλυσίδα εκπέμπεται ειδικό φθορίζον χρώμα το οποίο ανιχνεύεται και «μεταφράζεται» σε νουκλεοτιδική αλληλουχία (Προσαρμογή από Verma et al., 2017).

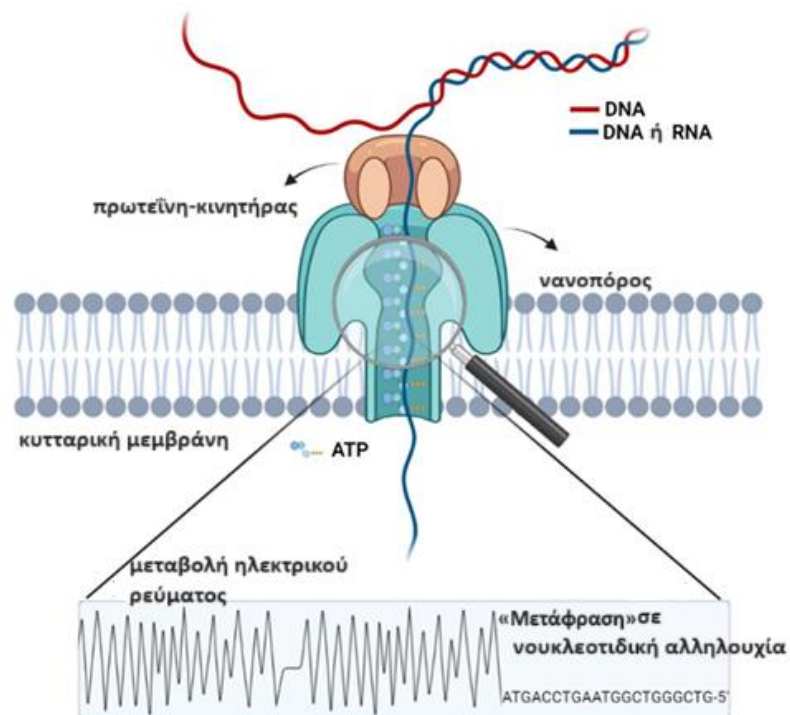
2.2.2.2 Αλληλούχιση με τη χρήση νανοπόρων - Nanopore sequencing

Η ιδέα της αλληλούχισης του DNA με τη χρήση νανοπόρων αναφέρθηκε πρώτη φορά την δεκαετία του 1980 από τον David Deamer, αλλά το πρώτο μηχάνημα που χρησιμοποίησε αυτή την τεχνολογία κυκλοφόρησε το 2014 από την εταιρεία Oxford Nanopore. Το σύστημα αυτό βασίζεται στην αλλαγή που παρατηρείται στο ηλεκτρικό ρεύμα όταν νουκλεϊκά οξέα διέρχονται από νανοπόρους. Οι νανοπόροι είναι μικροσκοπικά κανάλια στο κέντρο πρωτεϊνών που βρίσκονται επάνω σε μια μεμβράνη. Το DNA που πρόκειται να αλληλουχηθεί διασπάται και ένας κλώνος του διέρχεται με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης-κινητήρα μέσα από τον νανοπόρο. Αυτό οδηγεί σε μεταβολή του ηλεκτρικού ρεύματος η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε νουκλεοτίδιο, άρα μπορεί να «μεταφραστεί» σε νουκλεοτιδική αλληλουχία (base calling) (**Εικόνα 8**). Τα συστήματα Oxford Nanopore Technologies

ανιχνεύουν k-μερή (k-mers), δηλαδή αλληλουχίες 5 βάσεων, και όχι ξεχωριστά κάθε βάση (Athanasopoulou et al., 2022).

Η πρώτη πλατφόρμα ONT MiniION μπορεί να αλληλουχεί εκατοντάδες χιλιάδες βάσεις, παράγοντας πληροφορίες μεγέθους 10gb μέσα σε 48 ώρες (Levy & Boone, 2019). Νεότερα μηχανήματα παράγουν πληροφορίες ακόμα μεγαλύτερου μεγέθους. Το GridION MK1 που κυκλοφόρησε το 2017 επιτρέπει την παράλληλη πραγματοποίηση μέχρι 5 πειραμάτων και παράγει πληροφορίες 150gb, ενώ με το PromethION 48 παράγονται μέχρι και 7,6 TB πληροφορίας (Pereira et al., 2020).

Το κύριο μειονέκτημα που παρουσιάζουν είναι το μεγάλο ποσοστό λαθών 2-15%, το οποίο οφείλεται στη δυσκολία του συστήματος να διακρίνει το σήμα που προέρχεται από τις βάσεις του DNA σε σχέση με το σήμα άλλων συστατικών της αντίδρασης (Hu et al., 2021).



Εικόνα 8. Μέθοδος αλληλούχισης με τη χρήση νανοπόρων. Το μονόκλωνο DNA ή RNA με τη βοήθεια μια πρωτεΐνης-κινητήρα διέρχεται μέσα από έναν νανοπόρο, δημιουργώντας μεταβολή στο ηλεκτρικό ρεύμα. Η μεταβολή αυτή είναι χαρακτηριστική για κάθε νουκλεοτίδιο με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η «μετάφραση» της σε νουκλεοτιδική αλληλουχία (Προσαρμογή από Athanasopoulou et al., 2022).

2.2.3. Είδη αλληλούχισης NGS που χρησιμοποιούνται στα κλινικά εργαστήρια

2.2.3.1 Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος - Whole genome sequencing (WGS)

Με τη μέθοδο WGS γίνεται αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού και εκατομμύρια θραύσματα γενετικού υλικού διαβάζονται παράλληλα. Προσφέρει τη δυνατότητα λεπτομερούς ταυτοποίησης ολόκληρου του γενετικού υποβάθρου ενός ασθενή, συμπεριλαμβανομένων κωδικοποιητικών και μη περιοχών. Μπορεί να ανιχνεύσει πολλές γενετικές παραλλαγές που ποικίλλουν από μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms, SNPs) μέχρι ενθέσεις, απαλοιφές και αναδιατάξεις πολλών νουκλεοτιδίων. Το αποτέλεσμα μπορεί να ερμηνευτεί με 3 τρόπους. Ο πρώτος είναι η συναρμολόγηση ως προς κάποιο γονιδίωμα αναφοράς (reference assembly), με την οποία τα κομμάτια DNA αντιστοιχίζονται σε ήδη γνωστά γονιδιώματα αναφοράς. Ο δεύτερος είναι η συναρμολόγηση εξ' αρχής (de novo assembly), όπου τα κομμάτια DNA συναρμολογούνται σε συνεχή αλληλουχιών (contigs), και ο τρίτος, ο οποίος είναι και ο πιο αποτελεσματικός είναι ένας συνδυασμός των προηγούμενων δύο, όπου αρχικά δημιουργούνται συνεχή αλληλουχιών και ύστερα αντιστοιχίζονται σε γνωστά γονιδιώματα (Hilt & Ferrieri, 2022; Satam et al., 2023).

2.2.3.2 Αλληλούχιση ολόκληρων των εξωνίων - Whole exome sequencing (WES)

Με τη μέθοδο WES γίνεται αλληλούχιση μόνο των εξωνίων ενός γονιδιώματος, δηλαδή των περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν μόνο το 2% ολόκληρου του γονιδιώματος ενός ανθρώπου. Η μέθοδος αυτή βοηθάει στην ανίχνευση πολλών γενετικών παραλλαγών όπως μονονουκλεοτιδικές παραλλαγές (single nucleotide variants, SNVs), ενθέσεις και απαλοιφές νουκλεοτιδίων, και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (copy number variations, CNVs), δηλαδή επανάληψη ή απαλοιφή τμήματος ενός χρωμοσώματος που συμπίπτει με κωδικοποιητικές περιοχές των γονιδίων. Αποτελεί μια πιο οικονομική τεχνική σε σύγκριση με την WGS, ιδιαίτερα χρήσιμη στη μελέτη σπάνιων ασθενειών καθώς και της γενετικής του καρκίνου. Η διαδικασία περιλαμβάνει ενίσχυση των εξωνίων μέσω αλληλούχισης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων η οποία γίνεται όπως και στην WGS (Satam et al., 2023).

2.2.3.3 Στοχευμένη αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Targeted next generation sequencing (tNGS)

Η μέθοδος tNGS χρησιμοποιείται για την αλληλούχιση ενός συγκεκριμένου γονιδίου-στόχου. Αφού το DNA απομονωθεί από ένα κλινικό δείγμα υφίσταται ενίσχυση με PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών που στοχεύουν στο συγκεκριμένο γονίδιο. Στη συνέχεια γίνεται η ταυτοποίηση του οργανισμού με τη βοήθεια ειδικών βάσεων δεδομένων (Boers et al., 2019). Χρησιμοποιούνται ειδικά πάνελ tNGS τα οποία περιέχουν ήδη γνωστές αλληλουχίες και στοχεύουν είτε έναν συγκεκριμένο οργανισμό είτε πολλαπλούς, όπως για παράδειγμα βακτήρια, ευκαρυωτικούς οργανισμούς αλλά και ιούς. Είναι μια μέθοδος με αυξημένη ευαισθησία και εξειδίκευση, όμως μειονεκτεί ως προς το ότι μπορεί να ανιχνεύσει μόνο γονίδια που είναι ήδη γνωστά, άρα αν ο οργανισμός-στόχος δεν υπάρχει στις βάσεις δεδομένων τότε η ταυτοποίησή του δεν είναι δυνατή (Boers et al., 2019; Zhong et al., 2020).

2.2.3.4 Μεταγονιδιωματική αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Metagenomic next generation sequencing (mNGS)

Με τις μεθόδους αλληλούχισης mNGS γίνεται αλληλούχιση όλων των γενετικών υλικών που συμπεριλαμβάνονται σε ένα δείγμα, όπως είναι το γενετικό υλικό του ασθενή, μικροοργανισμοί της φυσικής χλωρίδας και γενετικό υλικό από επιμολύνσεις. Είναι μια μέθοδος ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση των λοιμώξεων. Για να γίνει πιο ακριβής η ταυτοποίηση του οργανισμού-στόχου γίνεται καθαρισμός του δείγματος από ανεπιθύμητα νουκλεϊκά οξέα, είτε πριν την αλληλούχιση είτε μετά (Rodino & Simner, 2024). Η μέθοδος αυτή προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών γενετικών υλικών σε ένα δείγμα και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν τεστ που είναι περισσότερο στοχευμένα αποδεικνύονται αναποτελεσματικά, καθώς και στην περίπτωση που το επιθυμητό DNA-στόχος υπάρχει σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Zhong et al., 2020).

3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς στη διάγνωση και αντιμετώπιση ανθρώπινων ασθενειών

3.1.1 Κιτ NGS

Οι τεχνολογίες NGS προσφέρουν τη δυνατότητα αλληλούχισης γονιδιωμάτων τόσο του ανθρώπου όσο και μικροοργανισμών, και με τη χρήση τους έχουν αναπτυχθεί ειδικά κιτ αλληλούχισης γενετικού υλικού.

Ένα παράδειγμα είναι το Nextera XT DNA Library Preparation Kit της εταιρείας Illumina, με το οποίο είναι δυνατή η αλληλούχιση μικρών γονιδιωμάτων, αμπλικονίων PCR, πλασμιδίων, μικροβιακών γονιδιωμάτων και cDNA σε δείγματα με ελάχιστη ποσότητα DNA 1ng. Με τη χρήση του μπορεί να γίνει κατασκευή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης μεγέθους 300bp-1.5kb (*Nextera XT DNA Library Prep Kit | Sequence Small Genomes, Plasmids, CDNA, n.d.*).

Το illumina DNA prep της ίδια εταιρείας δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας βιβλιοθήκης ~350bp από δείγματα αίματος και σάλιου με ελάχιστη ποσότητα DNA 500ng για μικρά γονιδιώματα, όπως εκείνα που προέρχονται από μικροοργανισμούς και 100-500ng DNA για μεγάλα γονιδιώματα, όπως ο άνθρωπος (*Illumina DNA Prep | Flexibility for Many Genome Sequencing Applications, n.d.*).

Η εταιρεία ThermoFisher Scientific έχει αναπτύξει το MuSeek Library Preparation Kit με το οποίο γίνεται αλληλούχιση γονιδιωματικού DNA, βακτηριακού DNA και αμπλικονίων από δείγματα αίματος ελάχιστης ποσότητας DNA 50ng και κατασκευή βιβλιοθήκης 300-800bp (*MuSeek Library Preparation Kit, Illumina Compatible, n.d.*).

Ακόμη, το KAPA HyperPlus kit της Roche δίνει την δυνατότητα αλληλούχισης DNA ελάχιστης ποσότητας 1ng-1μg από δείγματα αίματος και ιστών ενσωματωμένων σε παραφίνη και δημιουργίας βιβλιοθήκης 150-800bp (*KAPA HyperPlus Kits, n.d.*)

3.1.2 Βάσεις δεδομένων

Έχουν δημιουργηθεί παγκόσμιοι οργανισμοί, οι οποίοι έχουν αναλάβει τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση νόσων και την κατηγοριοποίησή τους ανάλογα με τη σοβαρότητά τους σε ειδικές βάσεις δεδομένων.

Η βάση δεδομένων του Συνασπισμού Γονιδιακής Επιμέλειας - Gene Curation Coalition (GenCC) δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να προσφέρουν νέες πληροφορίες όσον αφορά τη σύνδεση γονιδίων με την παθογένεση συγκεκριμένων νόσων, όπως προκύπτει από τις έρευνές τους. Τα γονίδια που εμφανίζονται στην πλατφόρμα χωρίζονται σε 8 κατηγορίες ανάλογα με τη σύνδεσή τους με την εμφάνιση κάποιας πάθησης. Η σχέση που μπορεί να έχουν είναι: οριστική (definite), ισχυρή (strong), μέτρια (moderate), υποστηρικτική (supportive), περιορισμένη (limited), διαταραγμένη (disrupted), διαψευσμένη μόνο σε ζωικό μοντέλο (animal model only refuted) και μη γνωστή σχέση (no known disease relationship) με εμφάνιση νόσου. Σε αυτή τη βάση δεδομένων περιέχονται πληροφορίες για περισσότερα από 4.000 γονίδια (*GenCC Genes with Classifications*, n.d.).

Η Clinical Variant database (ClinVar) είναι άλλη μια βάση δεδομένων η οποία κατηγοριοποιεί μεταλλαγές γονιδίων ανάλογα με τη σύνδεσή τους με παθήσεις. Η κατηγοριοποίηση έχει ως εξής: παθογενής (pathogenic, P), πιθανώς παθογενής (Likely pathogenic, LP), παραλλαγή αγνώστου κλινικής σημασίας (Variant of uncertain significance, -VUS), πιθανά καλοήθης (Likely benign, LB) , καλοήθης (Benign) (*Representation of Classifications in ClinVar*, n.d.).

Ακόμη, στην Human Gene Mutation Database (HGMD) γίνεται συλλογή δεδομένων σχετικά με γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με κληρονομικές ασθένειες. Περιέχει πληροφορίες σχετικές με τις θέσεις των μεταλλαγών, τα είδη μεταλλαγών, τους φαινότυπους, την εκτίμηση παθογένειας και την συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό (Stenson et al., 2020).

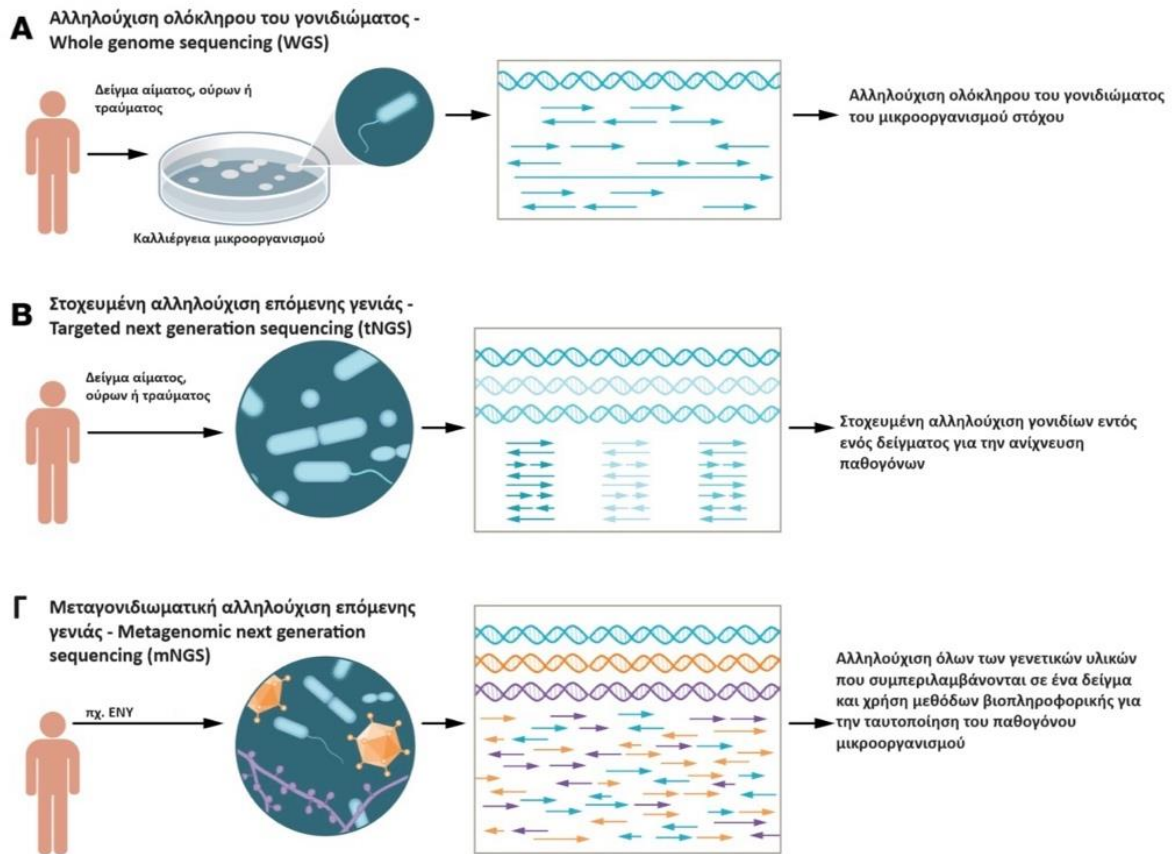
Επίσης, η Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) βάση δεδομένων περιέχει πληροφορίες σχετικά με την σχέση μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου για περισσότερα από 16000 γονίδια σχετιζόμενα με γενετικά νοσήματα μενδελιανής κληρονομικότητας (Home - OMIM, n.d.).

3.1.3 Λοιμώξεις

Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι πολύ σημαντική για την έγκαιρη διάγνωση και κατάλληλη αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται στα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια είναι η καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Όμως, πολλοί οργανισμοί απαιτούν συνθήκες ανάπτυξης οι οποίες είναι

δύσκολο να αναπαραχθούν στο εργαστήριο, ενώ ορισμένοι δεν αναπτύσσονται σε καλλιέργειες ή αναπτύσσονται με πολύ αργούς ρυθμούς, με αποτέλεσμα να καθυστερεί και η θεραπεία της λοίμωξης.

Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα μπορούν να δώσουν μέθοδοι που βασίζονται σε τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Boers et al., 2019). Η ανίχνευση μικροοργανισμών σε ένα δείγμα μπορεί να γίνει με τη χρήση WGS, tNGS ή mNGS (Εικόνα 9). Η πιο χρήσιμη μέθοδος είναι η mNGS, καθώς οι πληροφορίες που αντλούνται, οι οποίες μπορούν να είναι ποσοτικές και ημιποσοτικές, βοηθούν στην ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών, στη μελέτη της εξέλιξής τους, στην ταυτοποίησή τους σε επίπεδο γένους και είδους, αλλά και στην πρόβλεψη της αντίστασής τους σε αντιβιοτικά. Επίσης το αποτέλεσμα δεν επηρεάζεται από τη λήψη αντιβιοτικών, άρα αποφεύγεται ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που υπάρχει με την πραγματοποίηση καλλιέργειών για τον ίδιο λόγο (Diao et al., 2022). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου mNGS είναι ότι σε δείγματα τα οποία δεν είναι στείρα, όπως βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις, κόπρανα και αποστήματα, το παθογόνο μπορεί να βρίσκεται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τους λοιπούς μικροοργανισμούς που ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του ασθενή. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος είτε γίνεται συνδυασμός των μεθόδων mNGS και tNGS, είτε χρησιμοποιούνται μέθοδοι κένωσης του ξενιστή (host depletion methods) έτσι ώστε να απομακρυνθεί όσο μεγαλύτερο μέρος του γενετικού υλικού που δεν αντιστοιχεί στο ζητούμενο παθογόνο (W. Gu et al., 2019). Επίσης λόγω των τυχόν επιμολύνσεων τόσο από την χλωρίδα του ασθενή όσο και από το εργαστηριακό περιβάλλον είναι απαραίτητη η συνεκτίμηση των αποτελεσμάτων με την κλινική εικόνα, καθώς κάποια από τα πιο συνηθισμένα βακτήρια που προκαλούν επιμολύνσεις στις μεθόδους αυτές είναι επίσης πολύ συχνά παθογόνα, όπως τα είδη των γενών *Staphylococcus* και *Pseudomonas*, καθώς και τα μικρόβια της τάξης των *Enterobacterales* (Rodino & Simner, 2024). Οι μέθοδοι NGS, κυρίως οι mNGS, έχουν βοηθήσει στην ταυτοποίηση παθογόνων και στη διάγνωση λοιμώξεων σε διάφορα συστήματα του ανθρώπου όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα, το κυκλοφορικό, το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό και το οφθαλμικό (W. Gu et al., 2019). Επίσης, δείχθηκε ότι οι μέθοδοι mNGS έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τις καλλιέργειες σε δείγματα υγρού βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης (BALF), αίματος και πτυέλων, κυρίως στην ανίχνευση των *Klebsiella*, CMV και EBV (Duan et al., 2021).



Εικόνα 9. Χρήση μεθόδων NGS για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε βιολογικά υγρά του ανθρώπου. A. Ο μικροοργανισμός απομονώνεται από δείγμα αίματος, ούρων ή τραύματος του ασθενή, καλλιεργείται και γίνεται αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματός του μέσω WGS. B. Μέσω tNGS γίνεται άμεση και στοχευμένη αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδίων-ενδιαφέροντος ενός μικροοργανισμού σε δείγματα αίματος, ούρων ή τραύματος ασθενών. Γ. Η mNGS δίνει τη δυνατότητα αλληλούχισης όλων των νουκλεϊκών οξέων που συμπεριλαμβάνονται σε δείγμα ασθενή (πχ. ENY) και η ταυτοποίηση του μικροοργανισμού γίνεται με τη χρήση ειδικών βάσεων δεδομένων NGS [Προσαρμογή από (Rodino & Simner, 2024)].

3.1.3.1 Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος

Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, κυρίως του κατώτερου αναπνευστικού (Lower Respiratory Track Infections-LRTI) αποτελούν έναν από τους κύριους λόγους θνητότητας σε χώρες χαμηλού βιοτικού επιπέδου. Η πνευμονία συγκεκριμένα είναι η μόνη ασθένεια που οφείλεται σε λοιμογόνο παράγοντα η οποία βρίσκεται ανάμεσα στις κορυφαίες 10 αιτίες θανάτου στον ανεπτυγμένο κόσμο με 3,2 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως. Η

καθυστέρηση στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού που αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα των LRTI δυσκολεύει και καθυστερεί την έγκαιρη χορήγηση στοχευμένης θεραπείας για την αντιμετώπιση της λοίμωξης, ενώ οδηγεί σε επιδείνωση των συμπτωμάτων, μέχρι και στον θάνατο (Zheng et al., 2021). Η χρήση των μεθόδων NGS, κυρίως της mNGS έχει βοηθήσει σημαντικά στην έγκαιρη και σωστή διάγνωση των LRTI.

Οι μέθοδοι mNGS έχουν μεγάλη διαγνωστική αξία στην ανίχνευση παθογόνων σε δείγμα υγρού βρογχοκυψελιδικής έκπλυσης από ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού, και ιδιαίτερα σε εκείνους που βρίσκονται σε κρίσιμη κατάσταση και σε ανοσοκατεσταλμένους. Για ασθενείς σε σοβαρή κατάσταση που δεν έχουν λάβει ακόμα διάγνωση μέσω των συμβατικών εργαστηριακών μεθόδων, η χρήση mNGS αποτελεί τρόπο έγκαιρης διάγνωσης και αντιμετώπισης (S. Chen et al., 2022). Ο συνδυασμός των mNGS με τις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους αυξάνει την πιθανότητα ανίχνευσης των μικροοργανισμών στα αρχικά στάδια των λοιμώξεων, ενώ ταυτόχρονα οι mNGS δεν επηρεάζονται από τη χορήγηση αντιβιοτικών που έγινε τους τελευταίους 3 μήνες.

Επίσης, ένα μεγάλο πλεονέκτημα που παρουσιάζουν οι μέθοδοι mNGS είναι η διάγνωση συλλοιμώξεων. Όταν η μέθοδος mNGS χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση πνευμονίας από *Mycobacterium tuberculosis* σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, ήταν η μόνη που κατάφερε να ανιχνεύσει σε 11 ασθενείς συλλοίμωξη από μικροοργανισμούς των ειδών *Aspergillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* και *Pneumocystis* (X. Liu et al., 2021).

Η πνευμονία που προκαλείται από το είδος *Chlamydia psittaci* αποτελεί το 1% των πνευμονιών της κοινότητας. Η διάγνωσή της είναι δύσκολη καθώς έχει μεγάλο χρόνο επώασης και οι καλλιέργειες έχουν χαμηλή απόδοση. Επίσης, στους ορολογικούς ελέγχους μπορεί να υπάρξει διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα είδη της οικογένειας *Chlamydiaceae* και η PCR έχει σχετικά μικρή ευαισθησία. Οι μέθοδοι mNGS μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για τη διάγνωση αυτού του είδους πνευμονίας και να παρέχουν και ημιποσοτικές πληροφορίες όσον αφορά το φορτίο του μικροβίου στον οργανισμό του ασθενή (L. Gu et al., 2020).

Τον Φεβρουάριο του 2020 με τη χρήση mNGS ο νέος κορωνοϊός SARS-CoV-2 που προκάλεσε πνευμονία σε πολλούς ασθενείς ταυτοποιήθηκε μέσα σε 5 μέρες, σε αντίθεση με τις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους που χρειάστηκαν 5 μήνες (Diao et al., 2022). Το

COVIDSeq Assay kit της illumina μπορεί να ανιχνεύσει τον ιό SARS-CoV-2 σε ρινοφαρυγγικά, στοματοφαρυγγικά και ρινικά επιχρίσματα μέσω στοχευμένης αλληλούχισης. Σε έρευνα στην οποία έγινε σύγκριση της χρήσης του COVIDSeq και της χρήσης RT-PCR για την ανίχνευση του ιού δείχτηκε ότι το COVIDSeq κατάφερε να ανιχνεύσει τον ιό σε δείγματα των οποίων τα αποτελέσματα ήταν μη σαφή και αρνητικά μέσω RT-PCR. Επιπλέον το kit αυτό έχει βοηθήσει στη γενετική επιδημιολογία και την παρακολούθηση της εξέλιξης των διαφορετικών μορφών του ιού (Bhoyar et al., 2021).

Η εταιρεία illumina έχει επίσης αναπτύξει το Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση 40 ιών του αναπνευστικού συστήματος όπως ο SARS-CoV-2, οι Influenza A και B, οι αδενοϊοί, οι ρινοϊοί, ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (Respiratory Syncytial Virus, RSV) και άλλοι συχνοί ιοί του αναπνευστικού. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η στοχευμένη αλληλούχιση με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών (probes) και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δείγματα ρινικών επιχρισμάτων και πλύσεων (*Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit | Sensitive Viral Detection*, n.d.).

3.1.3.2 Λοιμώξεις κυκλοφορικού συστήματος

Οι λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος είναι σοβαρές και χρήζουν άμεσης αντιμετώπισης καθώς μπορούν να οδηγήσουν σε σηψαιμία και θάνατο. Τα πιο συχνά παθογόνα που ευθύνονται για αυτές τις λοιμώξεις είναι τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*. Ο κύριος τρόπος με τον οποίο γίνεται η ανίχνευση των μικροοργανισμών στο αίμα είναι η καλλιέργειά τους, μια διαδικασία που είναι πολύ χρονοβόρα. Ένας γρήγορος εναλλακτικός τρόπος διάγνωσης που εξετάζεται είναι η χρήση μεθόδων mNGS.

Με τη χρήση mNGS γίνεται ανάλυση του DNA ελεύθερου κυττάρων (cfDNA) στο πλάσμα των ασθενών. Το cfDNA μπορεί να προέρχεται από βακτήρια, μύκητες, παράσιτα και ιούς και επομένως προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών παθογόνων σε ένα δείγμα. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για ασθενείς που μπορεί να πάσχουν από πολυμικροβιακές λοιμώξεις (Overbeek et al., 2024).

Σε έρευνα όπου έγινε σύγκριση της χρήσης μεθόδων mNGS και καλλιιεργειών αίματος για τη διάγνωση λοιμώξεων του κυκλοφορικού σε παιδιατρικούς ασθενείς, αποδείχθηκε ότι οι

mNGS έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι γρηγορότερες. Πιο συγκεκριμένα, από τους 46 ασθενείς που ελέγχθηκαν, ενώ οι καλλιέργειες αίματος χρειάστηκαν κατά μέσο όρο 3,2 μέρες να ολοκληρωθούν και κατάφεραν να ανιχνεύσουν μικροοργανισμούς μόνο σε 3 ασθενείς, οι μέθοδοι mNGS έδωσαν αποτελέσματα κατά μέσο όρο σε 2,2 μέρες και ανίχνευσαν παθογόνα σε 30 ασθενείς (Nan et al., 2022).

Κατά τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας της χρήσης mNGS και συμβατικών εργαστηριακών μεθόδων για τη διάγνωση λοιμώξεων του αίματος, δείχθηκε ότι οι μέθοδοι mNGS είχαν μεγαλύτερη συνέπεια στην ανίχνευση των ιών Epstein-Barr, Ηπατίτιδας Β και Κυτταρομεγαλοϊού (Qian et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ειδικά τεστ που βασίζονται σε μεθόδους mNGS, τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα και βοηθούν στη διάγνωση λοιμώξεων του κυκλοφορικού συστήματος. Κάποια από αυτά είναι το iDTECT® Blood test και το Karius NGS Plasma Test™ (Peri et al., 2022). Το iDTECT Blood Test της γαλλικής εταιρείας Pathoquest χρησιμοποιείται για τη διάγνωση σηψαιμίας σε δείγματα ολικού αίματος. Μετά την απομόνωση του μικροβιακού νουκλεϊκού οξέος, κατασκευάζεται η βιβλιοθήκη και στο τέλος γίνεται η αλληλούχιση με τη χρήση του συστήματος NGS της Ion Torrent. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με συναρμολόγηση ως προς κάποιο γονιδίωμα αναφοράς. Το τεστ αυτό συνιστάται για χρήση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης περισσότερων από 1200 μικροοργανισμών. Αντίστοιχα, σε δείγματα πλάσματος ασθενών το Karius NGS Plasma Test ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί DNA ελεύθερο κυττάρων (Cell-free DNA, cfDNA) που ελευθερώνεται από τους μικροοργανισμούς και η αλληλούχιση πραγματοποιείται μέσω της τεχνολογίας NGS της illumina. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με ειδικά δείγματα ελέγχου (control) για να καθοριστεί εάν η ποσότητα του μικροοργανισμού που ανιχνεύτηκε είναι κλινικά σημαντική ή όχι. Το τεστ αυτό μπορεί να ανιχνεύει περισσότερα από 1000 παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων, DNA ιών και πρωτοζώων (Moragues-Solanas et al., 2021).

3.1.3.3 Λοιμώξεις νευρικού συστήματος

Μια από τις πρώτες περιπτώσεις όπου η χρήση mNGS βοήθησε στη διάγνωση λοίμωξης που οφειλόταν σε παθογόνο για το οποίο δεν υπήρχαν πληροφορίες, είναι η περίπτωση ενός

εφήβου ο οποίος είχε έντονα συμπτώματα λοίμωξης και εξασθένηση του ανοσοποιητικού του συστήματος αλλά περισσότερα από 40 τεστ που πραγματοποιήθηκαν με συμβατικές μεθόδους, από καλλιέργεια μέχρι PCR, απέτυχαν στην ανίχνευση του παθογόνου. Τη λύση έδωσε η χρήση mNGS με την οποία έγινε ταυτοποιήθηκε επιτυχώς το βακτήριο *Leptospira santarosai* στο ENY του ασθενή και χορηγήθηκε η κατάλληλη αγωγή (Zhong et al., 2020).

Σε μελέτη περιπτώσεων μηνιγγίτιδας και εγκεφαλίτιδας τόσο σε παιδιατρικούς όσο και ενήλικες νοσηλευόμενους ασθενείς, αποδείχθηκε ότι μέσω των μεθόδων NGS για την ανάλυση ENY των ασθενών επιτεύχθηκε σωστή και έγκαιρη διάγνωση σε περιπτώσεις που οι μέθοδοι ρουτίνας του εργαστηρίου απέτυχαν (Wilson et al., 2019).

Οι μέθοδοι mNGS αποδείχτηκαν επίσης αποτελεσματικές στην ακριβή και γρήγορη διάγνωση νοκαρδίωσης του κεντρικού νευρικού συστήματος, με το στέλεχος *Nocardia farcinica* να είναι αυτό που απομονώνεται συχνότερα. Η νοκαρδίωση παρατηρείται πιο συχνά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, και ιδιαίτερα σε αυτούς που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (Yuan et al., 2023).

3.1.3.4 Λοιμώξεις των υπόλοιπων συστημάτων του ανθρώπου

Οι λοιμώξεις των οφθαλμών παραμένουν ένα κύριο αίτιο τύφλωσης παγκοσμίως, γι' αυτό και είναι σημαντική η έγκαιρη διάγνωσή τους. Η χρήση mNGS βοήθησε στην ανίχνευση παθογόνων σε δείγματα υγρού υαλοειδούς, τα οποία ήταν δύσκολο να διαγνωστούν μέσω PCR, όπως είναι το παράσιτο *Toxoplasma gondii*, ο ιός της ερυθράς (*Rubella virus*) και ο μύκητας *Cryptococcus neoformans* (Doan et al., 2016).

Ακόμη, σε λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος, ένα από τα παθογόνα που εντοπίζονται πιο συχνά είναι το *Helicobacter pylori*. Η μέθοδος WGS έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανίχνευση του *H. pylori* σε δείγματα βιοψιών στομάχου σε περιπτώσεις που άλλες συμβατικές μέθοδοι απέτυχαν λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής του (Pohl et al., 2019).

Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος είναι λοιμώξεις που ταλαιπωρούν κυρίως τον ενήλικο πληθυσμό, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στις γυναίκες. Το μεγαλύτερο ποσοστό οφείλεται σε βακτηριακές λοιμώξεις και πιο συγκεκριμένα στα βακτήρια του είδους

Escherichia coli, καθώς σε εκείνα που ανήκουν στα γένη *Enterococcus* και *Staphylococcus*. Όπως αποδείχθηκε, η χρήση NGS και PCR για τη διάγνωση των ουροποιητικών λοιμώξεων παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία σε πολύ μικρότερο χρόνο, σε σύγκριση με την καλλιέργεια των ούρων, που είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνυσή τους. Επιπλέον, οι μέθοδοι NGS προσφέρουν τη δυνατότητα πιο λεπτομερούς ταυτοποίησης του μικροοργανισμού αλλά και ανίχνευσης γονιδίων αντίστασης σε αντιβιοτικά (Zhao et al., 2024).

3.1.3.5 Ανίχνευση γονιδίων αντοχής

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα των μεθόδων NGS είναι η ανίχνευση αντίστασης σε αντιβιοτικά. Με τη μέθοδο WGS γίνεται αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός μικροοργανισμού, συμπεριλαμβανομένων και των πλασμιδίων των βακτηρίων. Έτσι είναι δυνατή η ανίχνευση των γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά που ενδέχεται να διαθέτουν, γεγονός που βοηθάει στη σωστή χορήγηση αντιβιοτικών για θεραπεία (Zhong et al., 2020).

Ο χρόνος που χρειάζεται για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής μέσω μεθόδων NGS μπορεί να είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους, αλλά εκεί που υπερτερούν είναι στην ανίχνευση γονιδίων μικροοργανισμών οι οποίοι χρειάζονται πολύ χρόνο να αναπτυχθούν και η ανάπτυξη είναι δύσκολη στο εργαστήριο, όπως μικροοργανισμοί που ανήκουν στα είδη *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma sp.*, *Ureaplasma sp.* και *Mycobacterium tuberculosis* (Hilt & Ferrieri, 2022).

Όσον αφορά τον HIV η ανίχνευση γονιδίων αντοχής (HIV Drug Resistance, HIVDR) γίνεται κυρίως μέσω αλληλούχισης κατά Sanger. Η μέθοδος αυτή όμως αντιμετωπίζει μεγάλη δυσκολία στην ανίχνευση γενετικών παραλλαγών που υπάρχουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα μπορούν να δώσουν οι μέθοδοι NGS, οι οποίες προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία και αποδοτικότητα με χαμηλό κόστος (Ávila-Ríos et al., 2020).

3.1.4 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια η οποία οφείλεται σε μεταλλάξεις που μπορεί να είναι κληρονομικές καθώς αφορούν κύτταρα της γαμετικής σειράς (germline mutations), να είναι αποτέλεσμα σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του DNA στη φάση της μίτωσης ή να οφείλονται σε έκθεση του οργανισμού σε καρκινογόνες ουσίες. Τα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ενός όγκου είναι δύο τύπων: τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η ενεργοποίηση/ενίσχυση των πρώτων και η έλλειψη/υπολειτουργία των δεύτερων οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επομένως σε ανάπτυξη του όγκου. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι σημειακές ή χρωμοσωμικές σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και τον κυτταρικό θάνατο (Morganti et al., 2019).

3.1.4.1 Πρόγνωση - Διάγνωση

Οι βιοδείκτες αποτελούν ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της ογκολογίας καθώς διευκολύνουν τόσο την πρόγνωση και διάγνωση μιας κακοήθειας, όσο και την αξιολόγησή της και τη σωστή θεραπεία της. Υπάρχουν 2 κατηγορίες βιοδεικτών: προβλεπτικοί (predictive) και προγνωστικοί (prognostic) Οι προγνωστικοί βιοδείκτες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κλινική πορεία της νόσου, ενώ οι προβλεπτικοί δείκτες σχετικά με την απόκριση του όγκου σε μια συγκεκριμένη θεραπεία. Επίσης, οι καρκινικοί δείκτες μπορούν να είναι συγκεκριμένοι για ένα είδος όγκου ή παν-καρκινικοί (Morganti et al., 2019).

Η ανάλυση των βιοδεικτών γινόταν πάντα με τη χρήση μεθόδων αλληλούχισης κατά Sanger και PCR, αλλά οι μέθοδοι αλληλούχισης επόμενης γενιάς προσφέρουν αφενός μεγαλύτερη ακρίβεια αφετέρου δε δυνατότητα ταυτόχρονου ελέγχου μεγάλου αριθμού γονιδίων. Επίσης, μέσω των μεθόδων NGS είναι δυνατή και η διάκριση των μεταλλαγών σε μεταλλαγές-οδηγούς (driver mutations) και μεταλλαγές-επιβάτες (passenger mutations). Οι μεταλλαγές-οδηγοί είναι αυτές οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη του όγκου, και κάποιες από τις πιο συχνά παρατηρούμενες εντοπίζονται στα γονίδια *BRAF 600E*, *EGFR*, *KIT*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *TSC1*, *FGFR3*, *AKT1*, *ROS1*, *ERBB2* και *ALK*. Από την άλλη, οι μεταλλαγές-επιβάτες παρουσιάζονται κατά την εμφάνιση του όγκου, αλλά δεν επηρεάζουν την ανάπτυξή του (Morganti et al., 2019; Selvakumar et al., 2022).

Υπάρχουν επίσης βιοδείκτες οι οποίοι δεν αφορούν μόνο σε ένα συγκεκριμένο είδος καρκίνου, αλλά είναι παν-καρκινικοί. Σε αυτούς τους βιοδείκτες ανήκει η μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite Instability-MSI), το φορτίο μεταλλαγών του όγκου (Tumor Mutation Burden-TMB) και οι συντήξεις γονιδίων της οικογένειας των Νευροτροφικών Υποδοχέων Κινασών Τυροσίνης (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor, NTRK). Η MSI προκαλείται από την απενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης αταίριαστου ζεύγους κατά την αντιγραφή του DNA (Mismatch Repair-MMR) και εντοπίζεται σε πολλούς πρωτοπαθείς όγκους. Ο TMB είναι ένας βιοδείκτης ο οποίος βοηθάει στην πρόβλεψη της απόκρισης του ασθενή σε ανοσοθεραπείες. Ο NTRK παρουσιάζει συντήξεις των ογκογονιδίων της οικογένειας *NTRK*: *NTRK1/NTRK2/NTRK3*, οι οποίες εμφανίζονται συχνά σε επιθετικούς καρκίνους όπως το γλοιοβλάστωμα (Yadav et al., 2023; Zhong et al., 2020).

Για την επίτευξη της διαφοροποίησης μεταξύ των μεταλλαγών-οδηγών και μεταλλαγών-επιβατών έχουν δημιουργηθεί μεγάλες βάσεις δεδομένων όπως οι UCSC, cBioPortal και COSMIC Cancer Genomics Browser στις οποίες συλλέγονται δεδομένα σχετικά με τη σύνδεση μεταλλαγών σε γονίδια και εμφάνιση καρκίνου. Αυτές οι προσπάθειες έχουν οδηγήσει ήδη στην ανάπτυξη ειδικών πάνελ γονιδίων για τον γενετικό έλεγχο ασθενών και τη διάγνωση καρκίνων τα οποία βασίζονται στις τεχνικές NGS (Avila & Meric-Bernstam, n.d.; Hussen et al., 2022).

Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου πάνελ είναι το TruSight Hereditary Cancer Panel της εταιρείας Illumina. Με αυτό γίνεται έλεγχος για μεταλλαγές σε 113 γονίδια τα οποία σχετίζονται με εμφάνιση συχνών κληρονομικών καρκίνων όπως καρκίνου του μαστού, του παχέους εντέρου, των ωοθηκών και γαστρικών καρκίνων. Το δείγμα που χρησιμοποιείται είναι δείγμα αίματος ή σάλιου, το οποίο πρέπει να περιέχει ποσότητα DNA 50-1000 ng, και τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε περίπου 48 ώρες (*TruSight Hereditary Cancer Panel | Target 113 Cancer-Associated Genes*, n.d.).

Ένα άλλο πάνελ της ίδια εταιρείας που χρησιμοποιείται συχνά είναι το TruSight Oncology 500 το οποίο ανιχνεύει καρκινικούς δείκτες σε περισσότερα από 500 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των δεικτών MSI και TMB. Το δείγμα σε αυτό το πάνελ είναι δείγμα ιστού ενσωματωμένου σε παραφίνη με απαιτούμενη ποσότητα 40 ng DNA ή RNA και τα

αποτελέσματα χρειάζονται 4-5 μέρες (*TruSight Oncology 500 | Enable CGP Utilizing DNA and RNA from FFPE*, n.d.).

Ένα άλλο ευρέως χρησιμοποιούμενο πάνελ είναι το AVENIO Tumor Tissue CGP Kit V2 της Roche με το οποίο είναι δυνατή η αλληλούχιση 335 γονιδίων για καρκινικούς βιοδείκτες συμπεριλαμβανομένων των MSI, TMB, του δείκτη ανεπάρκειας ομόλογου ανασυνδυασμού HRD (Homologous recombination deficiency) και του δείκτη απώλειας ετεροζυγωτίας LOH (Loss of Heterozygosity) σε δείγματα ιστού ενσωματωμένου σε παραφίνη με αποτελέσματα έτοιμα σε 5 μέρες (*AVENIO Tumor Tissue CGP Kit V2*, n.d.).

Το πρώτο πάνελ το οποίο εγκρίθηκε από την υπηρεσία φαρμάκων και τροφίμων των ΗΠΑ είναι το FoundationOne CDX της Foundation medicine με το οποίο γίνεται έλεγχος βιοδεικτών σε 324 γονίδια σχετιζόμενα με εμφάνιση μελανώματος, καρκίνου του μαστού, μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Non-small cell lung cancer-NSCLC), καρκίνου του παχέους εντέρου, καρκίνου των ωοθηκών, καρκίνου του προστάτη και χολαγγειοκαρκινώματος (FoundationOne CDx | Foundation Medicine, n.d.).

Το 2020 η Ευρωπαϊκή Κοινότητα Ιατρικής Ογκολογίας (European Society for Medical Oncology-ESMO) έδωσε οδηγίες και προτάσεις για τη χρήση πολυγονιδιακών πάνελ NGS προκειμένου να εφαρμοστούν σε ασθενείς με NSCLC, καρκίνο του προστάτη, καρκίνο των ωοθηκών και χολαγγειοκαρκίνωμα (F. Mosele et al., 2020). Σε αναθεώρηση που δημοσίευσε το 2024 προτείνει ακόμη τη χρήση πάνελ NGS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ορθοκολικό καρκίνο αλλά και σε ασθενείς με στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού συστήματος, σάρκωμα και καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (Cancer of unknown primary site-CUP) (M. F. Mosele et al., 2024).

3.1.4.1.1 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο καρκίνος με τα μεγαλύτερα ποσοστά θανάτου παγκοσμίως, με τον NSCLC να αποτελεί το 84% των περιπτώσεων.

Η συχνότητα εμφάνισης συγκεκριμένων μεταλλαγών διαφέρει από πληθυσμό σε πληθυσμό, καθώς για παράδειγμα οι Ασιάτες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλαγών *EGFR* και μικρότερη μεταλλαγών *KRAS* συγκριτικά με πληθυσμούς στην Ευρώπη. Γι' αυτό και οι

οδηγίες που δίνονται από τους αντίστοιχους οργανισμούς διαφέρουν όσον αφορά την σημαντικότητα κάποιων γονιδίων. Όμως, υπάρχει παγκοσμίως μια ομοφωνία όσον αφορά τον έλεγχο μεταλλαγών στα γονίδια *EGFR*, *BRAF*, *ALK* και *ROS1* σε άτομα με προχωρημένο NSCLC. Ο ESMO στις πιο πρόσφατες οδηγίες του σε προχωρημένους καρκίνους NSCLC προτείνει χρήση πάνελ NGS για τον έλεγχο των γονιδίων *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *RET*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *ERBB2* και *NRG1*. Επιπλέον έλεγχος γονιδίων μπορεί να γίνει ανάλογα με την κάθε περίπτωση και μετά από επικοινωνία του γιατρού με τον ασθενή (Kerr et al., 2021; M. F. Mosele et al., 2024).

3.1.4.1.2 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο στις γυναίκες, με το 5-10% των περιπτώσεων να είναι κληρονομικές, και από αυτές το 30% να οφείλεται σε μεταλλαγές στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2*. Για τον λόγο αυτό, γίνεται πάντα έλεγχός τους, κυρίως σε ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου (Hussen et al., 2022). Κάποια άλλα γονίδια που έρευνες έχουν δείξει ότι μεταλλαγές σε αυτά αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης αυτού του είδους καρκίνου είναι τα *TP53*, *NF1*, *CDH1*, *PTEN* και *STK11* (Easton et al., 2015). Το 2024 ο ESMO πρότεινε έλεγχο των γονιδίων *ERBB2*, *PIK3CA*, *ESR1*, *BRCA1/2*, *PTEN*, *AKT1* και *PALB2* σε προχωρημένους καρκίνους του μαστού (M. F. Mosele et al., 2024).

3.1.4.1.3 Καρκίνος θυρεοειδούς

Για τον καρκίνο του θυρεοειδούς η πιο συχνή τεχνική αξιολόγησης τυχόν ανωμαλιών είναι η παρακέντηση και βιοψία με λεπτή βελόνα, η οποία ακολουθείται από κυτταρολογικό έλεγχο. Όμως στο 25% των περιπτώσεων ο μοριακός χαρακτηρισμός των αλλοιώσεων με τις συνηθισμένες τεχνικές είναι δύσκολος. Σε αυτό βοήθησε η ανάπτυξη των μεθόδων NGS, που δίνουν τη δυνατότητα για έλεγχο μεταλλαγών τόσο στα ήδη γνωστά γονίδια *RAS*, *BRAF*, *RET*, αλλά και στα *MITF*, *JAK3*, *MDM2*, *IDH1*, *FLI1* (Selvakumar et al., 2022). Τα γονίδια για τα οποία υπάρχουν οδηγίες για έλεγχο σε προχωρημένο καρκίνο του θυρεοειδούς από τον ESMO είναι τα *RET* και *BRAF* (M. F. Mosele et al., 2024).

3.1.4.1.4 Καρκίνοι αναπαραγωγικού συστήματος

Ο καρκίνος των ωοθηκών αποτελεί την πιο θανατηφόρα και επιθετική γυναικολογική κακοήθεια και μεγάλο ποσοστό γυναικών παρουσιάζει μεταστάσεις. Σημαντικός αριθμός των ασθενών παρουσιάζει μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1/BRCA2*. Κάποια άλλα γονίδια οι μεταλλάξεις των οποίων έχει βρεθεί πως συνδέονται με πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών είναι τα *ATM, BRIP1, CHEK2, NBN, PALB2* και *RAF51B*. Όλα αυτά είναι γονίδια τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι επιδιόρθωσης DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination Repair pathway, HRR) (Harbin et al., 2022).

Ο καρκίνος προστάτη είναι ο πιο συχνός καρκίνος στον ανδρικό πληθυσμό και είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη διάγνωσή του. Μια κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται για την αξιολόγησή του είναι η μέτρηση του προστατικού αντιγόνου PSA στους άνδρες, ένας δείκτης που όμως δεν είναι πάντα αξιόπιστος. Γι' αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και συχνότερα έλεγχος για μεταλλάξεις σε γονίδια. Κάποιες από τις πιο συχνές που συνδέονται με εμφάνιση του καρκίνου του προστάτη παρουσιάζονται στα γονίδια *KMT2D, FOXA1, ATM, ZFH3, TP53* και *APC*. Από αυτές μεταλλάξεις στα γονίδια *ATM* και *TP53* συνδέονται με κακή πρόγνωση (Mangolini et al., 2022).

Όσον αφορά τον ESMO, οι προτάσεις του περιλαμβάνουν τον έλεγχο των γονιδίων *BRCA1/2* και *HRD* για καρκίνους ωοθηκών προχωρημένου σταδίου και τον έλεγχο των *BRCA1/2, PTEN, ATM* και *PALB2* για προχωρημένους καρκίνους του προστάτη (M. F. Mosele et al., 2024).

3.1.4.1.5 Καρκίνοι πεπτικού συστήματος

Ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί ένα παγκοσμίως σοβαρό πρόβλημα καθώς ευθύνεται για περισσότερους από ένα εκατομμύριο θανάτους ετησίως. Κάποιες από τις πιο συχνές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στους καρκινοπαθείς είναι αυτές των γονιδίων *KRAS, NRAS, BRAF* και *MSI*. Επίσης υπάρχουν κληρονομικά γενετικά σύνδρομα που συνδέονται με εμφάνιση ορθοκολικού καρκίνου τα οποία μπορεί να χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση πολυπόδων διαφόρων ειδών, όπως αδενωματοδών, αμαρτωματοδών και οδοντωτών, ή που δεν παρουσιάζουν πολύποδες όπως είναι το σύνδρομο Lynch (Rebuzzi et al., 2023).

Τα χολαγγειοκαρκινώματα είναι μια ετερογενής ομάδα όγκων των χοληφόρων οδών. Χωρίζονται σε ενδοηπατικά, εξωηπατικά και περιφερικά ανάλογα με την ανατομική θέση

του όγκου. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις σε χολαγγειοκαρκινώματα παρουσιάζονται στα γονίδια *ARID1A*, *BAP1*, *BRAF*, *ERBB2*, *FGR2*, *IDH1/2*, *KRAS*, *NRAS*, *PRBM1*, *PIK2CA*, *SMAD4*, *TP53* (Stenzinger et al., 2024).

Ο ESMO με οδηγίες του το 2024 προτείνει έλεγχο των γονιδίων *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MSI-H*, *ERBB2*, *POLE* για προχωρημένο ορθοκολικό καρκίνο και των *IDH2*, *FGFR2*, *ERBB2*, *BRAF*, *KRAS* για προχωρημένες περιπτώσεις χολαγγειοκαρκινωμάτων (M. F. Mosele et al., 2024).

3.1.4.1.6 Αιματολογικές κακοήθειες

Όσον αφορά τις αιματολογικές κακοήθειες υπάρχουν ανεπτυγμένα DNA και RNA πάνελ τα οποία χρησιμοποιούνται για έλεγχο συγκεκριμένων γονιδίων των οποίων οι μεταλλάξεις οδηγούν στην ανάπτυξη κακοήθειας. Πιο συγκεκριμένα οι πιο συνηθισμένες μεταλλάξεις-οδηγοί σε περιπτώσεις Κλωνικής Αιμοποίησης παρατηρούνται στα γονίδια *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2*, *TP53*, *SFEB1*, *PPM1D*, *SRSF2*, *ZBTB33*, *IDH1*, *IDH2*, *U2AF1*, *KRAS*, *NRAS*, *CTCF*, *CBL*, *GNB1*, *BRCC3*, *PTPN11*, *GNAS*, *BCOR* και *BCORL1*. Για τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα ελέγχονται τα *TP53*, *FLT3*, *KMT2A*, *SF3B1*, *NPM1*, *RUNX1*, *NRAS*, *ETV6*, *IDH2*, *CBL*, *EZH2*, *U2AF1*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *KRAS*, από αυτά μεταλλάξεις του *SF3B1* συνδέονται με καλή πρόγνωση. Για Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) ελέγχονται τα *NPM1* και *CEBRA* ενώ το πάνελ για τον έλεγχο ΟΜΛ σχετιζόμενης με μυελοδυσπλασία (AML-MR) αποτελείται από τα 8 γονίδια *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* και *ZRSR2*. Όσον αφορά νεοπλάσματα του λεμφικού συστήματος, παρατηρούνται μεταλλάξεις στο *PAX5* στην Β-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, στο *BRAF* στην Λευχαιμία των Τριχωτών Κυττάρων, *MYD88/CXCR4* στο Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα, στο *TCF3/ID3* στο EBV αρνητικό Λέμφωμα Burkitt, στο *STAT3/STAT5B* στην Λευχαιμία των μεγάλων κοκκιωδών Τ-Λεμφοκυττάρων και στα *KRAS*, *NRAS*, *IRF4*, *MAX*, *HIST1H1E*, *RB1*, *EGR1*, *TP53*, *TRAF3*, *FAM46C*, *DIS3*, *BRAF*, *LTB*, *CYLD* και *FGFR3* στο Πλασματοκυτταρικό Μυέλωμα (Cho, 2024).

3.1.4.2 Υγρή βιοψία

Η βασική μέθοδος που χρησιμοποιείται στα κλινικά εργαστήρια για την πρόγνωση, την ανίχνευση και την σταδιοποίηση του καρκίνου είναι η βιοψία. Όμως σε πολλές περιπτώσεις είναι δύσκολη η εφαρμογή της, όπως για παράδειγμα σε μεταστατικούς καρκίνους τελευταίου σταδίου. Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα προσφέρει η υγρή βιοψία. Το αίμα μας αποτελείται από πολλά συστατικά όπως κύτταρα του αίματος, αιμοπετάλια, εξωκυτταρικά κυστίδια, mRNA, miRNA, πρωτεΐνες και DNA ελεύθερο κυττάρων (cfDNA). Στο αίμα των καρκινοπαθών ένα μέρος του cfDNA εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης και ονομάζεται κυκλοφορούν καρκινικό DNA (Circulating tumor DNA, ctDNA). Αυτό το ctDNA περιέχει μεταλλάξεις οι οποίες είναι συγκεκριμένες για κάποιους όγκους, άρα μπορεί να λειτουργήσει ως βιοδείκτης για την ανίχνευση καρκίνων (M. Chen & Zhao, 2019).

Το κύριο πλεονέκτημα της υγρής βιοψίας είναι η εύκολη συλλογή του δείγματος, χωρίς κίνδυνο ή παρενέργειες για τον ασθενή, καθώς αντί για ιστός το μόνο που χρειάζεται είναι δείγμα αίματος. Έχει αποδειχτεί χρήσιμη μέθοδος για την πρόωρη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα, καθώς μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS* και *TP53* μπορούν να ανιχνευτούν σε αποθηκευμένα δείγματα πτυέλων μέχρι και 1 χρόνο πριν την διάγνωση. Επίσης με τη χρήση ctDNA είναι δυνατή η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων που παρέμειναν μετά την θεραπεία, αρκετές εβδομάδες πριν καταστεί δυνατή η ανίχνευση με τη χρήση ακτινολογικών τεχνικών.

Το κύριο πρόβλημα της τεχνικής αυτής είναι η μεγάλη ποσότητα δείγματος που απαιτείται, καθώς για τη λήψη 1-10ng/ml ctDNA, πρέπει να ληφθούν 150-300 ml αίματος. Επίσης ctDNA εκκρίνεται και από υγιή κύτταρα και αιμοποιητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος ψευδών θετικών αποτελεσμάτων (M. Chen & Zhao, 2019; Morganti et al., 2019).

3.1.4.3 Θεραπεία

Η ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών για τον καρκίνο αποτελεί έναν πιο αποτελεσματικό και λιγότερο επικίνδυνο τρόπο αντιμετώπισής του σε σχέση με τις χημειοθεραπείες, καθώς κάθε ασθενής λαμβάνει θεραπεία βασισμένη στα μοναδικά κλινικά χαρακτηριστικά του, τον τύπο της ασθένειάς του και τους βιοδείκτες που εντοπίζονται (**Εικόνα 10**) (Hussen et al., 2022). Ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία ειδικά για την αντιμετώπιση των μεταλλάξεων που ευθύνονταν για την κακοήθειά τους είχαν μεγαλύτερα ποσοστά

αποτελεσματικής απόκρισης στη θεραπεία σε σύγκριση με ασθενείς που δεν έλαβαν εξατομικευμένη θεραπεία (27% έναντι 5%, αντίστοιχα) και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έως την αποτυχία της θεραπείας (μέσος όρος 5,3 μήνες αντί για 2,2 μήνες, αντίστοιχα) αλλά και επιβίωσης (μέσος όρος 13,4 μήνες αντί για 9,0 μήνες, αντίστοιχα).

Η χρήση των τεχνολογιών αλληλούχισης επόμενης γενιάς έχει βοηθήσει σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη των εξατομικευμένων θεραπειών. Με τη βοήθειά τους γίνεται πλήρης ανάλυση του γενετικού προφίλ του κάθε ασθενή και ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων οι οποίες οδηγούν στην ανάπτυξη του κάθε όγκου. Προσφέρουν τη δυνατότητα ανίχνευσης γονιδιακών μεταλλαγών, όπως ένθεση/απαλοιφή διαδοχικών βάσεων, χρωμοσωμικών μεταλλαγών, όπως αναδιατάξεις τμημάτων χρωμοσωμάτων, αλλά και ελέγχου για έλλειψη ετεροζυγωτίας και εμφάνιση ανευπλοειδίας (Mardis, 2019; Selvakumar et al., 2022).

Μεγάλοι επιστημονικοί οργανισμοί όπως ο Άτλας Καρκινικών Γονιδιωμάτων (The Cancer Genome Atlas -TCGA) και η Διεθνής Ένωση Καρκινικών Γονιδιωμάτων (International Cancer Genome Consortium-ICGC), έχουν βοηθήσει σημαντικά στην κατηγοριοποίηση των διάφορων ειδών καρκίνου, και στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των γενετικών ανωμαλιών που οδηγούν στην ανάπτυξή τους. Με τη χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από αυτούς, διευκολύνεται η έγκαιρη πρόγνωση, διάγνωση και αποτελεσματική αντιμετώπιση κακοηθειών (Yadav et al., 2023).

Η ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταλλαγών που οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός όγκου είναι καίριας σημασίας για τη χορήγηση σωστής θεραπείας στον ασθενή. Ο εντοπισμός των μεταλλαγών αυτών με τη χρήση NGS οδήγησε στην ανάπτυξη εγκεκριμένων θεραπειών για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων ειδών κακοηθειών.

Για παράδειγμα, όγκοι που παρουσιάζουν συντήξεις των γονιδίων *NTRK1/2/3* μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με τη χορήγηση αναστολέων TRK όπως η εντρεκτινίμπη (Demetri et al., 2022), ενώ όγκοι που ορίζονται ως MSI-high (MSI-H) ή MMR-deficient (dMMR) αποκρίνονται σε θεραπεία με αναστολείς του υποδοχέα PD-1 όπως η πεμπρολιζουμάμπη (Marcus et al., 2019).



Εικόνα 10. Εξατομικευμένη θεραπεία καρκινοπαθών. Μέσω της χρήσης ειδικών γονιδιακών πάνελ βασισμένων σε μεθόδους NGS γίνεται πλήρης ανάλυση των γονιδίων του κάθε ασθενή και χορήγηση ειδικών θεραπειών ανάλογα με τις ανάγκες και τις ιδιαιτερότητές του [Προσαρμογή από (Nagahashi et al., 2019)].

Για τη θεραπεία καρκίνων με μεταλλάξεις των γονιδίων *FGFR1/2/3* μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναστολείς PAN-FGFR όπως η ερδαφτινίμη (PANT) και για καρκίνους που ορίζονται ως TMB-High αναστολείς των υποδοχέων PD-1/PD-L1 όπως η ατεζολιζουμάμη (Friedman et al., 2022).

Επίσης, αναστολείς των πρωτεϊνών *BRAF* και *MEK* είναι αποτελεσματικοί στη θεραπεία όγκων με μεταλλάξεις του γονιδίου *BRAF*, κυρίως με τη μεταλλαγή *BRAF V600E* και αναστολείς των υποδοχέων *RET* όπως η πρασελτινίμη είναι αποτελεσματικοί για όγκους με μεταλλάξεις στο γονίδιο (Subbiah et al., 2020, 2022).

Όσον αφορά την ΟΜΛ, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μιντοσταυρίνη για ασθενείς με *FLT3* μεταλλάξεις και ενασιδενίμη ή ιβοσιδενίμη για ασθενείς με υποστροπιάζουσα και επιθετική ΟΜΛ που οφείλεται σε μεταλλάξεις των γονιδίων *IDH2* και *IDH1* αντίστοιχα.

Εκτός από την εύρεση των πιο αποτελεσματικών θεραπειών, η ανίχνευση των μεταλλάξεων μέσω NGS δίνει και πληροφορίες όσον αφορά την αντίσταση σε θεραπείες. Για παράδειγμα μεταλλάξεις στα γονίδια *KRAS* και *NRAS* στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνδέονται με

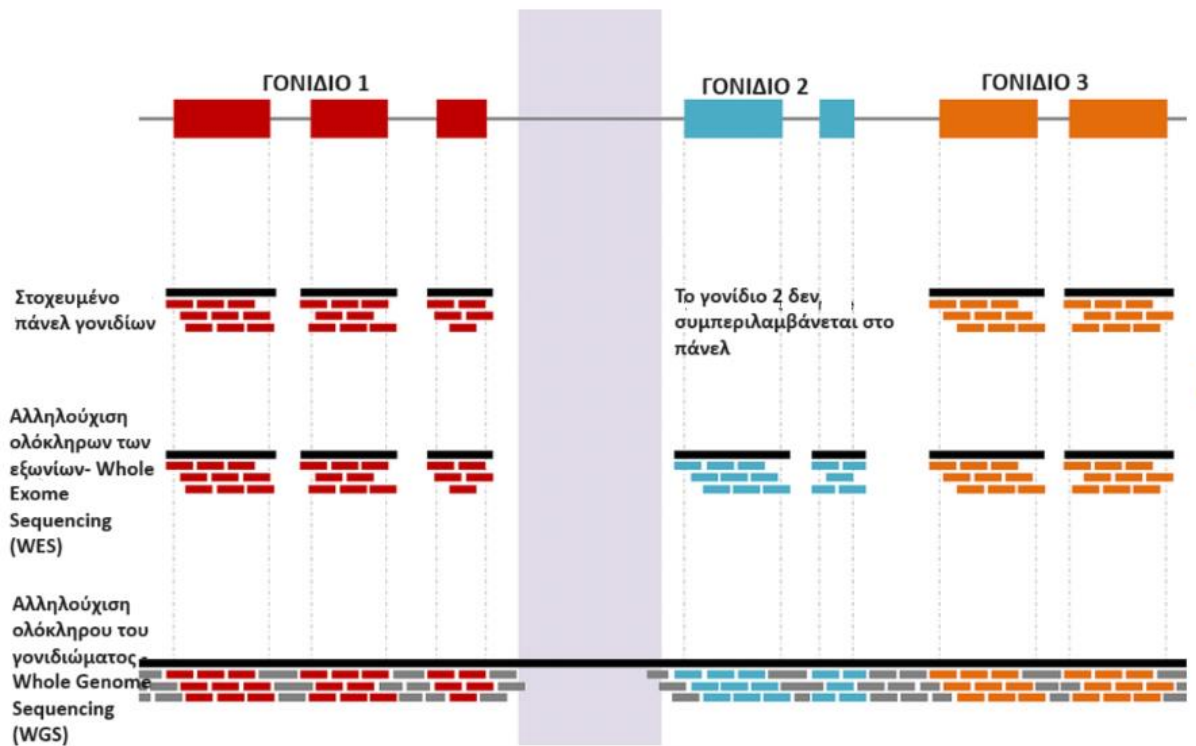
αντίσταση στη θεραπεία με αντι-EGFR αντισώματα (Brown & Elenitoba-Johnson, 2019; Yadav et al., 2023).

3.1.5 Καρδιαγγειακές νόσοι

Οι νόσοι του καρδιαγγειακού συστήματος αποτελούν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων. Μπορούν να προκαλέσουν καρδιακή ανεπάρκεια που επηρεάζει το 1-2% του πληθυσμού και αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, οι οποίοι είναι τόσο περιβαλλοντικοί, όσο και γενετικοί. Η χρήση των τεχνολογιών NGS για γενετικό έλεγχο των ασθενών αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι για την ανίχνευση ασυμπτωματικών ατόμων που διατρέχουν κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νόσων, και για τη σωστή αντιμετώπιση και θεραπεία τους (Kalayinia et al., 2018).

Η χρήση ειδικών πάνελ NGS γίνεται όλο και συχνότερη σε κλινικά εργαστήρια για τον γενετικό έλεγχο ατόμων και την ταυτόχρονη ανάλυση γονιδίων, για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση κάποιας πάθησης, αλλά και την ανακάλυψη νέων (**Εικόνα 11**). Τα πάνελ αυτά και τα γονίδια στα οποία στοχεύουν σχεδιάζονται με τη βοήθεια των ειδικών βάσεων δεδομένων όπως η GenCC, σύμφωνα με την οποία έχουν παρατηρηθεί 136.116 είδη μεταλλαγών σε 143 γονίδια που συνδέονται με καρδιαγγειακές παθήσεις. Πιο συγκεκριμένα 10.442 ανήκουν στην κατηγορία P, 5.676 στην κατηγορία LP, 58.178 στην VUS, 37.967 στην LB, 13.125 στην B και 9.862 έχουν αντικρουόμενες ερμηνείες (Papadopoulou et al., 2023).

Ένα παράδειγμα πάνελ ειδικά σχεδιασμένου για καρδιαγγειακές νόσους είναι το CentoCardio της Centogene με το οποίο γίνεται αλληλούχιση 327 γονιδίων σε δείγματα αίματος, σάλιου και στοματικού επιχρίσματος με ελάχιστη ποσότητα DNA 1 μg. Οι παθήσεις που καλύπτει είναι το σύνδρομο μακρού QT, το σύνδρομο Brugada, η κατεχολαμινεργική πολυμορφική κοιλιακή ταχυκαρδία, διατακτικές και υπερτροφικές μυοκαρδιοπάθειες, συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες και αγγειακές ανωμαλίες (Cardiovascular | NGS Panels: Centogene.Com, n.d.).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση που αφορά στη σύγκριση του τρόπου λειτουργίας ενός στοχευμένου πάνελ γονιδίων με τα συστήματα αλληλούχισης τύπου WES και WGS. Η σύγκριση αφορά την αλληλούχιση 3 γονιδίων. Παρατηρούμε ότι το 2ο γονίδιο δεν συμπεριλαμβάνεται στο πάνελ γονιδίων και άρα δεν γίνεται αλληλούχισή του. Με τη μέθοδο WES γίνεται αλληλούχιση όλων των εξωνίων των γονιδίων, ενώ με την WGS γίνεται αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Η γκριζα περιοχή αντιστοιχεί σε τμήμα του γονιδιώματος που είναι δύσκολο να αλληλουχιθεί με κάποια από τις τεχνικές αυτές [Προσαρμογή από (Ménécase et al., 2020)].

3.1.5.1 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Familial hypercholesterolemia, FH)

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία είναι μια συχνή κληρονομική, αυτοσωμικά επικρατής, ασθένεια που οφείλεται σε μεταλλαγές σε γονίδια που επηρεάζουν την ηπατική πρόσληψη και αποικοδόμηση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein cholesterol- LDL-C). Ως αποτέλεσμα τα επίπεδα της LDL στο αίμα είναι σοβαρά αυξημένα και υπάρχει κίνδυνος για εμφάνιση αθηροσκλήρωσης και στεφανιαίας νόσου (Kalayinia et al., 2018). Για την εμφάνισή της ευθύνονται κυρίως μεταλλαγές στα γονίδια του υποδοχέα της LDL (LDLR), της απολιποπρωτεΐνης Β (APOB) και του ενζύμου PCSK9 (Varret et al., 2008). Όπως δείχθηκε, όταν συγκρίθηκαν ασθενείς με επίπεδα LDL <130mg/dl και χωρίς εμφάνιση κάποιας μεταλλαγής με ασθενείς με LDL>190mg/dl και χωρίς μεταλλαγή, οι δεύτεροι είχαν

6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, ενώ ο κίνδυνος αυτός αυξανόταν 22 φορές σε ασθενείς με LDL>190mg/dl και εμφάνιση μεταλλαγής. Γενικά, ανάμεσα σε άτομα που παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα LDL, εάν ανιχνευθεί κάποιου είδους μεταλλαγή ο κίνδυνος στεφανιαίας νόσου αυξάνεται κατά 3 φορές (Sturm et al., 2018). Η διάγνωση της FH μπορεί να γίνει κλινικά αλλά είναι απαραίτητος ο γενετικός έλεγχος τόσο για επιβεβαίωση όσο και για τη χορήγηση σωστής θεραπείας. Ασθενείς με FH λαμβάνουν θεραπεία με στατίνες, ενώ συγκεκριμένα για ετερόζυγα άτομα έχει αποδειχτεί πιο αποτελεσματική η χορήγηση αναστολέων PCSK9, ενώ λομιταπίδη και μιπομερσένη χορηγούνται μόνο σε ομόζυγους ασθενείς (Paradourou et al., 2023).

3.1.5.2 Μυοκαρδιοπάθειες

Τα δύο κυριότερα και πιο σοβαρά είδη μυοκαρδιοπαθειών είναι η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια (hypertrophic cardiomyopathy-HCM) και η διατατική μυοκαρδιοπάθεια (dilated cardiomyopathy- DCM).

Η HCM προκαλείται από μεταλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες των σαρκομερών, πιο συγκεκριμένα στα *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNI3*, *TNNT2* και *TPM1*. Σε μικρό ποσοστό ασθενών έχουν εντοπιστεί επίσης μεταλλαγές σε γονίδια δεσμοσωμάτων και ιοντικών καναλιών (Bonaventura et al., 2021). Τα πάνελ για έλεγχο της HCM πρέπει να συμπεριλαμβάνουν επίσης γονίδια που σχετίζονται με φαινοαντίγραφα της HCM, δηλαδή ασθένειες που αποτελούν το 5-10% των HCM, και ενώ έχουν παρόμοιο φαινότυπο με την HCM οφείλονται σε μεταλλαγές διαφορετικών γονιδίων σχετιζόμενων με μεταβολικές λυσοσωμικές διαταραχές.

Όσον αφορά την DCM, τα κύρια γονίδια που ευθύνονται για την εμφάνισή της είναι τα *TTN*, *LMNA*, *PLN*, *RBM20* και *SCN5A* καθώς και γονίδια πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού (π.χ. *FLNC*). Ασθενείς με μεταλλαγές στα γονίδια *KMNA*, *RBM20*, *PLN* και *FLN* έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο αιφνίδιου καρδιακού θανάτου, γι' αυτό και προτείνεται η εμφύτευση απινιδωτή. Επίσης ασθενείς με μεταλλαγές στο γονίδιο *SCN5A* έχει δειχθεί ότι αποκρίνονται καλά σε θεραπεία με ουσίες οι οποίες αναστέλλουν τη διέλευση των ιόντων νατρίου από τις κυτταρικές μεμβράνες (Akhtar & Elliott, 2018).

Η αρρυθμογόνος μυοκαρδιοπάθεια είναι μια σπάνια πάθηση που χαρακτηρίζεται από αντικατάσταση του ιστού του μυοκαρδίου με ινολιπώδη ιστό, κοιλιακές αρρυθμίες και κοιλιακή δυσλειτουργία. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και προκαλεί αιφνίδιο καρδιακό θάνατο σχεδόν στο 50% των ασθενών. Η αρρυθμογόνος μυοκαρδιοπάθεια της δεξιάς κοιλίας οφείλεται σε διαταραχή των καρδιακών δεσμοσωμάτων λόγω μεταλλαγών των γονιδίων *PKP2*, *DSP*, *DSC2*, *DSG2* και *JUP* (James et al., 2021).

3.1.5.3 Κληρονομικές διαταραχές του ηλεκτρικού συστήματος της καρδιάς (inherited channelopathies)

Οι διαταραχές του ηλεκτρικού συστήματος της καρδιάς οφείλονται σε γενετικές διαταραχές γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες των καναλιών ιόντων ή των πρωτεϊνών που τις ρυθμίζουν. Όλες αυτές οι διαταραχές οδηγούν σε καρδιακές αρρυθμίες και ευθύνονται για το 35% της εμφάνισης του συνδρόμου αιφνίδιου θανάτου. Οι πιο συχνές διαταραχές είναι η κατεχολαμινεργική πολύμορφη κοιλιακή ταχυκαρδία, το σύνδρομο μακρού QT (long QT syndrome-LQTS) και το σύνδρομο Brugada (Kalayinia et al., 2018).

Το LQTS κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και το 70% των περιπτώσεων οφείλεται σε μεταλλαγές στα γονίδια *KCNQ1* και *KCNH2*, ενώ το 5-10% σε μεταλλαγές του *SCN5A*. Το υπόλοιπο 10% οφείλεται σε μεταλλαγές σε δευτερεύοντα γονίδια. Η κύρια θεραπεία του LQTS είναι οι β-αναστολείς, οι οποίοι μειώνουν και την πιθανότητα ανάγκης εμφύτευσης απινιδωτή (Mazzanti et al., 2018).

3.1.5.4 Ανεύρυσμα και διαχωρισμός θωρακικής αορτής (Thoracic aortic aneurysm and dissection-TAAD)

Το ανεύρυσμα της θωρακικής αορτής είναι μια σοβαρή ασθένεια με δύσκολη διάγνωση, καθώς μόνο το 5% των ασθενών εμφανίζουν συμπτώματα πριν την εμφάνιση του ανευρύσματος και από αυτούς που εμφανίζουν, λιγότερο από το 50% λαμβάνει σωστή διάγνωση προλαβαίνοντας τον θάνατο. Τα κληρονομικά αγγειακά σύνδρομα Marfan, Loeys-Dietz και Ehlers-Danlos συνδέονται με εμφάνιση TAAD. Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις παρατηρούνται μεταλλαγές στα γονίδια *ACTA2*, *MYLK*, *MYH11* και *PRKG1*. Με τη βοήθεια

των NGS γίνεται γενετικός έλεγχος σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό και οι μεταλλαγές των γονιδίων κατατάσσονται ανάλογα με την επικινδυνότητά τους(Ostberg et al., 2020).

3.1.6 Νευροεκφυλιστικά νοσήματα

Τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα είναι μια ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από προοδευτικό εκφυλισμό και θάνατο των νευρικών κυττάρων. Στην διάγνωσή τους βοηθάει η χρήση απεικονιστικών τεχνικών όπως εγκεφαλογράφημα, μαγνητική και αξονική τομογραφία, τα οποία αξιολογούνται από τους γιατρούς, όμως είναι χρονοβόρες διαδικασίες και υπάρχει πάντα και η περίπτωση του ανθρώπινου λάθους, που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη διάγνωση. Υπάρχουν και γενετικά τεστ που χρησιμοποιούνται, τα οποία όμως ελέγχουν μόνο ένα γονίδιο, κάτι που δεν είναι τόσο βοηθητικό στη διάγνωση των νευροεκφυλιστικών νόσων που είναι γενετικά ετερογενείς (Shademan et al., 2021).

Τη λύση σε αυτά τα προβλήματα δίνει το NGS με τη χρήση ειδικών πάνελ γονιδίων μέσω των οποίων γίνεται έλεγχος των ασθενών για εμφάνιση μεταλλαγών σε γονίδια συνδεδεμένα με νευρολογικές νόσους. Ένα τέτοιο πάνελ είναι το CentoNeuro της εταιρείας Centogene με το οποίο γίνεται έλεγχος 1907 γονιδίων σε δείγματα αίματος, σάλιου και στοματικού επιχρίσματος με ελάχιστη ποσότητα DNA 1 μg. Το πάνελ αυτό περιέχει γονίδια σχετιζόμενα με μυατροφική πλευρική σκλήρυνση, άνοια, νόσος Parkinson's, νευρομυικές παθήσεις, κληρονομική αισθητικοκινητική νευροπάθεια, δυστονία, επιληψία, αυτισμό, διανοητικές αναπηρίες, ημικρανία, σπαστική παραπληγία, αταξία, σύνδρομο Leigh, επιληπτικές εγκεφαλοπάθειες και κινητικές διαταραχές (Neurology | NGS Panels: Centogene.Com, n.d.).

3.1.6.1 Νόσος Alzheimer

Η νόσος Alzheimer είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος και αποτελεί κύρια αιτία της εμφάνισης άνοιας σε έναν ασθενή. Η επίπτωσή της αυξάνεται με την ηλικία, με τα ποσοστά των πασχόντων πάνω από την ηλικία των 85 να ανέρχονται σε 25-50%. Οφείλεται στην παθολογική συσσώρευση πλακών αμυλοειδούς και νευροϊνιδίων στον εγκέφαλο με αποτέλεσμα την απώλεια συνδέσεων μεταξύ των νευρικών κυττάρων που οδηγεί στον θάνατό τους και την απώλεια εγκεφαλικού ιστού. Τα φάρμακα τα οποία είναι διαθέσιμα και χορηγούνται στους ασθενείς δεν θεραπεύουν τα συμπτώματα αλλά τα βελτιώνουν. Η θεραπεία της νόσου είναι δύσκολη διότι οι παθολογικές αλλαγές στον εγκέφαλο ξεκινούν

μια δεκαετία πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Υπάρχουν 2 είδη της νόσου Alzheimer, η Νόσος Alzheimer Πρώιμης Έναρξης (Early Onset Alzheimer's Disease-EOAD) που εμφανίζεται σε ασθενείς πριν τα 65 χρόνια ζωής και η Νόσος Alzheimer Όψιμης Έναρξης (Late Onset Alzheimer's Disease-LOAD), η οποία είναι η πιο συνηθισμένη μορφή και εμφανίζεται μετά τα 65 (Khan et al., 2020).

Υπάρχουν γενετικοί παράγοντες που μπορούν να ερμηνεύσουν την παρουσία της EOAD, οι οποίοι συνδέονται με την επεξεργασία της πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς (Αβ). 3 είναι τα κύρια γονίδια στα οποία εντοπίζονται συχνότερα μεταλλάξεις: τα *APP*, *PSEN1* και *PSEN2*. Περίπου 53 είδη μεταλλαγών έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *APP*, οι περισσότερες από τις οποίες εντοπίζονται στα εξώνια 16 και 17. Μεταλλάξεις στα εξώνια 5,6,7 και 8 του γονιδίου *PSEN1* αποτελούν το 70% όλων των μεταλλαγών (Chandy, 2023).

Όσον αφορά την LOAD, μελέτες ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome wide association studies-GWAS) έχουν ανακαλύψει >20 γενετικές θέσεις που συνδέονται με αυξημένη ευαισθησία στην εμφάνισή της, γι' αυτό και είναι πιο περίπλοκη από ότι η EOAD (Giau et al., 2019). Το 90-95% των LOAD οφείλεται σε σποραδικές μεταλλάξεις, πολλές από τις οποίες εμφανίζονται και σε άλλες νόσους όπως είναι η νόσος του Parkinson και η πλάγια μυατροφική σκλήρυνση, οπότε είναι σημαντική η διαφοροδιάγνωσή τους. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα πιο συχνά γονίδια στα οποία εμφανίζονται μεταλλάξεις που συνδέονται με την LOAD είναι τα *APOE*, *CR1*, *CLU*, *ABCA7*, *PICALM*, *TREM2*, *SORL1*, *ADAM10* και *BIN1* (Chandy, 2023).

3.1.6.2 Νόσος Parkinson

Η νόσος του Parkinson είναι η 2η πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσος μετά τη νόσο Alzheimer. Αποτελεί μια περίπλοκη νόσο που χαρακτηρίζεται τόσο από κινητικά συμπτώματα (όπως βραδυκινησία, τρέμουλο και μυϊκή δυσκαμψία), όσο και από μη κινητικά (όπως κατάθλιψη, διαταραχή της συμπεριφοράς κατά τον ύπνο REM και γνωστική έκπτωση). Η διάγνωσή της γίνεται μέσω ιατρικού ιστορικού και νευρολογικής εξέτασης, όμως λόγω της μεγάλης της πλειομορφίας είναι σημαντική η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην εμφάνισή της (Salemi et al., 2023). Ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις νόσου Parkinson είναι σποραδικής προέλευσης, έρευνες έχουν δείξει ότι το 5-10% των πασχόντων έχουν κάποια

μονογονιδιακή γενετική μορφή της ασθένειας. Υπάρχουν 9 κύρια γονίδια και 13 γενετικές θέσεις που σχετίζονται τόσο με την αυτοσωμικά επικρατή μορφή της ασθένειας (*PARK1, PARK4/α-Synuclein, PARK5/UCHL1, PARK8/LRRK2, PARK11/GIGYF2, PARK13/Omi/Htra2*) όσο και με την αυτοσωμικά υπολειπόμενη μορφή (*PARK6/PINK1, PARK7/DJ-1, PARK9/ATP13A2*). Μέθοδοι NGS χρησιμοποιούνται και για την ανακάλυψη νέων γονιδίων που συνδέονται με εμφάνιση Parkinson (Lesage & Brice, 2009).

3.1.6.3 Επιληψία

Η επιληψία είναι μια νευρολογική πάθηση που χαρακτηρίζεται από επίμονη τάση για επιληπτικές κρίσεις, από την οποία πάσχουν 6 στους 1000 ανθρώπους. Το 70-80% οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, ενώ το 20-30% σε εγκεφαλικά και σε όγκους. Η χρήση των μεθόδων NGS έχει βοηθήσει στην ανίχνευση και ταυτοποίηση γονιδίων σχετιζόμενων με την εμφάνιση επιληψίας (Shademan et al., 2021). Πολλά από τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη λειτουργία καναλιών ιόντων των κυττάρων. Για παράδειγμα, το γονίδιο *KCNA2* κωδικοποιεί το τασεο-εξαρτώμενο κανάλι ιόντων KV1.2 και μεταλλαγή του σχετίζεται με εμφάνιση επιληπτικών εγκεφαλοπαθειών. Η χρήση πάνελ NGS σε ένα αγόρι ηλικίας 11 μηνών με επιληψία αποκάλυψε μια νέα μεταλλαγή του γονιδίου του υποδοχέα της $\gamma 2$ υπομονάδας του υποδοχέα GABAA (Komulainen-Ebrahim et al., 2019). Αντίστοιχα, η πραγματοποίηση NGS με WES σε μια οικογένεια που παρουσίαζε διαφορετικούς φαινότυπους οδήγησε στην ανίχνευση κοινής μεταλλαγής στο γονίδιο *SCN1A*, που επηρέαζε τη λειτουργία καναλιών ιόντων νατρίου (Chan et al., 2020). Κάποια άλλα γονίδια που μέσω NGS έχει βρεθεί ότι συνδέονται με διάφορα είδη επιληψιών είναι τα *KCNT2, SZT2, NUS1, SCN9A, HCN, ATP6N0C, NEXMIF* και *FOLR1* (Sun et al., 2021).

3.1.6.4 Πολλαπλή σκλήρυνση - Multiple Sclerosis (MS)

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι ένα χρόνια φλεγμονώδες αυτοάνοσο νόσημα του νευρικού συστήματος. Η χρήση NGS επικεντρώνεται στην ανίχνευση microRNAs που συμμετέχουν στην παθογένεση της MS. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι αλληλουχίες 4 μορίων microRNA που ανιχνεύονται σε εξωσώματα εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο σε πάσχοντες από υποτροπιάζουσα μορφή πολλαπλής σκλήρυνσης, κάτι που δείχνει τη δυνατότητα χρήσης

τους ως πιθανών βιοδεικτών για την πρόβλεψη υποτροπής της νόσου (Selmaj et al., 2017). Επίσης, έχει δειχθεί ότι γονίδια των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας τάξης I/II (HLA I/II) συμβάλλουν στην πιθανότητα ανάπτυξης MS (Ogawa et al., 2019).

3.1.6.5 Κληρονομική αισθητικοκινητική νευροπάθεια - Charcot-Marie-Tooth disease (CMT)

Η νόσος Charcot-Marie Tooth ή αλλιώς κληρονομική αισθητικοκινητική νευροπάθεια περιλαμβάνει μια ετερογενή ομάδα παθήσεων του περιφερικού νευρικού συστήματος που χαρακτηρίζονται κυρίως από μυϊκή αδυναμία και απώλεια αισθητικότητας (Reilly et al., 2011).

Υπάρχουν περισσότερα από 100 γονίδια τα οποία έχουν συνδεθεί με εμφάνιση CMT και η ασθένεια έχει πολλά υποείδη. Το πιο συχνό, το οποίο αντιστοιχεί στο 60% των περιπτώσεων είναι το CMT1A, που οφείλεται σε μεταλλαγή του κοντού βραχίονα του χρωμοσώματος 17, το οποίο περιλαμβάνει 9 γονίδια συμπεριλαμβανομένου του *PMP22*. Κάποια άλλα γονίδια τα οποία συνδέονται με εμφάνιση διάφορων ειδών CMT είναι τα *GJB1(CMTX1)*, *MFN2(CMT2A)* και *MPZ(CMT1B)*. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ακόμα και ανάμεσα σε ασθενείς που φέρουν την ίδια μεταλλαγή στο ίδιο γονίδιο, τα συμπτώματα μπορούν είναι διαφορετικά ανάλογα με το αν πάσχουν από την αυτοσωμικά επικρατή ή υπολειπόμενη μορφή της νόσου. Διαφορές παρατηρήθηκαν στα αποτελέσματα MRI των κάτω άκρων ανάμεσα σε ασθενείς με επικρατή και υπολειπόμενη μορφή CMT λόγω μεταλλαγής του γονιδίου *GDAP1*. Οι ασθενείς με την επικρατή μορφή παρουσίαζαν προβλήματα στους μύες του οπίσθιου τμήματος του ποδιού, ενώ οι υπόλοιποι παρουσίαζαν λιπώδη φλεγμονή στους μύες του προσθιοπλευρικού τμήματος. Η χρήση NGS έχει βοηθήσει σημαντικά στη διάγνωση καθώς επιτρέπει την αλληλούχιση πολλαπλών γονιδιακών θέσεων σε όλο το γονιδίωμα του ασθενή, κάτι πολύ σημαντικό λόγω της ετερογένειας που έχει η CMT για αυτό και χρησιμοποιούνται πιο συχνά πάνελ που στοχεύουν συγκεκριμένα γονίδια CMT (Kim et al., 2021; Pipis et al., 2019).

3.1.6.6 Νωτιαία παρεγκεφαλιδική αταξία - Spinocerebellar ataxia (SCA)

Η νωτιαία παρεγκεφαλιδική αταξία είναι μια ομάδα γενετικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από προβλήματα ισορροπίας και συντονισμού κινήσεων, και

κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Υπάρχουν 48 είδη SCA που οφείλονται σε μεταλλαγές 36 γονιδίων. Όσον αφορά τη διάγνωση, οι ασθενείς εξετάζονται αρχικά μέσω γενετικών τεστ για την ύπαρξη επαναλήψεων CAG, και εάν το τεστ είναι αρνητικό χρησιμοποιούνται WES και πάνελ γονιδίων. Τα συχνότερα είδη SCA που παρατηρούνται είναι οι SCA2, SCA1, SCA3, SCA6 και SCA7. Η συχνότητα του κάθε είδους διαφέρει ανά γεωγραφική περιοχή, καθώς για παράδειγμα η SCA3 θεωρείται η πιο συχνή παγκοσμίως όμως δεν έχει εντοπιστεί ποτέ στους κατοίκους της Πολωνίας (Sun et al., 2021).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Πλεονεκτήματα των NGS

Οι μέθοδοι NGS έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα που τις κάνουν να ξεχωρίζουν σε σύγκριση με τις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους. Το πρώτο και κυριότερο από αυτά είναι η υψηλή απόδοσή τους και η παραγωγή μεγάλου όγκου δεδομένων. Προσφέρουν τη δυνατότητα παράλληλης αλληλούχισης πολλαπλών τμημάτων DNA και μπορούν να παράγουν σε κάποιες περιπτώσεις μέχρι και ένα δισεκατομμύριο αλληλουχίες ανά κύκλο λειτουργίας (Metzker, 2010).

Επιπλέον οι NGS μπορούν να ανιχνεύσουν γενετικές παραλλαγές τις οποίες δεν ανιχνεύουν κλασικές μέθοδοι, όπως μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, ενθέσεις και απαλοιφές βάσεων, μετατοπίσεις και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (Ross & Cronin, 2011). Έχουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, γνώρισμα που είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε περιπτώσεις πολυμικροβιακών λοιμώξεων και στην ανάλυση καρκινικών γονιδιωμάτων, καθώς μπορούν εύκολα να ανιχνεύουν συλλοιμώξεις, λοιμώξεις από μικροοργανισμούς για τους οποίους δεν υπάρχουν πληροφορίες και *de novo* μεταλλαγές που προκαλούν διάφορους τύπους καρκίνου (Pitashny et al., 2022).

Τέλος, η αλληλούχιση μέσω NGS είναι πολύ πιο οικονομική σε σχέση με την αλληλούχιση κατά Sanger κυρίως όσον αφορά έρευνες μεγάλης κλίμακας και εξετάσεις ρουτίνας και τα αποτελέσματα λαμβάνονται πολύ πιο γρήγορα, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό σε περιπτώσεις επιδημιών, επείγουσες ιατρικές καταστάσεις και χρόνο-ευαίσθητα πειράματα (Ross & Cronin, 2011).

4.2 Μειονεκτήματα- περιορισμοί

Οι μέθοδοι NGS όπως και κάθε άλλη εργαστηριακή μέθοδος, παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψιν πριν την χρήση τους. Όσον αφορά τις μεθόδους NGS 2ης γενιάς, παρουσιάζουν μια μεγαλύτερη δυσκολία στη συναρμολόγηση εξ' αρχής, την ανίχνευση απλότυπου, ισομορφών και δομικών παραλλαγών. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα αλληλούχισης μόνο μικρών γονιδιωμάτων μήκους 200-600bp. Τη λύση σε αυτό δίνουν οι τεχνολογίες 3ης γενιάς οι οποίες προσφέρουν τη δυνατότητα αλληλούχισης τμημάτων DNA μήκους >10kb και ο χρόνος για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης είναι

μικρότερος. Όμως παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά σφάλματος και επηρεάζονται περισσότερο από το θόρυβο του υποβάθρου (Hu et al., 2021).

Ο όγκος των δεδομένων που παράγονται από την αλληλούχιση μέσω των NGS είναι τεράστιος και προκύπτει το πρόβλημα της διαχείρισής τους καθώς χρειάζονται εκτός από τις ειδικές πλατφόρμες που έχουν αναπτυχθεί και καλά εκπαιδευμένο προσωπικό που να μπορεί να διαβάσει σωστά τα αποτελέσματα και να ξεχωρίσει από όλες τις πληροφορίες τις κλινικά σημαντικές (Xuan et al., 2013).

Επιπλέον προκύπτουν ηθικοί προβληματισμοί όσον αφορά τα προσωπικά δεδομένα των ασθενών. Το κύριο ερώτημα είναι με ποιόν τρόπο πρέπει να γίνει η διαχείριση των γενετικών πληροφοριών των ασθενών έτσι ώστε να τηρηθεί το ιατρικό απόρρητο και αν μπορούν οι πληροφορίες αυτές να μοιραστούν μεταξύ επιστημονικού προσωπικού για τη βελτίωση των μεθόδων NGS (Pereira et al., 2020).

Τέλος, παρόλο που το κόστος της αλληλούχισης μέσω NGS έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, παραμένει υψηλό. Αυτό αποτελεί εμπόδιο στην υιοθέτησή τους ως εξέταση ρουτίνας, καθώς ανάλογα με τα μηχανήματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται το κόστος μπορεί να φτάσει από μερικές εκατοντάδες μέχρι μερικές χιλιάδες ευρώ ανά εξέταση.

4.3 Ο σημαντικός ρόλος των NGS στην εξατομικευμένη ιατρική

Το μέλλον των τεχνολογιών NGS είναι πολλά υποσχόμενο καθώς υπάρχουν διαρκώς νέες εξελίξεις και βελτιώσεις στην ακρίβεια που προσφέρουν και στη μείωση του ποσοστού σφαλμάτων.

Όσον αφορά στη διάγνωση των ασθενειών, οι τεχνολογίες NGS έχουν ήδη επιφέρει μια επανάσταση με την χρήση στοχευμένων πάνελ γονιδίων. Τα πάνελ αυτά διευκολύνουν την πρόωρη διάγνωση γενετικών ασθενειών, την πρόληψή τους και την έγκαιρη αντιμετώπισή τους. Άτομα με οικογενειακό ιστορικό και μη διάφορων ειδών καρκίνου και άλλων κληρονομικών ασθενειών έχουν τη δυνατότητα μέσω των τεχνολογιών NGS να προλάβουν την εμφάνισή τους και να τις αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά.

Επίσης, μέσω των NGS είναι δυνατή η δημιουργία εξατομικευμένων θεραπειών. Η λεπτομερής ανάλυση του γονιδιώματος των ασθενών προσφέρει πληροφορίες για τις γονιδιακές ιδιαιτερότητές τους και το πώς αυτές επηρεάζουν την απόκρισή τους σε συγκεκριμένες θεραπείες. Έτσι, το είδος της θεραπείας και η δοσολογία του κάθε φαρμάκου μπορεί να προσαρμοστεί στις ανάγκες του καθενός, με αποφυγή ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων ή και μη λειτουργικότητάς του. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται ο κίνδυνος και η ταλαιπωρία του ασθενή αλλά και αποφεύγεται η περιττή χρήση αναποτελεσματικών θεραπειών.

Επιπλέον, εκτός από τις γενετικές ασθένειες, σημαντικός παραμένει ο ρόλος των τεχνολογιών NGS στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από γνωστούς και μη οργανισμούς. Ειδικότερα, προσφέρουν τη δυνατότητα της λεπτομερούς αλληλούχισης του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών, χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας η οποία είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, αλλά και πληροφορίες σχετικά με τα γονίδια αντοχής των παθογόνων σε αντιβιοτικά, επιτρέποντας έτσι τη σωστή χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας. Αυτό είναι πολύ σημαντικό ιδιαίτερα σε επείγουσες καταστάσεις όπως η εμφάνιση σήψης, καθώς η άμεση χορήγηση θεραπείας είναι κρίσιμη για την επιβίωση του ασθενή. Η αλληλούχιση του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών είναι σημαντική και για την επιδημιολογία, καθώς βοηθάει στην παρακολούθηση γενετικών παραλλαγών που μπορεί να οδηγήσουν σε εξάρσεις.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι τεχνολογίες NGS αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο στον τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής, προσφέροντας τη δυνατότητα μιας πιο στοχευμένης και αποτελεσματικής προσέγγισης στο κομμάτι της διάγνωσης και της θεραπείας. Υπάρχει μια ποικιλία NGS 2ης και 3ης γενιάς, καθεμία από τις οποίες έχει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα, όμως η διαρκής εξέλιξη της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοτεχνολογίας βοηθάει στη βελτίωσή τους και στην ανάπτυξη νέων και καλύτερων μεθόδων. Έχουν ήδη βοηθήσει σημαντικά στη διευκόλυνση της έγκαιρης διάγνωσης λοιμώξεων, διαφόρων ειδών καρκίνου και άλλων γενετικών ασθενειών και στη σωστή αντιμετώπισή τους, μειώνοντας και την ταλαιπωρία των ασθενών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εφεύρεση μεθόδων αλληλούχισης του γενετικού υλικού αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις στην ιστορία της Βιολογίας, μετά την ανακάλυψη του μοντέλου της διπλής έλικας του DNA. Η μέθοδος αλληλούχισης τερματισμού αλυσίδας κατά Sanger βοήθησε στην αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, και το 2004 στην πλήρη χαρτογράφηση και αλληλούχιση των γονιδίων του ανθρώπου με το Πρόγραμμα Αλληλούχισης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project). Αποτέλεσε επίσης πρότυπο για την ανάπτυξη νέων, πιο σύγχρονων τεχνολογιών αλληλούχισης, οι οποίες ονομάστηκαν τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς. Οι πρώτες από αυτές είναι οι τεχνολογίες αλληλούχισης 2ης γενιάς με πιο γνωστές τις Roche, Ion torrent, SOLiD και Illumina, με την τελευταία να είναι σήμερα η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη. Στη συνέχεια ακολούθησαν οι τεχνολογίες αλληλούχισης 3ης γενιάς όπως η μονομοριακή αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο και η αλληλούχιση με τη χρήση νανοπόρων, οι οποίες επιτρέπουν παραγωγή αλληλουχιών μεγαλύτερου μήκους. Μέσω των τεχνολογιών αυτών μπορεί να γίνει αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού, αλληλούχιση μόνο των εξωνίων του αλλά και στοχευμένη αλληλούχιση συγκεκριμένων γονιδίων. Για αυτόν τον λόγο αποτελούν σημαντικό κομμάτι της εξατομικευμένης ιατρικής. Όσον αφορά τις λοιμώξεις επιτρέπουν την αλληλούχιση και ταυτοποίηση τόσο γνωστών όσο και μη παθογόνων και τον εντοπισμό τυχόν γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά, κάτι που βοηθάει στην έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπιση της λοίμωξης. Έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου και άλλων γενετικών ασθενειών, καθώς με τη βοήθεια τους έχουν δημιουργηθεί ειδικά πάνελ γονιδίων συνδεδεμένων με την εμφάνιση νόσων, μέσω των οποίων γίνεται γενετικός έλεγχος των ασθενών και δημιουργείται ειδική θεραπεία με βάση τα ξεχωριστά χαρακτηριστικά και τα είδη των μεταλλαγών που εμφανίζει ο κάθε ασθενής.

ABSTRACT

The invention of genetic material sequencing methods is one of the most important discoveries in the history of Biology, following the discovery of the DNA double helix structure. Sanger's chain termination sequencing method helped decipher the human genome and led, in 2004, to the complete mapping and sequencing of human genes through the Human Genome Project. It also served as the standard for creating newer, more advanced sequencing methods, called next generation sequencing or NGS. The first methods developed were the second-generation sequencing technologies such as Roche, Ion torrent, SOLiD and Illumina, the latter currently being the most widely used. The third generation sequencing methods that followed, such as Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing and nanopore sequencing, allow the production of longer reads. NGS methods can be used for Whole Genome Sequencing (WGS), Whole Exome Sequencing (WES) and even targeted sequencing of specific genes. This is why they form an important aspect of personalized medicine. When it comes to infections they allow the sequencing and identification of both known and unknown pathogens as well as the detection of antibiotic resistance genes, which helps in the timely and effective treatment of the infection. They also play a significant role in the prevention and early diagnosis of cancer and other genetic diseases by use of targeted gene panels, which allow for the genetic screening of patients and the creation of treatments tailored to the specific characteristics and the type of mutations that each individual may carry.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akhtar, M., & Elliott, P. (2018). The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Global Cardiology Science and Practice*, 2018(3). <https://doi.org/10.21542/gcsp.2018.36>
- Athanasopoulou, K., Boti, M. A., Adamopoulos, P. G., Skourou, P. C., & Scorilas, A. (2022). Third-generation sequencing: The spearhead towards the radical transformation of modern genomics. *Life*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/life12010030>
- AVENIO Tumor Tissue CGP Kit V2. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://sequencing.roche.com/global/en/products/group/avenio-tumor-tissue-cgp-kit.html>
- Avila, M., & Meric-Bernstam, F. (n.d.). *Next-Generation Sequencing for the General Cancer Patient*.
- Ávila-Ríos, S., Parkin, N., Swanstrom, R., Paredes, R., Shafer, R., Ji, H., & Kantor, R. (2020). Next-generation sequencing for HIV drug resistance testing: Laboratory, clinical, and implementation considerations. In *Viruses* (Vol. 12, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12060617>
- Bhojar, R. C., Jain, A., Sehgal, P., Divakar, M. K., Sharma, D., Imran, M., Jolly, B., Ranjan, G., Rophina, M., Sharma, S., Siwach, S., Pandhare, K., Sahoo, S., Sahoo, M., Nayak, A., Mohanty, J. N., Das, J., Bhandari, S., Mathur, S. K., ... Sivasubbu, S. (2021). High throughput detection and genetic epidemiology of SARS-CoV-2 using COVIDSeq next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247115>
- Boers, S. A., Jansen, R., & Hays, J. P. (2019). Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 38, Issue 6, pp. 1059–1070). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03520-3>
- Bonaventura, J., Polakova, E., Vejtasova, V., & Veselka, J. (2021). Genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms221910401>
- Brown, N. A., & Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2019). *Enabling Precision Oncology Through Precision Diagnostics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis>
- Cardiovascular | NGS Panels: centogene.com. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.centogene.com/diagnostics/our-tests/ngs-panels/cardiovascular>
- Chan, C. K., Low, J. S. Y., Lim, K. S., Low, S. K., Tan, C. T., & Ng, C. C. (2020). Whole exome sequencing identifies a novel SCN1A mutation in genetic (idiopathic) generalized epilepsy and juvenile myoclonic epilepsy subtypes. *Neurological Sciences*, 41(3), 591–598. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-04122-9>
- Chandy, T. (2023). Intervention of next-generation sequencing in diagnosis of Alzheimer's disease: challenges and future prospects. In *Dementia e Neuropsychologia* (Vol. 17). Associacao Arquivos de Neuro-Psiquiatria. <https://doi.org/10.1590/1980-5764-DN-2022-0025>
- Chen, M., & Zhao, H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. In *Human genomics* (Vol. 13, Issue 1, p. 34). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0220-8>

- Chen, S., Kang, Y., Li, D., & Li, Z. (2022). Diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing for the detection of pathogens in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary infections: Systematic review and meta-analysis. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 122, pp. 867–873). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.054>
- Cho, Y. U. (2024). The role of next-generation sequencing in hematologic malignancies. In *Blood Research* (Vol. 59, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/s44313-024-00010-0>
- Demetri, G. D., De Braud, F., Drilon, A., Siena, S., Patel, M. R., Cho, B. C., Liu, S. V., Ahn, M. J., Chiu, C. H., Lin, J. J., Goto, K., Lee, J., Bazhenova, L., John, T., Fakih, M., Chawla, S. P., Dziadziuszko, R., Seto, T., Heinzmann, S., ... Rolfo, C. (2022). Updated Integrated Analysis of the Efficacy and Safety of Entrectinib in Patients With NTRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 28(7), 1302–1312. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3597>
- Diao, Z., Han, D., Zhang, R., & Li, J. (2022). Metagenomics next-generation sequencing tests take the stage in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Journal of Advanced Research*, 38, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.09.012>
- Doan, T., Wilson, M. R., Crawford, E. D., Chow, E. D., Khan, L. M., Knopp, K. A., O'Donovan, B. D., Xia, D., Hacker, J. K., Stewart, J. M., Gonzales, J. A., Acharya, N. R., & DeRisi, J. L. (2016). Illuminating uveitis: Metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0344-6>
- Dorado, G., Gálvez, S., Budak, H., Unver, T., & Hernández, P. (2019). Nucleic-acid sequencing. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering* (Vols. 1–3, pp. 443–460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08998-4>
- Duan, H., Li, X., Mei, A., Li, P., Liu, Y., Li, X., Li, W., Wang, C., & Xie, S. (2021). The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05746-5>
- Easton, D. F., Pharoah, P. D. P., Antoniou, A. C., Tischkowitz, M., Tavtigian, S. V., Nathanson, K. L., Devilee, P., Meindl, A., Couch, F. J., Southey, M., Goldgar, D. E., Evans, D. G. R., Chenevix-Trench, G., Rahman, N., Robson, M., Domchek, S. M., & Foulkes, W. D. (2015). Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *New England Journal of Medicine*, 372(23), 2243–2257. <https://doi.org/10.1056/nejmsr1501341>
- Eidefors, A., & Ab, B. (2015). *Strategies for de novo DNA sequencing*. <https://www.researchgate.net/publication/268048875>
- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., & Ysebaert, M. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: Primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*, 260(5551), 500–507. <https://doi.org/10.1038/260500a0>
- FoundationOne CDx | Foundation Medicine. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.foundationmedicine.com/test/foundationone-cdx>
- Friedman, C. F., Hainsworth, J. D., Kurzrock, R., Spigel, D. R., Burris, H. A., Sweeney, C. J., Meric-Bernstam, F., Wang, Y., Levy, J., Grindheim, J., Shames, D. S., Schulze, K., Patel, A., & Swanton, C. (2022). Atezolizumab Treatment of Tumors with High Tumor Mutational Burden from

- MyPathway, a Multicenter, Open-Label, Phase IIa Multiple Basket Study. *Cancer Discovery*, 12(3), 654–669. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0450>
- GenCC genes with classifications. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://search.thegencc.org/>
- Gu, L., Liu, W., Ru, M., Lin, J., Yu, G., Ye, J., Zhu, Z. A., Liu, Y., Chen, J., Lai, G., & Wen, W. (2020). The application of metagenomic next-generation sequencing in diagnosing Chlamydia psittaci pneumonia: A report of five cases. *BMC Pulmonary Medicine*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-020-1098-x>
- Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>
- Harbin, L. M., Gallion, H. H., Allison, D. B., & Kolesar, J. M. (2022). Next Generation Sequencing and Molecular Biomarkers in Ovarian Cancer—An Opportunity for Targeted Therapy. *Diagnostics*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040842>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. In *Genomics* (Vol. 107, Issue 1, pp. 1–8). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Hilt, E. E., & Ferrieri, P. (2022). Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. In *Genes* (Vol. 13, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes13091566>
- Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., & Zamir, A. (1965). STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3664), 1462–1465. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.147.3664.1462>
- Home - OMIM. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.omim.org/>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hussen, B. M., Abdullah, S. T., Salihi, A., Sabir, D. K., Sidiq, K. R., Rasul, M. F., Hidayat, H. J., Ghafouri-Fard, S., Taheri, M., & Jamali, E. (2022). The emerging roles of NGS in clinical oncology and personalized medicine. In *Pathology Research and Practice* (Vol. 230). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153760>
- Illumina DNA Prep | Flexibility for many genome sequencing applications. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/illumina-dna-prep.html>
- Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit | Sensitive viral detection. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/respiratory-virus-oligo-panel.html>
- James, C. A., Jongbloed, J. D. H., Hershberger, R. E., Morales, A., Judge, D. P., Syrris, P., Pilichou, K., Domingo, A. M., Murray, B., Cadrin-Tourigny, J., Deprez, R. L., Celeghein, R., Protonotarios, A., Asatryan, B., Brown, E., Jordan, E., McLaughon, J., Thaxton, C., Kurtz, C. L., & Van Tintelen, J. P.

- (2021). International Evidence Based Reappraisal of Genes Associated With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Using the Clinical Genome Resource Framework. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, 14(3), E003273.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.120.003273>
- Kalayinia, S., Goodarzynejad, H., Maleki, M., & Mahdih, N. (2018). Next generation sequencing applications for cardiovascular disease. In *Annals of Medicine* (Vol. 50, Issue 2, pp. 91–109). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1392595>
- KAPA HyperPlus Kits. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://sequencing.roche.com/global/en/products/group/kapa-hyperplus-kits.html>
- Kerr, K. M., Bibeau, F., Thunnissen, E., Botling, J., Ryška, A., Wolf, J., Öhrling, K., Burdon, P., Malapelle, U., & Büttner, R. (2021). The evolving landscape of biomarker testing for non-small cell lung cancer in Europe. In *Lung Cancer* (Vol. 154, pp. 161–175). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.02.026>
- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer’s Disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106–1125.
<https://doi.org/10.2174/1570159x18666200528142429>
- Kim, H. S., Kim, H. J., Nam, S. H., Kim, S. B., Choi, Y. J., Lee, K. S., Chung, K. W., Yoon, Y. C., & Choi, B. O. (2021). Clinical and neuroimaging features in charcot-marie-tooth patients with gdap1 mutations. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*, 17(1), 52–62.
<https://doi.org/10.3988/jcn.2021.17.1.52>
- Komulainen-Ebrahim, J., Schreiber, J. M., Kangas, S. M., Pylkäs, K., Suo-Palosaari, M., Rahikkala, E., Liinamaa, J., Immonen, E. V., Hassinen, I., Myllynen, P., Rantala, H., Hinttala, R., & Uusimaa, J. (2019). Novel variants and phenotypes widen the phenotypic spectrum of GABRG2-related disorders. *Seizure*, 69, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.03.010>
- Lesage, S., & Brice, A. (2009). Parkinson’s disease: From monogenic forms to genetic susceptibility factors. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 18, Issue R1). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp012>
- Levy, S. E., & Boone, B. E. (2019). Next-generation sequencing strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025791>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, X., Chen, Y., Ouyang, H., Liu, J., Luo, X., Huang, Y., Chen, Y., Ma, J., Xia, J., & Ding, L. (2021). Tuberculosis Diagnosis by Metagenomic Next-generation Sequencing on Bronchoalveolar Lavage Fluid: a cross-sectional analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 104, 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.063>
- Mangolini, A., Rocca, C., Bassi, C., Ippolito, C., Negrini, M., Dell’Atti, L., Lanza, G., Gafà, R., Bianchi, N., Pinton, P., & Aguiari, G. (2022). Detection of disease-causing mutations in prostate cancer by NGS sequencing. *Cell Biology International*, 46(7), 1047–1061.
<https://doi.org/10.1002/cbin.11803>

- Marcus, L., Lemery, S. J., Keegan, P., & Pazdur, R. (2019). FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3753–3758. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4070>
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. In *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (Vol. 9, pp. 387–402). <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
- Mardis, E. R. (2019). The impact of next-generation sequencing on cancer genomics: From discovery to clinic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036269>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA (DNA chemistry/dimethyl sulfate cleavage/hydrazine/piperidine). In *Biochemistry* (Vol. 74, Issue 2).
- Mazzanti, A., Maragna, R., Vacanti, G., Monteforte, N., Bloise, R., Marino, M., Braghieri, L., Gambelli, P., Memmi, M., Pagan, E., Morini, M., Malovini, A., Ortiz, M., Sacilotto, L., Bellazzi, R., Monserrat, L., Napolitano, C., Bagnardi, V., & Priori, S. G. (2018). Interplay Between Genetic Substrate, QTc Duration, and Arrhythmia Risk in Patients With Long QT Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(15), 1663–1671. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.01.078>
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>
- Méjécasse, C., Malka, S., Guan, Z., Slater, A., Arno, G., & Moosajee, M. (2020). Practical guide to genetic screening for inherited eye diseases. In *Therapeutic Advances in Ophthalmology* (Vol. 12). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2515841420954592>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 11, Issue 1, pp. 31–46). <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Moragues-Solanas, L., Scotti, R., & O’Grady, J. (2021). Rapid metagenomics for diagnosis of bloodstream and respiratory tract nosocomial infections: current status and future prospects. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(4), 371–380. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1906652>
- Morganti, S., Tarantino, P., Ferraro, E., D’Amico, P., Duso, B. A., & Curigliano, G. (2019). Next generation sequencing (NGS): A revolutionary technology in pharmacogenomics and personalized medicine in cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1168, pp. 9–30). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24100-1_2
- Mosele, F., Remon, J., Mateo, J., Westphalen, C. B., Barlesi, F., Lolkema, M. P., Normanno, N., Scarpa, A., Robson, M., Meric-Bernstam, F., Wagle, N., Stenzinger, A., Bonastre, J., Bayle, A., Michiels, S., Bièche, I., Rouleau, E., Jezdic, S., Douillard, J. Y., ... André, F. (2020). Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. In *Annals of Oncology* (Vol. 31, Issue 11, pp. 1491–1505). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014>
- Mosele, M. F., Westphalen, C. B., Stenzinger, A., Barlesi, F., Bayle, A., Bièche, I., Bonastre, J., Castro, E., Dienstmann, R., Krämer, A., Czarnecka, A., Meric-Bernstam, F., Michiels, S., Miller, R.,

- Normanno, N., Reis-Filho, J., Remon, J., Robson, M., Rouleau, E., ... André, F. (2024). Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2024.04.005>
- MuSeek Library Preparation Kit, Illumina compatible*. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1361>
- Nagahashi, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Kameyama, H., Takabe, K., Okuda, S., & Wakai, T. (2019). Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Science*, *110*(1), 6–15. <https://doi.org/10.1111/CAS.13837>
- Nan, X., Zhang, Y., Su, N., Yang, L., & Pan, G. (2022). Application Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Bloodstream Infections in Pediatric Patients Under Intensive Care. *Infection and Drug Resistance*, *15*, 1911–1920. <https://doi.org/10.2147/IDR.S357162>
- Neurology | NGS Panels: centogene.com*. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.centogene.com/diagnostics/our-tests/ngs-panels/neurology>
- Nextera XT DNA Library Prep Kit | Sequence small genomes, plasmids, cDNA*. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-xt-dna.html>
- Ogawa, K., Okuno, T., Hosomichi, K., Hosokawa, A., Hirata, J., Suzuki, K., Sakaue, S., Kinoshita, M., Asano, Y., Miyamoto, K., Inoue, I., Kusunoki, S., Okada, Y., & Mochizuki, H. (2019). Next-generation sequencing identifies contribution of both class I and II HLA genes on susceptibility of multiple sclerosis in Japanese. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1551-z>
- Ostberg, N. P., Zafar, M. A., Ziganshin, B. A., & Elefteriades, J. A. (2020). The genetics of thoracic aortic aneurysms and dissection: A clinical perspective. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10020182>
- Overbeek, R., Leitl, C. J., Stoll, S. E., Wetsch, W. A., Kammerer, T., Mathes, A., Böttiger, B. W., Seifert, H., Hart, D., & Dusse, F. (2024). The Value of Next-Generation Sequencing in Diagnosis and Therapy of Critically Ill Patients with Suspected Bloodstream Infections: A Retrospective Cohort Study. *Journal of Clinical Medicine*, *13*(2). <https://doi.org/10.3390/jcm13020306>
- Papadopoulou, E., Bouzarelou, D., Tsaousis, G., Papathanasiou, A., Vogiatzi, G., Vlachopoulos, C., Miliou, A., Papachristou, P., Prappa, E., Servos, G., Ritsatos, K., Seretis, A., Frogoudaki, A., & Nasioulas, G. (2023). Application of next generation sequencing in cardiology: current and future precision medicine implications. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 10). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1202381>
- Pereira, R., Oliveira, J., & Sousa, M. (2020). Bioinformatics and computational tools for next-generation sequencing analysis in clinical genetics. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm9010132>
- Peri, A. M., Harris, P. N. A., & Paterson, D. L. (2022). Culture-independent detection systems for bloodstream infection. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 28, Issue 2, pp. 195–201). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.039>

- Pettersson, E., Lundeberg, J., & Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. In *Genomics* (Vol. 93, Issue 2, pp. 105–111). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.10.003>
- Pipis, M., Rossor, A. M., Laura, M., & Reilly, M. M. (2019). Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 15, Issue 11, pp. 644–656). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0254-5>
- Pitashny, M., Kadry, B., Shalaginov, R., Gazit, L., Zohar, Y., Szwarcwort, M., Stabholz, Y., & Paul, M. (2022). NGS in the clinical microbiology settings. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.955481>
- Pohl, D., Keller, P. M., Bordier, V., & Wagner, K. (2019). Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next generation sequencing. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 25, Issue 32, pp. 4629–4660). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i32.4629>
- Qian, M., Li, C., Zhang, M., Zhan, Y., Zhu, B., Wang, L., Shen, Q., Yue, L., Chen, H., & Cheng, Y. (2023). Blood metagenomics next-generation sequencing has advantages in detecting difficult-to-cultivate pathogens, and mixed infections: results from a real-world cohort. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1268281>
- Rebuzzi, F., Ulivi, P., & Tedaldi, G. (2023). Genetic Predisposition to Colorectal Cancer: How Many and Which Genes to Test? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24032137>
- Reilly, M. M., Murphy, S. M., & Laurá, M. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2011.00324.x>
- Representation of classifications in ClinVar*. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/clinsig/>
- Rodino, K. G., & Simner, P. J. (2024). Status check: next-generation sequencing for infectious-disease diagnostics. *Journal of Clinical Investigation*, 134(4). <https://doi.org/10.1172/JCI178003>
- Ross, J. S., & Cronin, M. (2011). Whole cancer genome sequencing by next-generation methods. In *American Journal of Clinical Pathology* (Vol. 136, Issue 4, pp. 527–539). <https://doi.org/10.1309/AJCPR1SVT1VHUGXW>
- Salemi, M., Lanza, G., Salluzzo, M. G., Schillaci, F. A., Di Blasi, F. D., Cordella, A., Caniglia, S., Lanuzza, B., Morreale, M., Marano, P., Tripodi, M., & Ferri, R. (2023). A Next-Generation Sequencing Study in a Cohort of Sicilian Patients with Parkinson’s Disease. *Biomedicines*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123118>
- Sanger, F., Brownlee, G. G., & Barrell, B. G. (1965). A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 13(2), 373–398. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80104-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80104-8)
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (*DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174*) (Vol. 74, Issue 12).
- Sanger Sequencing Method: Principle and Steps • Microbe Online*. (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://microbeonline.com/dna-sequencing-sanger-sequencing-method/>

- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. In *Biology* (Vol. 12, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Selvakumar, S. C., Preethi, K. A., Ross, K., Tusubira, D., Khan, M. W. A., Mani, P., Rao, T. N., & Sekar, D. (2022). CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of Cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01565-1>
- Shademan, B., Biray Avci, C., Nikanfar, M., & Nourazarian, A. (2021). Application of Next-Generation Sequencing in Neurodegenerative Diseases: Opportunities and Challenges. In *NeuroMolecular Medicine* (Vol. 23, Issue 2, pp. 225–235). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12017-020-08601-7>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Chapman, M., Evans, K., Azevedo, L., Hayden, M., Heywood, S., Millar, D. S., Phillips, A. D., & Cooper, D. N. (2020). The Human Gene Mutation Database (HGMD®): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Human Genetics*, 139(10), 1197–1207. <https://doi.org/10.1007/S00439-020-02199-3>
- Stenzinger, A., Vogel, A., Lehmann, U., Lamarca, A., Hofman, P., Terracciano, L., & Normanno, N. (2024). Molecular profiling in cholangiocarcinoma: A practical guide to next-generation sequencing. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 122). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102649>
- Sturm, A. C., Knowles, J. W., Gidding, S. S., Ahmad, Z. S., Ahmed, C. D., Ballantyne, C. M., Baum, S. J., Bourbon, M., Carrié, A., Cuchel, M., de Ferranti, S. D., Defesche, J. C., Freiburger, T., Hershberger, R. E., Hovingh, G. K., Karayan, L., Kastelein, J. J. P., Kindt, I., Lane, S. R., ... Rader, D. J. (2018). Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 72, Issue 6, pp. 662–680). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>
- Subbiah, V., Cassier, P. A., Siena, S., Garralda, E., Paz-Ares, L., Garrido, P., Nadal, E., Vuky, J., Lopes, G., Kalemkerian, G. P., Bowles, D. W., Seetharam, M., Chang, J., Zhang, H., Green, J., Zalutskaya, A., Schuler, M., Fan, Y., & Curigliano, G. (2022). Pan-cancer efficacy of pralsetinib in patients with RET fusion–positive solid tumors from the phase 1/2 ARROW trial. *Nature Medicine*, 28(8), 1640–1645. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01931-y>
- Subbiah, V., Puzanov, I., Blay, J. Y., Chau, I., Lockhart, A. C., Raje, N. S., Wolf, J., Baselga, J., Meric-Bernstam, F., Roszik, J., Diamond, E. L., Riely, G. J., Sherman, E. J., Riehl, T., Pitcher, B., & Hyman, D. M. (2020). Pan-cancer efficacy of vemurafenib in brafv600-mutant non-melanoma cancers. *Cancer Discovery*, 10(5), 657–663. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1265>
- Sun, H., Shen, X. R., Fang, Z. B., Jiang, Z. Z., Wei, X. J., Wang, Z. Y., & Yu, X. F. (2021). Next-generation sequencing technologies and neurogenetic diseases. In *Life* (Vol. 11, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11040361>

- Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. In *Trends in genetics : TIG* (Vol. 30, Issue 9, pp. 418–426). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- TruSight Hereditary Cancer Panel | Target 113 cancer-associated genes.* (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-cancer-hereditary.html>
- TruSight Oncology 500 | Enable CGP utilizing DNA and RNA from FFPE.* (n.d.). Retrieved September 7, 2024, from <https://www.illumina.com/products/by-type/clinical-research-products/trusight-oncology-500.html>
- Varret, M., Abifadel, M., Rabès, J. P., & Boileau, C. (2008). Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. In *Clinical Genetics* (Vol. 73, Issue 1, pp. 1–13). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00915.x>
- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1525, pp. 3–33). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. In *Clinical Chemistry* (Vol. 55, Issue 4, pp. 641–658). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171:4356, 171(4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Wilson, M. R., Sample, H. A., Zorn, K. C., Arevalo, S., Yu, G., Neuhaus, J., Federman, S., Stryke, D., Briggs, B., Langelier, C., Berger, A., Douglas, V., Josephson, S. A., Chow, F. C., Fulton, B. D., DeRisi, J. L., Gelfand, J. M., Naccache, S. N., Bender, J., ... Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. *New England Journal of Medicine*, 380(24), 2327–2340. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1803396>
- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L., & Shi, L. (2013). Next-generation sequencing in the clinic: Promises and challenges. In *Cancer Letters* (Vol. 340, Issue 2, pp. 284–295). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.025>
- Yadav, D., Patil-Takbhate, B., Khandagale, A., Bhawalkar, J., Tripathy, S., & Khopkar-Kale, P. (2023). Next-Generation sequencing transforming clinical practice and precision medicine. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 551). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117568>
- Yuan, D., Shen, L., Qin, B. E., Xu, X., Su, Z., Liu, J., Xia, H., Peng, F., & Jiang, Y. (2023). Central nervous system nocardiosis diagnosed by metagenomic next-generation sequencing: A case series and literature review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 32(12), 1453–1463. <https://doi.org/10.17219/acem/175818>
- Zhao, M., Qi, S., Sun, Y., & Zheng, X. (2024). Comparison of polymerase chain reaction and next-generation sequencing with conventional urine culture for the diagnosis of urinary tract infections: A meta-analysis. *Open Medicine (Poland)*, 19(1). <https://doi.org/10.1515/med-2024-0921>
- Zheng, Y., Qiu, X., Wang, T., & Zhang, J. (2021). The Diagnostic Value of Metagenomic Next-Generation Sequencing in Lower Respiratory Tract Infection. In *Frontiers in Cellular and*

Infection Microbiology (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.694756>

Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., & Li, M. M. (2020). Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Annals of Laboratory Medicine*, 41(1), 25–43.
<https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>