

Kam směřuje molekulárně-genetická analýza

Brdička R.

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Porovnání současných sekvenačních metod, analýza jejich výsledků, analytická a klinická interpretace. Pokus o výhled do budoucnosti.

Typ studie: Přehledná práce.

Název a sídlo pracoviště: Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha 4.

V rámci současného rozvoje sekvenčních metod vrhli výrobci na trh řadu strojů, které jsou schopny během několika dnů sestavit kompletní sekvenční lidského genomu. Metodické principy se příliš neliší a vycházejí z přístupu použitého již při původní analýze sekvenční v rámci projektu HGP, který skončil v roce 2003, tj. ze stanovení sekvenční krátkých úseků a jejich následného pospojování počítačovým programem. Cena analýzy jednoho vzorku stále klesá a předpokladem je její snížení v roce 2013 na 1000 USD za vzorek. Poklesem nákladů se možnosti využití celogenomového sekvenování stávají stále dostupnějšími, a proto začínají získávat na významu i jako nástroj genetického testování. Stávají se tak i předmětem konkurenčního boje mezi výrobci, kteří své „sekvenátory“ nové generace nepřetržitě zdokonalují – zvyšují jejich výkon a použitelnost v nejrůznějších aplikacích. Postupně vrůstá i použitelnost jejich výsledků v praktické lékařské diagnostice, která začíná nabízet nebyvalé množství dat.

Do genetické molekulární diagnostiky vstoupil nový fenomén – celogenomové sekvenování. Naše instituce by k této situaci měly přistupovat racionálně a investovat tak, abychom příliš nezaostali, udrželi v této oblasti s celosvětovým vývojem krok, ale vybavili se jen takovým množstvím přístrojů, které dokážeme optimálně využít, protože lze oprávněně předpokládat, že zlepšování bude rychle pokračovat a stroje, které budou k dispozici za několik málo let, budou ještě výkonnější a dokonalejší. Také se značně zvýší kvalita interpretace získaných nálezů.

Klíčová slova: sekvenace nové generace, celogenomová sekvenace, analytická interpretace, klinická interpretace, příští vývoj.

SUMMARY

Brdička R.: Where is the molecular genetic analysis heading?

The review has been focused on the last decade of progress in sequencing technologies and possibilities of analyzing larger and larger genomes including the whole human genome. New technologies are making WGS cheaper and reaching the sum of 1000 USD for human WGS is supposed to come in 2013. In spite of the fact that at present the time necessary for getting the assembled fragments takes several days in case of human genome and cost of one run may be several times more than 1000 USD many such devices are being constructed and sold. Step by step not only analytical procedures based on sequencing of amplified small fragments or direct sequencing of isolated DNA strains, but also the interpretation starting from the analytical process to clinical interpretation is taking place.

WGS seems to become more and more helpful method in genetic testing, offering an enormous amount of data to be analyzed and interpreted, and in a few years it will most probably become a useful tool also in medical practice.

Key words: new generation sequencing, whole genome sequencing, analytical interpretation, clinical interpretation, next developments.

Úvod

Sekvenování nové generace

Podle bulletinu firmy Pacific BioSciences „Beyond Next Generation DNA Sequencing Single Molecule Real Time (SMRT™) Technology“ z ledna 2010 dospěl vývoj technologií sekvenování do třetí generace strojů, které tyto analýzy vykonávají. Jestliže výchozím způsobem sekvenování byl Sangerův postup založený na „terminační dideoxy“ metodě, na separaci oligonukleotidů vzniklých elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a na jejich detekci stříbřením, v případě radioaktivně označených na citlivé fotografické vrstvě, nebo později nahrazenou kapilární elektroforézou a fluorescenčním značením, patří stroje založené na tomto způsobu analýzy a detekce do nejstarší a tedy první generace sekvenačních technologií. Takové

stroje se také v rámci projektu HGP účastnily analýzy sekvenční lidského genomu v ohromném nasazení, připomínajícím historické manufaktury. Dodnes jsou úspěšně používané a patrně nejrozšířenější; najdeme je vybavené jednou nebo více kapilárami v nabídce řady společností. Tímto způsobem byly analyzovány části molekul DNA běžně v délce několika set nukleotidů – ve spíše výjimečných případech blíží se 1000. Analýza sekvenční proto byla a je zahajována rozbitím nativních molekul DNA na fragmenty – vytvořením tzv. knihovny fragmentů, které – protože vznikají z velkého počtu výchozích DNA molekul – se v různé míře navzájem překrývají a tyto překryvy umožňují jejich vzájemné pospojování a sestavení nukleotidové sekvenční značné délky [18]. Již v projektu HGP si navzájem konkurovaly dva přístupy, které se lišily právě v délce primárních fragmentů.

Tato situace trvá do dneška. V současnosti používané stroje (2. generace) se mimo jiné také liší v délce používaných fragmentů. Jejich technologická rozrůzněnost narostla do veliké šíře, ale většinou vycházejí z identifikace nukleotidů postupně zařazovaných při syntéze komplementárního řetězce (pyrosekvenace). Účelem tohoto článku však není rozebírání jednotlivých postupů, které používají různí výrobci těchto strojů „druhé generace“, proto odkážeme na jejich webové stránky, popř. videoklipy, v nichž popisují použité metodické principy [16]. Výčet firem a zařízení, která zde uvedeme (tab. 1) není jistě kompletní, ale je výběrem z těch novějších, neboť na trhu se objevují stále nové s „dokonalejší“ technologií, s vyšší výkonností, a především nižšími náklady na provoz.

Table 1 Basic data of sequencing machines

Device, Producer	Minimal amount of DNA per sample	Time of reading (size of individual DNA segments)	Time required for analysis including computing [§]	Price of the device in		
				US\$	€	CZK
Ion Torrent, Life Technologies	1 ug	100–200	* 100 MB 2–3 h	110 000 – approx. 1.9 mil		approx. 14.5 thousands
GS Junior, Roche 454	500 ng	400	*	– 120 000 approx. 3.7 mil	– 1200	approx. 35 thousands
MiSeq, Illumina	50 ng	35–150	*	125 000 – approx. 2.2 mil	400–750 –	7.2–13.5 thousands
PACBIO RSPacific Biosciences	500 ng–1 ug	1500	ø 120 min < 100GB 24h	695 000	280	approx. 7.0 thousands
HeliScope Helicos	10 ng	25–55	* §§ 30 GB 8 days	800 000 approx. 14.4m	18 000	§§approx. 324 thousands

[§]according to size of the analyzed genome

^{§§}approx. 10-fold covering of the complete human genome

*plasmids usually less than one hour, bacterial genomes several hours, human genome several days

(Data of producers are approximate and subject to frequent changes.)

Data were obtained from producers or distributors.

Řada firem deklaruje, že již před mnoha lety vyslovenou předpověď snížení nákladů na sekvenaci celého lidského genomu na 1000 \$ dosáhnou v roce 2013.

Přesune-li se sekvenování nových generací, ať už v podobě sekvenování transkriptomu nebo exomu [19] nebo jen vybraných oblastí, do rutinní molekulární diagnostiky (což se již začíná dít – nabídka firmy Gendia), pak zahrne všechny pracovníky s tímto vývojem spojené – od laboratoří po kliniky – ohromným množstvím dat, přirovnávaných k informační tsunami. Zpracování takového množství dat bude náročné z hlediska počítačového vybavení, a to již na úrovni laboratorní, kdy půjde jen o zhodnocení kvality a zhodnocení výsledků sekvenace. Data bude třeba nejen analyzovat, ale i ukládat a přenášet. V tomto směru se uvažuje o úrovni petabytové. Mnohem obtížnější pak bude jejich klinická interpretace, při níž bude nutné zvažovat všechny možné interakce, v první řadě mezigenové, ale i na dalších

úrovních vedoucích k fenotypu. A abychom se neomezili pouze na genom, cestou k fenotypu bude třeba zhodnotit i všechny uvažovatelné vlivy, které se podílejí na jeho formování.

Pro porovnání strojů, které lze řadit do druhé generace sekvenátorů můžeme použít tabulku prezentovanou v práci Metzker [16] a její doplnění o některé stroje novější (viz tab 1). Z hlediska trhu je nejúspěšnějších jen několik málo firem, protože se zřejmě na trhu objevily dříve než ostatní a nepochybně i proto, že měly vhodnou marketingovou strategii. I když mapa, kterou najdete na následující adrese, není nejčerstvější, napoví mnohé a nejen o výrobcích (<http://pathogenomics.bham.ac.uk/hts/>). (Podle informací od výrobců operujících na našem trhu disponujeme momentálně (březen 2011) v ČR pěti stroji.)

Interpretace analytická

Dnes se stává, že jsou tyto stroje uváděny na trh již na úrovni funkčních prototypů, které jsou postupně zdokonalovány, a tak během prvních let jejich výroby dochází k mnoha úpravám a vylepšením. Principy těchto nových sekvenačních metod jsou podobné a mohli bychom se na ně dívat z mnoha hledisek, z nichž některé jsou vyjádřeny již v uvedené tabulce 1. Tak například pro sekvenaci „de novo“ jsou výhodnější delší fragmenty, mívají však problémy s homopolymerními i poměrně krátkými sekvencemi, u většiny těchto strojů existují tzv. hluchá místa, s méně jednoznačnými výsledky, kdy je třeba použít zkušenost nebo problematické místo analyzovat klasickou sekvencí (nebo jiným typem sekvenátoru). V tomto směru mají výhodu resekvenační postupy, které používají již známou sekvenci jako pořadač. Zatím jsou všechny zmiňované stroje

z hlediska analýzy velkých genomů (lidského) „pomale“. Ačkoliv určení sekvencí jednotlivých fragmentů trvá většinou jen několik minut až hodin (podle velikosti genomu), jejich uspořádání do plynulé sekvence velkých genomů počítačem prodlouží celkovou dobu analýzy na několik dnů. V tomto směru mají výhodu malé genomy – mitochondriální [7], a parazitické, např. bakterií nebo virů, a využívat bychom mohli WGS již dnes, kdybychom bychom dokázali odhadovat jejich vlastnosti na základě znalosti jejich genomu

Na rozdíl od klasické sekvenace, kdy kvalitu výsledku a celý proces může prakticky ovládat technik, pro správnou funkci těchto nových přístrojů je nezbytné odpovídající počítačové i personální vybavení. V týmech používajících stroje nové generace se proto objevují bioinformatici [12, 13] jako jejich neodmyslitelná a nezbytná součást. A opět dochází, zatím v zahraničí, k tomu, co si pamatujeme z doby projektu HGP, k centralizaci vybavení i personálu. Obávám se, že česká touha masírovaná marketingem, aby každá molekulárně-genetická laboratoř měla svůj stroj druhé nebo dokonce třetí generace je scestná, neboť je v současných cenových relacích principiálně neekonomická. Stroje dnes zastarávají takovou rychlostí, že je nutné je maximálně využívat, tedy nikoliv pouze během pracovní doby, ale nepřetržitě jen s přestávkami na potřebnou údržbu.

Některé údaje o novějších strojích najdete v tabulce 1, která pochopitelně neobsahuje kompletní sadu údajů, neboť byly jen částečně dostupné a kromě toho někdy i obtížně srovnatelné a v žádném případě neukazují na jejich kvalitu, např. nároky na kvalifikaci obsluhy, robustnost – odolnost proti prostředí, špatnému zacházení a další důležité parametry, jako je např. chybovost, pro niž obecně platí, že čím kratší jsou odečítané fragmenty, tím je vykazovaná chybovost menší. Rovněž nezbytné počítačové vybavení je jen u některých přístrojů součástí „stroje“. Důležitým parametrem je např. kolikrát je daný úsek přečten, nicméně tento ukazatel bývá uváděn jen jako průměrná hodnota, která však může značně kolísat. Například u přístroje Heliscope se v rámci WGS přečte celý lidský genom téměř 10krát.

Vyhodnocením sekvence a jejím porovnáním se standardem, což jsou v případě lidského genomu výsledky HGP a dalších projektů zabývajících se lidským genomem – např. mutačními odchylkami (mutom) [5], jeho variabilitou (variom) [20] – dokážeme zjistit, v čem se analyzovaný vzorek liší. Dokážeme také odlišit převážně homozygotní úseky od spíše heterozygotních [14]. Ukázalo se, že lidský zárodečný genom je zřejmě variabilnější, než jsme předpokládali – nejen v množství jednonukleotidových odchylek typu SNP, či ztrát (delecí) nebo zisků (insercí), ale i opakování (CNV) nebo přesunů [10], a proto byl původní cíl analyzovat 1000 individuálních genomů rozšířen na počet 2500. To se týká ve stejné, nebo dokonce větší míře genomů somatických buněk (nádorových) [2]. Současné sekvenátory mohou být zapojeny i do hledání získaných (somatických) mutací, ale i epigenetických studií [23]. U somatických mutací hraje významnou roli citlivost metody, neboť výchozí vzorek často obsahuje směs

buněk, z nichž některé postihly nově vzniklé změny, avšak ostatní buňky jsou vybaveny nezměněným zárodečným genomem.

Interpretace klinická

V souvislosti s potřebami sekvenční výsledky nějak interpretovat vznikla a vzniká celá řada počítačových programů, které se zabývají nejen interpretací analytickou [5], ale začínají se uplatňovat i v interpretaci klinické, bez níž by sice šlo o biologicky zajímavé výsledky, ale bez lékařského využití.

Tato poslední, ale pro nás nejdůležitější fáze se však teprve začíná rozvíjet, neboť zatím nemáme dostatek znalostí, abychom vždy dokázali vyvodit, jaký je význam té které nalezené „odchylky“ v rámci celého genomu, a jak může ovlivňovat fenotyp nositele. Poměrně dobře se orientujeme v případech jednoduše dědičných záležitostí [6, 25], kdy již k interpretaci klinické můžeme dospět zároveň s interpretací analytickou, např. u známých mutací, avšak zvláště u komplexních chorob, a to jsou ty nejběžnější, je situace natolik složitá, že nám ještě nějakou dobu potrvá, než se budeme moci odpovědně dopouštět nějakých závěrů [3].

V každém případě musíme již dnes počítat s tím, že množství údajů o našich genomech bude rychle přibývat a měli bychom se připravit na to, že s těmito informacemi budeme muset zacházet. Jistě mnohem rychleji budou přibývat výsledky sekvenování malých genomů, pro medicínu rovněž důležitých, neboť některé stroje jsou pro takové analýzy ideální a mohly by nahradit nejen pracnější, ale i zdoluhavější procedury testující např. vlastnosti mikroobů, pokud ovšem dostatečně pokročí znalosti o vztahu struktury mikrobiálních genomů k jejich funkčním vlastnostem. Z lidského genomu se to bude týkat především mitochondriální DNA [7], ale i vybraných částí centrálního genomu [11]. Dnes dokážeme, a řada firem takové služby nabízí, oddělit např. DNA určitých chromozomů nebo podstatně snížit celkovou délku analyzované sekvence izolací transkriptovaných (transkriptom), nebo jen translatovaných úseků (exom).

Diskuse

Podstatnými otázkami, které ovlivňují naše výhledy do budoucnosti molekulárně-genetické diagnostiky, je především otázka nákladů. Přestože každé zdokonalení v jakémkoliv oboru lidské činnosti bylo vždy provázeno zvýšením nákladů, nechceme to v medicíně připustit, neboť je oborem, v němž se investice zdánlivě nevracejí. Pokud nemocnost obyvatelstva stoupá, jistě také díky jeho stárnutí a nepříznivým vlivům vnějšího prostředí, je nasnadě, že i kdybychom abdikovali na pokrok v medicíně a chtěli jen udržovat status quo, náklady zdravotní péče se stejně budou zvyšovat. A budeme-li chtít zdravotní péči zlepšovat, porostou tím více. V tom tkví další z podstatných otázek naší současnosti – chceme podporovat pokrok v medicíně? Je-li módou dneška

zdůrazňování personalizace medicíny na genomové úrovni [1, 9], tak se to týká nejen léčení, ale především diagnostiky, která v oblasti chorob s genetickou příčinou nebo dědičnou komponentou začínala od vyhledávání odpovědných genů, jejich částí a identifikace jejich změn, a v posledních letech pak dokázala analyzovat více genů najednou v jednom vzorku, aby dnes dopěla k možnosti analyzovat celý genom – všechny jeho geny v jednom analytickém procesu. A tím se dostáváme ke třetí základní otázce.

Kdy bychom se do takové analýzy měli pouštět? Jako dosud, až klinik dospěje k názoru, že by takové vyšetření potřeboval, aby upřesnil svůj náález a stanovil diagnózu nemocného, nebo by bylo šikovnější znát genetickou výbavu člověka co nejdříve, abychom mohli uvažovat o vhodné prevenci podobně, jako to umožňuje novorozenecký nebo dokonce fetální screening [8]. Již pro rok 2011 se uvažuje v USA o zavedení screeningu pro více než 400 geneticky podmíněných vzácných chorob [15, 21]. K takovému rozhodnutí lze dospět racionální ekonomickou úvahou, neboť náklady na jednotlivá vyšetření jsou rozhodně vyšší, nicméně nelze vyloučit zábrany etické a v jejich důsledku i právní. Nezbytnost rozhodnutí se neodbytně blíží, neboť již dnes začínáme uvažovat o zatím často ještě komerčně nedostupné čtvrté generaci sekvenačních strojů [22].

Patologický fenotyp nemusí vznikat jen na podkladě z generace na generaci přenesených mutací (změn) genotypu, které jsou vysloveně patogenní, ale i „nevhodnou“ kombinací „zdravých“ haplogenomů pocházejících z rodičovských gamet [14, 24]. Kromě toho i během našeho života dochází ke změnám v genotypu, které mohou u některých buněk vést k jejich nádorovému zvrhnutí.

A tak před námi stojí otázky – vstoupíme do genomového období vyzbrojeni odpovídající technikou? Když ano, tak s větším ekonomickým a strategickým

rozmyslem. Dokážeme si však poradit se získanými výsledky, jak technicky (počítačové vybavení), tak po stránce etické a právní?

Závěry

Celogenomové sekvenování na úrovni lidského zárodečného genomu, v nejrůznějších podobách – např. omezené na exom, transkriptom, vybrané chromozomální úseky, nebo dokonce na jeho změny při kancerogenezi [17] se stává dostupným způsobem genetického testování a je spíše jen otázkou času, kdy se natolik rozšíří i v našich končinách, že bude použitelné v širším měřítku nejen ve výzkumu, ale i v rámci zdravotní péče. Předpokladem jsou nejen nezbytné náklady, jejich přijatelnost, ale i užitečnost. Současné investiční náklady se pohybují v několika milionech, (2–10 podle stroje) a provozní dosahují u lidského genomu zatím až 100 tisíc na jednu analýzu a jistě by byly již dnes přijatelné pro určitou skupinu osob. Neekonomičnost současného použití v grantových projektech je dána požadavky grantových agentur, které nechápou, že mnohem efektivnější je utrácet grantové prostředky za služby než vyžadovat, aby každý výzkumník si vše dělal vlastníma rukama. Závažnějším problémem také zůstává klinická užitečnost a smysluplnost, která není zatím dostatečně vysoká, pokud nebereme v úvahu hodnotu vědeckou. Nicméně i zde dosahuje svět značného pokroku a zřejmě není daleko doba, kdy kompletní vyšetření celého genomu bude nejen ekonomicky srovnatelné s vyšetřením jednotlivých genů, ale bude mít i dostatečnou užitnou hodnotu. A na takovou situaci bychom se měli připravit, nejen prakticky, ale i teoreticky – **především pochopit, co to bude pro nás znamenat. Zatím se však zdá, že technologie celogenomového sekvenování předbíhají naše schopnosti je klinicky využít.**

Table 2. Links

Web sites of some producers of machine for the NGS:	
Life Sciences	http://www.iontorrent.com/ion-personal-genome-machine-sequencer/
	http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid-next-generation-sequencing.html
Roche	http://www.454.com/
Illumina	http://www.illumina.com/technology/sequencing_technology.ilmn
Pacific Biosciences	http://www.pacificbiosciences.com/
	+ video http://www.pacificbiosciences.com/video_lg.html
	http://storage.pardot.com/1652/53311/SMRT_Sequencing_Whitepaper_January_2010.pdf
Helicos	http://www.helicosbio.com/
	+ video http://www.helicosbio.com/Technology/tabid/62/Default.aspx
	+ video http://www.helicosbio.com/Technology/TrueSingleMoleculeSequencing/tabid/64/Default.aspx
Oxford NANOPORE Technologies	http://www.nanoporetech.com/
	+ video http://www.nanoporetech.com/sequences (zatím komerčně nedostupný)
Accompanying computer equipment:	
CLC bio	http://www.clcbio.com/
Quantum. StorNext.	http://www.quantum.com/StorNext

Programs for the interpretation:	
GenoLogicS GeneusTMNext Gen	http://www.ienablenextgen.com/
Genomic Next-Generation Universal Mapper (GNUMAP) algorithm	http://dna.cs.byu.edu/gnumap/
Avadis NGS	http://www.strandsi.com/Products http://www.avadis-ngs.com/
Galaxy (7th EU Project GALAXY 2007-2013)	http://galaxy-project.org
Genome Trax™	http://www.biobase-international.com/index.php?id=genometrax
Web sites:	
Range of services – genetic testing by NGS:	
Gendia	http://www.gendia.net/
Eureka Genomics	http://www.eurekagenomics.com/
Worldwide deployment of machines for NGS:	http://pathogenomics.bham.ac.uk/hts/
Quality assurance of genetic testing:	http://www.currentprotocols.com/protocol/hg1707

Použité zkratky:

NGS – sekvenování nové generace
WGS – celogenomové sekvenování
HGP – projekt sekvenování lidského genomu
SNP – jednonukleotidový polymorfismus
CNV – variabilita v počtu opakování
STR – krátké tandemové repetice

Literatura

- Ashley, E. A., Butte, A. J., Wheeler, M. T. et al.** Clinical assessment incorporating a personal genome. *The Lancet*, 2010, 375, 9725, p. 1525–1535.
- Berger, M. F., Lawrence, M. S., Demichelis, F. et al.** The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*, 2011, 470, p. 214–220.
- Burgess, D. J.** Human Disease: Next-generation sequencing of the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, 2011, 12, 2, p. 78–79.
- Chen, R., Skogerbo, G.** Bioinformatics – Mining the genome for information *Frontiers of Electrical and Electronic Engineering in China*, 2010, 5, p. 391–404.
- Chen, J. M., Férec, C., Cooper, D. N.** Revealing the human mutome. *Clin. Genet.*, 2010, 78, 4, p. 310–320.
- Corbett, M., Gecz, J.** Great expectations: using massively parallel sequencing to solve inherited disorders. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2010, 10, 7, p. 833–836.
- Fendt, L., Zimmermann, B., Daniaux, M., Parson, W.** Sequencing strategy for the whole mitochondrial genome resulting in high quality sequences. *BMC Genomics*, 2009, 10, art. no. 139.
- Greely, H. T.** Get ready for the flood of fetal gene screening. *Nature*, 2011, 469, 7330, p. 289–291.
- Grimaldi, D., Claessens, Y. E., Mira, J. P., Chiche, J. D.** Beyond clinical phenotype: The biologic integratome. *Critical Care Medicine*, 2009, 37, 1 SUPPL., p. S38 to S49.
- Grossmann, V., Kohlmann, A., Klein, H-U. et al.** Targeted next-generation sequencing detects point mutations, insertions, deletions and balanced chromosomal rearrangements as well as identifies novel leukemia-specific fusion genes in a single procedure. *Leukemia*, 2011, 13, 2), p. 129–136.
- Holcomb, C. L., Höglund, B., Anderson, M. W. et al.** A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens*, 2011, 77, 3, p. 206–217.
- Horner, D. S., Pavesi, G., Castrignanò, T. et al.** Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Brief Bioinform.*, 2010, 11, 2, p. 181–197.
- Koboldt, D. C., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K.** Challenges of sequencing human genomes. *Briefings in Bioinformatics*, 2010, 11, 5, p. 484–498.
- Ku, C. S., Naidoo, N., Teo, S. M., Pawitan, Y.** Regions of homozygosity and their impact on complex diseases and traits. *Human Genetics*, 2011, 129, 1, p. 1–15.
- Lagrove, K.** New test screens for hundreds of rare and fatal childhood genetic diseases. *Medill Reports 2011*. Dostupné na [www: http://news.medill.northwestern.edu/chicago/news.aspx?id=178597](http://news.medill.northwestern.edu/chicago/news.aspx?id=178597).
- Metzker, M. L.** Sequencing technologies – the next generation. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, 11, 1, p. 31–45.
- Meyerson, M., Gabriel, S., Getz, G.** Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, 11, 10, p. 685–696.
- Miller, J. R., Koren, S., Sutton, G.** Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 2010, 95, 6, p. 315–327.
- Montenegro, G., Powell, E., Huang, J. et al.** Exome sequencing allows for rapid gene identification in a Charcot-Marie-Tooth family. *Annals of Neurology*, 2011.
- Patrinos, G. P., Al Aama, J., Al Aqeel, A. et al.** Recommendations for genetic variation data capture in developing countries to ensure a comprehensive worldwide data collection. *Human Mutation*, 2011, 32, 1, p. 2–9.
- Pacxman, R.** New genetic screening test for rare diseases to be launched in US. *BioNews*. Dostupné na [www: http://www.bionews.org.uk/page_89649.asp?dinfo=1SPLGOVxNO](http://www.bionews.org.uk/page_89649.asp?dinfo=1SPLGOVxNO).

22. **Perkel, J.** Making contact with sequencing's fourth generation. *BioTechniques*, 2011, 50, 2, p. 93–95.
23. **Roukos, D. H.** Next-generation sequencing and epigenome technologies: Potential medical applications. *Expert Review of Medical Devices*, 2010, 7, 6, p. 723 to 726.
24. **Singleton, A. B., Hardy, J., Trynor, B. J., Houlden, H.** Towards a complete resolution of the genetic architecture of disease. *Trends in Genetics*, 2010, 26, 10, p. 438–442.
25. **Zaghloul, N. A., Katsanis, N.** Functional modules, mutational load and human genetic disease. *Trends in Genetics*, 2010, 26, 4, p. 168–176.

Práce byla podpořena grantem IGA 9804.

Do redakce došlo dne 8. 3. 2011.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Radim Brdička
Ústav experimentální medicíny AV ČR
Víteňská 1083
142 20 Praha 4
e-mail: Radim.Brdicka@uhkt.cz