

## Využití NGS analýz RNA v onkogenetice

Petra Kleiblová<sup>1,2</sup>, Marta Černá<sup>1</sup>, Petra Zemánková<sup>1</sup>, Petr Nehasil<sup>1</sup>, CZEKANCA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ÚLBDL 1. LF UK a VFN v Praze; <sup>2</sup>ÚBLG 1. LF UK a VFN v Praze; <sup>3</sup>konsorcium

**Úvod:** Zavedení sekvenování nové generace (NGS) do diagnostiky dědičné nádorové predispozice je významným přínosem, protože umožňuje komplexní analýzu exonů a přilehlých intronových oblastí známých predispozičních genů v krátkém čase. Testování s využitím NGS s sebou ale nese také úskalí v podobě identifikace řady variant nejasného klinického významu (VUS), které interpretaci nálezu komplikují, včetně variant potenciálně postihujících sestřih pre-mRNA. Komplikací RNA analýz nádorových predispozičních genů bývá často jejich nízká exprese (pouze v jednotkách na milion transkriptů, TPM), proto není vhodné pro tato vyšetření využívat přístup RNAseq (sekvenování celého transkriptomu).

**Cíle:** Cílem práce bylo zavedení RNA analýz přístupem cíleného NGS a následně i) identifikovat, jaké se u nádorových predispozičních genů vyskytují alternativní sestřihové varianty a v kontextu s touto znalostí ii) posoudit, zda VUS identifikované na úrovni DNA postihují proces sestřihu mRNA (aberantní sestřih).

**Metodika:** Vyšetřeny byly vzorky RNA od pacientů s nádorovým onemocněním, u kterých byla na úrovni zárodečné DNA identifikována variant potenciálně postihující sestřih mRNA. Pro vyšetření byla využita celková RNA z leukocytů periferní nesrážlivé krve (odběr do Tempus™ Blood RNA Tube) a izolovaná s využitím Tempus™ Spin RNA Isolation Kit podle protokolu výrobce. Příprava RNA knihovny byla provedena pomocí KAPA HyperCap Workflow v3.0 s využitím KAPA RNA HyperPrep kit a hybridizačních prób KAPA HyperChoice (vše Roche), sekvenování pomocí NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 cyklů) na přístroji NextSeq (Illumina). Sekvenční data byla hodnocena s využitím bioinformatického přístupu SpliceLauncher, vizualizace nálezů pomocí prohlížeče Integrative Genomics Viewer (IGV).

**Výsledky:** Zavedený přístup umožnil identifikovat alternativní sestřihové varianty vyskytující se v RNA z leukocytů periferní nesrážlivé krve v nádorových predispozičních genech (včetně APC, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, RAD51C, RAD51D a TP53). Se znalostí tohoto pozadí následně interpretovat dopad u > 100 testovaných VUS na sestřih mRNA.

**Závěr:** Cílená NGS analýza RNA umožňuje komplexně testovat expresi a přítomnost alternativních i aberantních sestřihových variant v nádorových predispozičních genech. Optimalizací přístupu je možno vyšetřit také nízkce exprimované geny. Kapacita vyšetření je srovnatelná s NGS analýzami prováděnými na úrovni DNA. Limitací přístupu je proti DNA analýzám podmínka, že daný gen zájmu musí být ve vyšetřované tkáni exprimovaný. NGS analýza na úrovni RNA je vhodným doplňkem k rutinně prováděným DNA vyšetřením, který umožňuje v řadě případů překlasifikovat VUS na pravděpodobně benigní/patogenní, a tím zlepšit proces diagnostiky nádorové predispozice.

*Práce byla podpořena projekty MZ ČR NU20-03-00285, NU20-03-00283, NV18-03-00024 a RVO-VFN 64165.*