

Uporaba tehnologij sekvenciranja v farmakogenomiki

Next-generation sequencing in pharmacogenomics

Urška Janžič¹, Teja Petra Muha¹, Jernej Kovač^{2,3}, Barbara Jenko Bizjan^{2,3}, Vita Dolžan¹

¹Laboratorij za farmakogenetiko, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

²Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

³Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana

Avtor za korespondenco:

Prof. dr. Vita Dolžan, dr. med., spec. lab. med. gen.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana
e-pošta: vita.dolzan@mf.uni-lj.si

POVZETEK

Genetska variabilnost v farmakogenih, to je genih, ki vplivajo na absorpcijo, porazdelitev, presnovo, učinkovanje in izločanje zdravil, lahko pomembno vpliva na posameznikov odziv na zdravilo ter posledično na učinkovitost zdravljenja in pojav neželenih učinkov zdravila. Kljub vedno večjemu številu na dokazih temelječih farmakogenetskih priporočil se farmakogenetsko testiranje le počasi uvaja v klinično prakso. Eden izmed razlogov so omejitve pri določanju farmakogenetskih različic. V klinični praksi se za njihovo določanje najpogosteje izvaja tarčno farmakogenetsko testiranje, osredotočeno le na določeno število genetskih različic in na le nekatere, najpogosteje preverjene farmakogene. V zadnjih letih se raziskave usmerjajo v preučevanje podatkov, pridobljenih s sekvenciranjem celotnega eksoma ali genoma, ki omogočajo testiranje več različic hkrati v relativno kratkem času in opredelitev kompleksnih farmakofenotipov. Kompleksni farmakofenotip lahko opredeljuje prisotnost več farmakogenetskih različic in/ali redkih različic, ki vplivajo na presnovo zdravil ali odgovor na zdravljenje. Metode, ki temeljijo na sekvenciranju, omogočajo identifikacijo redkih različic, pa tudi večjih strukturnih različic.

Namen prispevka je predstaviti prednosti in pomanjkljivosti tarčnih metod genotipizacije, metod sekvenciranja celotnega eksoma in genoma ter poudariti pomen razvoja ustreznih bioinformatičnih orodij za učinkovito farmakogenetsko analizo, ki bi pospešila prenos znanstvenih izsledkov v klinično prakso.

Ključne besede: farmakogenetika, farmakogenomika, sekvenciranje naslednje generacije, kompleksni farmakogeni, bioinformatična orodja

ABSTRACT

Genetic variability in pharmacogenes, i.e. genes that affect absorption, distribution, metabolism, action and excretion of drugs, can significantly affect an individual's response to a drug and, consequently, the effectiveness of treatment and the occurrence of adverse drug reactions. Despite the increasing number of evidence-based pharmacogenetic recommendations, pharmacogenetic testing is being only slowly introduced into clinical practice. One of the reasons is the limitation of the methods for determining »

pharmacogenetic variations. In clinical practice, targeted pharmacogenetic testing is most often performed, focusing only on a limited number of genetic variants and a few of the most frequently tested pharmacogenes. In recent years, research has focused on studying data obtained from whole exome or genome sequencing, which allows testing multiple variants simultaneously in a relatively short time and resolving complex pharmacophenotypes. A complex pharmacophenotype is defined by the presence of multiple pharmacogenetic variants and/or rare variants affecting drug metabolism or treatment response. Sequencing based methods enable identification of rare variants as well as large structural variants.

The purpose of the paper is to present the advantages and disadvantages of targeted genotyping methods, whole exome and genome sequencing methods, and to highlight the importance of developing appropriate bioinformatics tools for efficient pharmacogenetic analysis, which would accelerate the translation of scientific findings into clinical practice.

Keywords: pharmacogenetics, pharmacogenomics, next-generation sequencing, complex pharmacogenes, bioinformatics tools

UVOD

Farmakogenetika in farmakogenomika preučujeta, kako različice v genih za presnovne encime, prenašalce in tarče zdravilnih učinkovin (farmakogenih) vplivajo na učinkovitost zdravljenja in pojav neželenih učinkov zdravil (1-3). Izraz farmakogenetika se nanaša na preučevanje posameznih genov in znanih polimorfizmov, medtem ko farmakogenomika z uporabo genomskih tehnologij (sekveniranje celotnega genoma/eksoma) omogoča opredelitev genetskih različic v velikem številu genov naenkrat (4). Do danes so raziskovalci opisali že več kot 60.000 različic posameznih nukleotidov (SNV, angl. *single nucleotide variant*) (5) in več kot 200 strukturnih različic v okrog 200 farmakogenih (5-7). Te različice lahko vodijo v previsoko ali prenizko izpostavljenost zdravilu kot posledico počasnega oziroma hitrega presnavljanja zdravilne učinkovine zaradi spremenjene aktivnosti presnovnih encimov. Različice lahko vplivajo na interakcije s tarčami zdravil, povečajo

tvorbo toksičnih presnovkov ali aktivirajo imunski sistem. Ocenjujejo, da ima okoli 95 % posameznikov v evropski populaciji vsaj eno farmakogenetsko različico, ki je povezana s spremenjenim odzivom na zdravljenje (8, 9).

Glede na genotip lahko sklepamo na fenotip presnove preko posameznega encima in posameznika opredelimo kot počasnega (SM, angl. *slow metabolizer*), vmesnega oz. srednje hitrega (IM, angl. *intermediate metabolizer*), normalnega (NM, angl. *normal metabolizer*), hitrega (RM, angl. *rapid metabolizer*) ali ultrahitrega presnavjalca določenega zdravila (UM, angl. *ultrarapid metabolizer*) (3). Različni tip in opisi presnavjalcev so prikazani v Tabeli 1.

Na vpliv farmakogenetskih dejavnikov na presnovo zdravil in odgovor na zdravljenje opozarjajo tudi regulatorne agencije. Ameriška zvezna agencija za zdravila (FDA, angl. *Food and Drug Administration*) pri več kot 600 zdravilih v povzetku glavnih značilnosti zdravil podaja farmakogenetske informacije (14). Evropska agencija za zdravila (EMA, angl. *European Medicines Agency*) pa, kot navajajo Ehman in sodelavci, podaja tovrstna opozorila za vsaj 15 % zdravil (15).

Na podlagi obstoječih dokazov o povezanosti genetskih različic farmakogenov s hitrostjo presnove in odgovorom na zdravljenje z določenim zdravilom so različna strokovna združenja za številne pare gen-zdravilo že oblikovala klinično uporabna priporočila, ki omogočajo prilagoditev zdravljenja glede na posameznikov genotip oziroma fenotip. Priporočila, ki se redno posodablja, so zbrana v najpomembnejši podatkovni zbirki na področju farmakogenetike, Zbirki znanj o farmakogenomiki ClinPGx (16). Priporočila zajemajo nasvete glede prilagoditve odmerka, izbire druge zdravilne učinkovine oziroma spremljanja bolnikov z višjim genetsko pogojenim tveganjem za neučinkovitost zdravljenja ali pojav neželenih učinkov (16, 17).

Konzorcij za implementacijo klinične farmakogenetike (CPIC, angl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) podaja priporočila za več kot 150 parov gen-zdravilo (17), Nizozemska delovna skupina za farmakogenetiko (DPWG, angl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) pa za več kot 80 parov gen-zdravilo (18, 19). Navedena priporočila vključujejo okrog 50 farmakogenov z visoko ali zmerno visoko stopnjo dokazov o povezanosti genetskih različic z odgovorom na zdravljenje (16, 19). Med njimi najpomembnejših deset farmakogenov predstavljajo »

CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, G6PD, HLA-B, SLC01B1, CACNA1S, RYR1, MT-RNR1 in *IFNL4* (20). Ameriško Združenje za molekularno patologijo (AMP, angl. *Association for Molecular Pathology*) je v sodelovanju z omenjenimi strokovnimi združenji pripravilo klinično uporabna priporočila za genetsko testiranje in poročanje za *CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, TPMT, NUDT15, CYP3A4, CYP3A5, DPYD* (21). Kljub vedno večjemu številu na dokazih temeljčih priporočil pa se farmakogenetsko testiranje le počasi uvaja v klinično prakso. Med glavnimi razlogi so omejitve obstoječih metod, stroški testiranja in pomanjkanje ozaveščenosti in izobraževanj med zdravniki (22, 23).

Namen prispevka je predstaviti prednosti in pomanjkljivosti različnih pristopov za določanje farmakogenetskih različic, od konvencionalnih metod tarčne genotipizacije do sekvenciranja naslednje generacije, ter poudariti pomen razvoja bioinformatičnih orodij za učinkovito interpretacijo rezultatov farmakogenetske analize, določitev genotipov in poročanje, ki bi pospešila prenos znanstvenih izsledkov v klinično prakso.

Tabela 1: Tipi presnavljalcev zdravilnih učinkovin. V zadnjih letih se različna strokovna združenja in raziskovalne skupine trudijo doseči večjo usklajenost pri poimenovanju presnavljalcev zdravil. Poenotenje terminologije je pomembno za zagotavljanje doslednosti v znanstvenih raziskavah in klinični praksi. V ta namen je bil dosežen neke vrste konsenz (10), po katerem se presnavljalci delijo v naslednje kategorije: počasni, vmesni, normalni, hitri in ultrahitri presnavljalci (10–13).

Table 1: Types of drug metabolizers. In recent years, various pharmacogenetic working groups and research teams have been striving to standardize the nomenclature of drug metabolizer phenotypes. Standardizing terminology is important to ensure consistency in scientific research and clinical practice. A form of consensus has been reached (10), according to which drug metabolizers are classified into the following categories: slow, intermediate, normal, rapid, and ultrarapid metabolizers (10–13).

Tip presnavljalca	Opis
Počasni presnavljalci	Zaradi nizke encimske aktivnosti (ali odsotnosti aktivnosti) presnavljajo zdravila počasneje. Posledično so izpostavljeni večjim koncentracijam zdravila, pri njih obstaja večja verjetnost neželenih učinkov. Če gre za encim, ki aktivira predzdravilo, imajo taki bolniki manjše koncentracije aktivne učinkovine in posledično neodzivnost na terapijo.
Vmesni presnavljalci	Imajo povprečno hitro presnovo zdravil. Zdravilo se presnavlja hitreje kot pri počasnih presnavljalcih, vendar počasneje kot pri hitrih.
Normalni presnavljalci	Imajo povprečno hitro presnovo (imajo dva funkcionalna alela), ki omogoča predpis običajnega odmerka zdravila brez potrebnih prilagoditev.
Hitri presnavljalci	Zdravila presnavljajo hitreje, kar lahko zmanjša učinkovitost zdravila, saj se hitro izločijo iz telesa. Lahko potrebujejo višje odmerke zdravila.
Ultrahitri presnavljalci	Posamezniki z več kot dvema funkcionalnima aleloma imajo encimsko aktivnost večjo kot 100 % normalne aktivnosti, zato zdravila presnavljajo zelo hitro (do takega stanja pogosto pride zaradi pomnožitve gena; čim večje je število kopij aktivnega gena, večja je encimska aktivnost). Posledično imajo nižje koncentracije zdravila v krvi, kar vodi v neučinkovito terapijo. Če gre za encim, ki aktivira predzdravilo, imajo taki bolniki zelo visoke koncentracije aktivne učinkovine in posledično večje tveganje za neželene učinke.



METODE TARČNE GENOTIPIZACIJE ZA FARMAKOGENETSKO TESTIRANJE

Klinično implementacijo farmakogenetike je omogočil razvoj molekularnih tehnik z visoko občutljivostjo in specifičnostjo, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) (24). Do nedavnega je bilo farmakogenetsko testiranje v klinični praksi večinoma osredotočeno na analizo interakcij med posameznim zdravilom in genom, pri čemer so za genotipizacijo pogostih genetskih različic v posameznih farmakogenih uporabljali na PCR temelječe metode, kot sta 5'-3' eksonukleazni test (pristop TaqMan) (25) in kvantitativni alelni specifični PCR (angl. *allele-specific quantitative PCR*) (26, 27).

S klasičnimi metodami genotipizacije se v farmakogenetiki najpogosteje določa SNV, redkeje pa strukturne različice. Za določanje slednjih se pogosto uporabljata metodi verižne reakcije s polimerazo za dolge odseke DNA (angl. *long range PCR*) ali analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, angl. *restriction fragment length polymorphism*), ki pa sta delovno intenzivni in časovno bolj zamudni metodi (28). Bolj učinkovite so metode genotipizacije na mikromrežah, ki omogočajo hkratno genotipizacijo tudi več sto farmakogenetskih različic (tako SNV in redkeje kratkih insercij/delecij ali večjih strukturnih različic) (26). Izbira metode genotipizacije je odvisna predvsem od števila in vrste različic, ki jih želimo določiti, velikosti vzorca in cene (29).

Prednosti tarčnih metod genotipizacije sta njihova enostavnost izvedba in hitra dostopnost rezultata (30). Ker večinoma analiziramo pogoste funkcionalne genetske različice, za katere že obstajajo močni dokazi za njihovo povezanost z učinkovitostjo zdravila ali toksičnostjo, je relativno lahko interpretirati rezultate in podati poročilo.

Glavna omejitev metod tarčne genotipizacije farmakogenov je njihova osredotočenost na le določeno število genetskih različic in na le nekatere, najpogosteje preverjene farmakogene. Tarčne genotipizacijske metode zaznajo le vnaprej znane in izbrane genetske različice, ne omogočajo pa odkrivanja novih ali redkih različic izven nabo-

ra, ki ga test ciljano pokriva (18). Lopes in sodelavci so z *in silico* modeli pokazali, da bi pri 28 % preiskovancih s tarčnim sekvenciranjem izbranih farmakogenov zaznali vsaj eno klinično pomembno različico, ki bi jo s standardnimi tarčnimi genotipizacijskimi paneli spregledali (24).

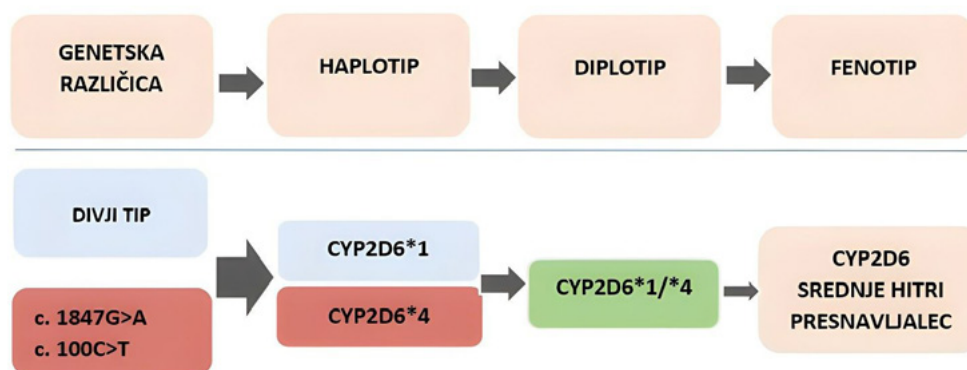
Prav tako s tarčnimi testi genotipizacije iščemo le najbolj značilne različice, ki označujejo določen pogost haplotip, čeprav so lahko te različice prisotne tudi na drugih, redkejših haplotipih, s tem pa povečamo možnost za napačno določitev fenotipa, zato je pomembno, da upoštevamo kombinacijo vseh prisotnih različic. Aleli farmakogenov so večinoma opredeljeni kot haplotipi, ki jih navajamo z zvezdico (angl. *star alleles*), npr. kot *CYP2D6**1 za normalen alel in *CYP2D6**4 za polimorfen alel. Na posameznem alelu je lahko prisotnih več genetskih različic, tako SNV, manjših insercij in delecij, kot tudi večjih strukturnih različic (31). Na Sliki 1 je prikazan proces določanja fenotipa na podlagi opredeljenih genetskih različic v farmakogenu *CYP2D6*.

Farmakogenetsko testiranje v klinični praksi

Tarčno farmakogenetsko testiranje se že uporablja v klinični praksi (32, 33). Primeri kliničnega farmakogenetskega testiranja so denimo analiza različic v genu tiopurin-S-metil-transferaza (*TPMT*) (33), ki je odgovoren za presnovo kemoterapevtikov azatioprina in 6-merkaptopurina ali testiranje genov *CYP2C9* in *VKORC1* pred zdravljenjem z varfarinom (32). V klinični praksi ločimo dva pristopa k farmakogenetskemu testiranju, reaktivno ali vnaprejšnje testiranje. Zdravniki se za farmakogenetsko testiranje pogosto odločijo šele, ko bolnik ni ustrezno odgovoril na zdravljenje ali pa je že izkusil neželene učinke zdravila; tak pristop imenujemo reaktivno testiranje. Za nekatere nova zdravila pa je že treba opraviti farmakogenetsko testiranje pred začetkom zdravljenja; na primer testiranje gena *CYP2C9* pred zdravljenjem s sponimodom (34) ter testiranje gena *CYP2C19* pred začetkom zdravljenja z mavakamtenom (35). Tak pristop imenujemo vnaprejšnje ali preemptivno farmakogenetsko testiranje. Takšen pristop je še zlasti pomemben v onkologiji, kjer so neželeni učinki zdravil lahko življenje ogrožajoči (18, 36, 37). Ker se s staranjem povečuje število predpisanih zdravil, se raziskave usmerjajo v preverjanje smiselnosti vnaprejšnjega farmakogenetskega testiranja za večji nabor parov gen-zdravilo (30, 37). Tako je raziskava PREPARE (angl. *PREemptive Pharmacogenomic testing for Preventing Adverse drug* »

REactions), ki je vključila 6.944 bolnikov iz sedmih evropskih držav, tudi iz Slovenije, za nabor 50 zdravil pokazala, da preemptivno genetsko testiranje 12 farmakogenov

in prilaganje zdravljenja genotipu omogočata bolj varno zdravljenje z manj neželenimi učinki kot zdravljenje po obstoječih kliničnih smernicah (37).



Slika 1: Proces določanja fenotipa na podlagi identificiranih genetskih razlik v genu *CYP2D6*. Z modro je obarvan normalni alel *1, ki je brez razlik (divji tip). Z rdečo so obarvane razlike na alelu *4. Razlika c.1847G>A povzroči preskakovanje eksona 3 in vodi v nastanek nefunkcionalnega encima. Ta razlika se pogosto deduje skupaj z razliko c.100C>T, ki nima vpliva na funkcionalnost encima (13). Skupaj alela opredeljujeta diplotip *CYP2D6**1/*4, obarvan z zeleno. Ta diplotip opredeljuje fenotip srednje hitrega presnavljalca *CYP2D6*.

Figure 1: The process of phenotype determination based on identified genetic variations in the *CYP2D6* gene. The normal allele *1, carries no variants and is shown in blue. Variants on the other allele, *4, are highlighted in red. The c.1847G>A variant leads to exon 3 skipping and results in a non-functional enzyme. This variant is frequently in linkage with c.100C>T, which does not impact enzyme functionality (13). The combined alleles form the *CYP2D6**1/*4 diplotype, highlighted in green. This diplotype translates into a predicted phenotype of *CYP2D6* intermediate metabolizer.

METODE SEKVENCIRANJA CELOTNEGA GENOMA V FARMAKOGENOMIKI

Z razvojem tehnologij sekvenciranja naslednje generacije (NGS, angl. *next generation sequencing*) se v zadnjih nekaj letih raziskave usmerjajo v preučevanje farmakogenomskih podatkov, pridobljenih s sekvenciranjem celotnega eksoma ali genoma (38), pri čemer rezultati kažejo visoko skladnost z rezultati tarčne genotipizacije (39–41). Za razliko od konvencionalnih metod tarčne genotipizacije, kjer je treba za vsako različico oz. nabor različic opraviti drug test, metode NGS omogočajo testiranje številnih različic hkrati v relativno kratkem času. Poleg tega podatki NGS omogočajo določanje različic v kodirajočih (eksom) in tudi v nekodirajočih regijah, kot tudi zaznavo v populaciji red-

kih, a za posameznika klinično pomembnih različic v farmakogenih, ki lahko vodijo v spremenjen odziv na zdravilo (38, 42). Vedno več študij poudarja pomembnost redkih različic v farmakogenih (5, 43). Po nekaterih ocenah naj bi redke različice predstavljale med 30 in 40 % funkcionalne variabilnosti v farmakogenih (43). V farmakogenetiki metode NGS postajajo vedno bolj zanimive za raziskovanje, pa tudi v klinični praksi.

NGS zajema različne tehnologije sekvenciranja, za katere je značilno, da omogočajo analizo velikega števila zaporedij hkrati (44). Ločimo tri različne pristope NGS: ciljno sekvenciranje izbranih kandidatnih lokusov, sekvenciranje celotnega eksoma (WES, angl. *whole exome sequencing*) in sekvenciranje celotnega genoma (WGS, angl. *whole genome sequencing*) (30). Metode NGS se v farmakogenetiki za zdaj uporabljajo pretežno v raziskovalne namene (42, 45, 46), pri čemer sta pomembni WES in WGS, ki omogočata prosto iskanje farmakogenetskih različic. WES je upo- »

raben predvsem za odkrivanje točkovnih genetskih različic, ki se nahajajo v kodirajočih predelih genoma. Glede določanja SNV je WES večinoma primerljiv s klasičnimi metodami genotipizacije, vendar ima to prednost, da lahko naenkrat zaznamo vse prisotne različice v eksonih. Več raziskav je pokazalo, da lahko za farmakogenetsko analizo ponovno uporabimo podatke WES, ki so bili pridobljeni med klinično diagnostiko redkih bolezni ali raka (9, 41, 46). Ponovna raba v okviru diagnostike že pridobljenih eksomskih podatkov zniža ceno analize in za posameznika ne predstavlja dodatne obremenitve, treba pa je pridobiti ustrezno obveščeno soglasje (41).

Ker eksom predstavlja le okrog 2 % celotnega genoma (47), v večini primerov WES ne omogoča, da bi pridobili vse pomembne farmakogenomske podatke (48). To se kot težava pokaže predvsem pri opredelitvi kompleksnih farmakofenotipov. Kot poročajo v nekaterih študijah, z WES niso uspeli opredeliti pomembnih farmakogenetskih različic, ki se nahajajo v promotorskih ali intronskih predelih (18, 48). Med pomembnimi farmakogeni, v katerih lahko z WES le delno opredelimo pomembne različice, ali pa jih sploh ne moremo opredeliti, so *CYP2C19*, *CYP3A5*, *IFNL3*, *VKORC1*, *CYP2D6*, *HLA-A*, *HLA-B* in *CFTR* (49). Reisberg in sodelavci z WES niso uspeli opredeliti različice *CYP2C19* c.-806C>T v promotorskem področju, ki opredeljuje alel *CYP2C19**17, kot tudi intronske različice *CYP3A5* c.219-237A>G, ki opredeljuje alel *CYP3A5**3. Posledično niso mogli podati ustreznih farmakogenetskih priporočil za 13 zdravil, na presnovo katerih po smernicah CPIC vpliva prisotnost teh alelov (31). Prav tako z WES ne moremo zaznati dodatne tandemske ponovitve dinukleotida TA v promotorskem področju (c.A(TA)₆TAA > A(TA)₇TAA), ki opredeljuje pomembno različico gena *UGT1A1**28. Homozigoti z genotipom *UGT1A1**28/*28 imajo ob zdravljenju s citostatikom irinotekanom povečano verjetnost za pojav nevropenije in življenjsko ogrožajočih neželenih učinkov, zato DPWG (angl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) pri nosilcih tega genotipa priporoča začetno zmanjšanje odmerka zdravila (50).

Ker z WES ne moremo določiti nekaterih klinično zelo pomembnih različic farmakogenov, se raziskave usmerjajo v WGS, ki omogoča tudi sekvenciranje nekodirajočih področij in lažje določanje strukturnih in redkih različic (38). V klinični praksi se predvsem v diagnostiki redkih bolezni in onkologiji zaradi nižje cene in manjše časovne za-

mudnosti pogosteje uporablja WES, (44). V farmakogenomiki pa je pomembno tudi natančno določanje strukturnih in redkih različic, saj le-te predstavljajo velik del farmakogenomske variabilnosti in vplivajo na odgovor na zdravlila. Tremmel in sodelavci so pokazali, da strukturne različice v nekodirajočih področjih predstavljajo približno 20 % funkcionalno pomembne variabilnosti v farmakogenih (51). Santos in sodelavci so na 2504 genomih in 59.898 eksomih opredelili nove delecije ali insercije v eksonih v kar 201 od 208 farmakogenov (97 %) (7). Tudi Gordon in sodelavci so pokazali, da je novih kar 90 % opredeljenih različic v eksonih farmakogenov, med katerimi je bilo tudi 12 genov iz družin *CYP*; od tega naj bi približno 30 % novih različic vplivalo na odgovor na zdravila (52). Rezultati študij o prisotnosti novih in redkih farmakogenetskih različic nakazujejo, da bi upoštevanje celovitih podatkov WGS lahko bistveno izboljšalo napovedi farmakofenotipov (30).

Sekvenciranje naslednje generacije v farmakogenomskih populacijskih študijah

Sekvenciranje celotnega eksoma in še posebej genoma se vedno bolj uporablja v populacijskih farmakogenomskih študijah, tako evropskih kot tudi neevropskih populacij (42, 45, 46). Ker trenutna farmakogenetska priporočila v veliki meri temeljijo na podatkih populacij evropskega porekla, to lahko vodi v napake pri opredelitvi farmakofenotipov in podajanju priporočil za posameznike neevropskega porekla. Pomanjkanje študij na neevropskih populacijah je tudi eden izmed razlogov za počasen prenos izsledkov raziskav v klinično prakso v svetovnem merilu (36).

Rezultati populacijskih študij so že pokazali razlike v pogostosti farmakogenetskih različic med etničnimi skupinami ali celo v tesno povezanih populacijah (45, 46, 53). Na primer, alel *CYP2C19**2 z izgubo funkcije in posledično slabšo aktivacijo inhibitorja agregacije trombocitov klopidozola, ima v populacijah evropskega porekla frekvenco okoli 15 %, v vzhodni Aziji pa okoli 30 % (54-56). Kennedy in sodelavci so pokazali na pristranskost komercialno dostopnih tarčnih testov genotipizacije, ki so prilagojeni za testiranje posameznikov evropskega porekla. Pri 1 % preiskovancev neevropskega porekla bi na podlagi rezultatov takšnega komercialnega testa posameznike opredelili kot normalne presnavjalce, medtem ko je analiza WGS pokazala, da so za to zdravilo dejansko vmesni ali slabi presnavjalci (57).

V slovenski populaciji je bila večina populacijskih farmakogenetskih študij izvedena s postopki tarčne genotipizacije posameznih genov ali nabora več genov v poteh presnove in/ali delovanja zdravil (37, 58-60). Hočevlar in sodelavci so s ponovno uporabo podatkov WES opredelili najpogostejše farmakogenetske različice pri približno 2000 posameznikih. Pokazali so na prisotnost 24 pomembnih farmakogenetskih različic, za katere po podatkih ClinPGx obstaja visoka ali zmerno visoka stopnja dokazov za povezanost s spremenjeno presnovo približno 25 zdravil. Poleg znanih farmakogenetskih različic so raziskovalci identificirali še 308 novih in/ali redkih različic, za katere so s pomočjo *in silico* napovednih orodij ocenili, da so patogene (61).

Populacijske farmakogenomske študije bodo z uporabo metod NGS omogočile opredelitev tako pogostih kot tudi redkih in novih različic v farmakogenih v določeni populaciji. Podatki tovrstnih študij predstavljajo temelj za pripravo priporočil za vnaprejšnje testiranje, s čimer bi preprečili pojav neželenih učinkov pri večjem deležu ljudi.

Na primer, Shobana in sodelavci so s ponovno uporabo podatkov iz tajske genomske podatkovne zbirke določili pogostost najpomembnejših različic v farmakogenih, za katere obstajajo na dokazih temelječa priporočila, in pokazali, da so v tajski populaciji pogosti počasni in srednje hitri presnavljenci za encim CYP2C19. Zaradi večje možnosti pojava neželenih učinkov priporočajo farmakogenetsko testiranje pri vseh, ki se jim predpiše antiagregacijsko zdravilo klopidoagrel (53). Tudi Jelovac in sodelavci so s ponovno uporabo podatkov WES in kliničnih eksperimentov v srbski populaciji opredelili pet farmakogenov z največ različicami, za katere obstajajo na dokazih temelječa priporočila po CPIC. V to skupino so se uvrstili: *CYP2C9*, *NAT2*, *SLCO1B1*, *UGT1A1* in *VKORC1*. Ker omenjeni farmakogeni vplivajo na presnovo pogosto predpisanih zdravil (antiokoagulant, statini, imunosupresivi, citostatiki ...), pred začetkom jemanja teh zdravil priporočajo vnaprejšnje farmakogenetsko testiranje (62).

BIOINFORMATSKA ORODJA V FARMAKOGENOMIKI

Ker pri sekvenciranju ustvarimo velike količine podatkov, si pri interpretaciji rezultatov pomagamo z uporabo bioinformatičnih orodij. S sekvenciranjem lahko zaznamo več deset tisoč različic v genomu posameznika. Da bi med njimi prednostno obravnavali tiste, ki so funkcionalno pomembne, lahko uporabimo različne pristope za anotacijo in prioritizacijo glede na že obstoječe podatke. Bioinformatiki so razvili orodja, posebej namenjena iskanju farmakogenomsko pomembnih informacij iz podatkov, pridobljenih s sekvenciranjem (63). Tako v farmakogenomiki kot tudi sicer pri uporabi NGS predstavljajo odkrite nove in redke različice izziv za interpretacijo. Do zdaj je bilo razvitih le nekaj algoritmov za napovedovanje učinkov redkih farmakogenetskih različic. Pričakuje se, da se bo njihova napovedna moč dodatno izboljšala z razvojem metod, ki temeljijo na umetni inteligenci (6).

Najpogostejše uporabljena in v člankih pogosto citirana so farmakogenetska orodja Aldy, Stargazer, StellarPGx in Pharmacogenomics Clinical Annotation Tool (PharmCAT), ki se med sabo razlikujejo v številu določenih različic v farmakogenih, v uporabi različice referenčnega genoma, zahtevanih vhodnih formatih podatkov in v statističnih metodah določanja različic (64-68). Nekatere razlike in podobnosti med orodji so prikazane v Tabeli 2. Orodja podajajo različno točne rezultate pri priklicu farmakogenetskih različic. Prav tako večina ne omogoča neposrednega izpisa priporočil za določene fenotipe. Težave zaradi nestandardiziranosti poskušajo rešiti ustvarjalci orodja PharmCAT, trenutno edinega, ki omogoča tudi podajanje priporočil glede morebitnih sprememb odmerka ali zamenjave zdravila na podlagi ugotovljenih genotipov in fenotipov (69). Pomembno je namreč, da rezultat testiranja, ki zazna genetsko različico, ponudi ukrep v obliki prilagoditve zdravljenja, ki je enako ali bolj učinkovito in prinaša manjše tveganje za pojav neželenih učinkov. »

Tabela 2: Primerjava bioinformatičnih orodij za analizo farmakogenov.

Table 2: Comparison of bioinformatics tools for pharmacogenomic analysis.

Orodje	Format vhodnih podatkov	Podatkovna baza	Pokriti geni	Posebnosti
aldy (68)	BAM, SAM, CRAM, VCF	PharmVar in/ali Clin-PGx	38 farmakogenov	- dobro prikliče strukturne različice v CYP2D6 - podobno kot ostala orodja ima težave določiti različice v številu kopij v CYP2D6 - poroča o novih alelih
PharmCAT (69)	VCF (NGS ali genotipizacija); ne obravnava strukturnih različic za CYP2D6 direktno, za to uporablja StellarPGx/Aldy	CPIC, FDA, DPWG	18 (z zunanjimi orodji prikliče tudi CYP2D6, HLA-A, HLA-B, MT-RNR1)	- edini poda priporočila - ne določa strukturnih različic - ne poroča o novih alelih - preprosta klinična implementacija in interpretacija
Stargazer (67)	VCF, BAM/CRAM	CPIC	58 farmakogenov	- strukturne različice zazna tako, da izračuna število kopij na podlagi globine sekvenciranja
StellarPGx (65)	BAM, CRAM (trenutno podpira samo kratka branja NGS)	PharmVar	21 farmakogenov	- dobro prikliče strukturne različice v CYP2D6

BAM (angl. *Binary Alignment Map*), SAM (angl. *Sequence Alignment Map*), CRAM (angl. *Compressed Reference-oriented Alignment Map*), VCF (angl. *Variant Calling Format*)

POTENCIAL UPORABE TEHNOLOGIJ DOLGIH BRANJ V FARMAKOGENOMIKI

Omejitve kratkih branj NGS

Za reševanje kompleksnih farmakogenov raziskovalci preizkušajo tehnologijo dolgih branj. Večje strukturne različice, kot so pomnožitve, translokacije, inverzije, insercije, delecije in različice v številu kopij, je z metodami sekvenciranja, ki temeljijo na tehnologiji kratkih branj, težje zaznati. Prav tako so v primerjavi s SNV-ji strukturne različice v farmakogenih (kot tudi nasploh) bistveno manj

raziskane (51). Izraz strukturna različica se običajno uporablja za odseke DNA, daljše od 1000 baznih parov (bp). Ker se pri tehnologiji kratkih branj za pripravo knjižnice DNA fragmentira na krajše odseke (do 300 bp), je večje strukturne različice težko opredeliti, saj s kratkimi odčitki ne zadostimo ustreznih pokritosti referenčnega genoma (51, 54, 55). Študije so pokazale, da tehnologije kratkih branj niso zmožne zaznavati različic v območjih, ki vsebujejo tandemske ali preproste ponovitvene sekvence (70, 71). Tehnologije dolgih branj, kot sta HiFi sekvenciranje podjetja Pacific Biosciences in sekvenciranje na nanoporah podjetja Oxford Nanopore Technologies, predstavljajo obetavno rešitev za zanesljivo zaznavanje večjih strukturnih različic (44, 72). Obe tehnologiji lahko generirata odčitke, dolge več 10.000 baznih parov, Oxford Nanopore Technologies pa med drugim omogoča tudi tarčno sekvenciranje (70, 72).



Prikaz kompleksnosti določanja večjih strukturnih različic gena *CYP2D6*

Gen *CYP2D6* se pogosto uporablja kot model za validacijo tehnologij NGS in bioinformatičnih orodij zaradi svoje klinične pomembnosti, visoke polimorfnosti in prisotnosti poznanih točkovnih in strukturnih različic (1, 2). Encim, ki ga kodira gen *CYP2D6*, presnavlja okoli 25 % klinično najbolj pogosto predpisanih zdravil (antidepresivi, antipsihotiki, antiaritmiki, beta-blokatorji, opiodi) in tako velja za zelo pomemben farmakogen (73). V genu so opisali že več kot 170 alelov (74). Primeri najpogostejših različic, ki vodijo v spremenjeno funkcijo encima, so prikazani v Tabeli 3. Prav tako ima *CYP2D6* dva psevdogena – *CYP2D7* in *CYP2D8*, ki ležita zelo blizu gena *CYP2D6* in imata več kot 95 % nukleotidnega zaporedja enakega

kot *CYP2D6* (73). Zaradi svoje polimorfnosti in prisotnosti strukturnih različic je v genu s klasičnimi metodami genotipizacije težko določiti vse klinično pomembne različice. Več študij pa je pokazalo, da so z NGS lahko uspešno določili klinično pomembne različice, pa tudi zaznali nove genetske različice v *CYP2D6* (73, 75-77). Tehnologije dolgih branj lahko z odčitki, ki so daljši od večine najpogostejših strukturnih različic, olajšajo opredelitev večjih insercij, delecij, multiplikacij in drugih strukturnih različic (72, 75, 77). Van der Lee in sodelavci so pokazali, da je povprečna dolžina dolgega odčitka približno trikrat večja od dolžine lokusa, na katerem je farmakogen *CYP2D6* (4 kbp), kar je omogočilo natančno opredelitev strukturnih različic. Bralna zaporedja so bila dovolj dolga, da so lahko tudi jasno ločili *CYP2D6* od njegovega psevdogena *CYP2D7* (77).

Tabela 3: Primeri nekaterih alelov *CYP2D6* s spremenjeno funkcijo encima, pogostost v populacijah in vrsta različice. Podatki izvirajo iz podatkovne zbirke PharmGKB (16).

Table 3: Examples of some *CYP2D6* alleles with altered enzyme function, their population frequencies, and the type of variant. The data are derived from the PharmGKB database (16).

Alel s spremenjeno funkcijo	Pogostost v evropski populaciji	Svetovna populacija z največjo frekvenco	Vrsta različice	Fenotip (encimska funkcija)
<i>CYP2D6</i> *4	18,48 %	evropska (18,48 %)	SNP in/ali insercija, delecija	izguba funkcije
<i>CYP2D6</i> *5	2,95 %	afriška (6,21 %)	delecija celotnega gena	izguba funkcije
<i>CYP2D6</i> *2x2	0,85 %	bližnjevzhodna (3,31 %)	podvojitev celotnega gena	povečana funkcija
<i>CYP2D6</i> *10	1,57 %	vzhodnoazijska (42 %)	SNP	zmanjšana funkcija
<i>CYP2D6</i> *13	0,09 %	vzhodnoazijska (0,13 %)	hibridni gen <i>CYP2D6/D7</i>	izguba funkcije
<i>CYP2D6</i> *68+4*	redka pojavnost	redka pojavnost	tandemske ponovitve	izguba funkcije

»

Dolga branja omogočajo natančnejše določanje lokacije različice

Poleg *CYP2D6* se raziskave tehnologij dolgih branj osredotočajo še na nekatere druge kompleksne farmakogene, kot sta *NAT2* in *UGT1A1*. Za *UGT1A1* so značilne promotorne tandemske ponovitve (TA), pri *NAT2* pa je za določitev pravega fenotipa potrebno faziranje (78). S faziranjem določimo, ali se različice nahajajo na istem ali nasprotnem alelu. Pravilno faziranje je pomembno, saj lahko napačno pripisana lokacija različice pomeni, da določimo napačen fenotip in podamo neustrezna priporočila (npr. *CYP2C19**2/*3 je opredeljen kot slab presnavljalec, *CYP2C19**1/*2/*3 pa srednje hiter presnavljalec). Običajno se haplotipi določajo s statističnim faziranjem na podlagi populacijskih podatkov, kar pa pogosto ni dovolj natančno na ravni posameznika. Pri takšnem določanju haplotipov se uporablja vezavno neravnovesje (LD, angl. *linkage disequilibrium*). Znano je, da se lahko nekatere različice pojavijo na ločenih alelih, kljub močnemu vezavnemu neravnovesju. Faziranje na osnovi zaporedij (angl. *read-backed phasing*), ki ga zaradi svoje dolžine omogočajo dolga branja, je neposredno in zato natančnejše. Gransmaa in sodelavci so s tehnologijo dolgih branj v farmakogenu *CYP2C19* pravilno fazirali 76 % različic (31). Barthélémy in sodelavci so s tehnologijo dolgih branj, ki omogoča neposredno faziranje, lahko diplotipe *NAT2* določili točneje kot pa s kratkimi branji (78).

Tehnologije dolgih branj lahko predstavljajo najboljšo rešitev za pravilno opredelitev kompleksnejših farmakogenov. Še vedno pa podobno kot pri tehnologiji kratkih branj omejitev predstavlja ustrezna bioinformatična analiza, ki bi omogočila lažjo interpretacijo rezultatov (40). Orodij, namenjenih analizi strukturnih različic v farmakogenih, je zaenkrat malo ter so večinoma osredotočena na le nekaj farmakogenov, najpogosteje na *CYP2D6* (67). Nova orodja se zato usmerjajo predvsem v pravilno določanje že poznanih in tudi novo odkritih strukturnih različic v farmakogenih (51).

Uporabnost orodja PharmCAT pri pripravi farmakogenomskih priporočil

Orodje PharmCAT rešuje izzive pri uvajanju farmakogenomskega testiranja v klinično prakso. Orodje je bilo razvito v sodelovanju med ustvarjalci podatkovne zbir-

ke ClinPGx in različnimi raziskovalnimi skupinami ter inštituti in je dostopno na spletni strani in v oblaku GitHub (69). Orodje pomaga identificirati farmakogenetske različice v sekvenčnih podatkih in interpretirati rezultate s pomočjo že uveljavljenih priporočil za predpisovanje zdravil. PharmCAT omogoča določanje farmakogenetsko pomembnih različic iz datotek formata VCF, ki so oblika zapisa genetskih različic (angl. *variant calling format*), pridobljenih s sekvenciranjem ali genotipizacijo. Na podlagi podatkov genotipizacije ali sekvence celotnega genoma orodje za ključne farmakogene poda genotipe, fenotip in priporočila. Najnovejša verzija (PharmCAT v3.0.1) upošteva priporočila CPIC, v določenih primerih pa tudi priporočila DPWG. Orodje trenutno podaja priporočila za največ 184 zdravil, ki so povezana z različicami v največ 22 farmakogenih (64).

Orodje PharmCAT smo uporabili za analizo podatkov WGS in izpis podatkov o genotipu, fenotipu in farmakogenomskih priporočilih. Bioinformatično analizo z orodjem PharmCAT (v3.0.0) smo izvedli na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike, UKC Ljubljana. Uporabili smo genomske podatke referenčnega vzorca HG002. HG002 je vzorec genoma posameznika iz projekta Personal Genome Project, ki zaradi prostega dostopa omogoča preverjanje kakovosti analize genoma in je pogosto uporabljen v različnih raziskavah, ker vsebuje dobro preučene genomske spremembe (79). Vzorec genoma HG002 smo na Kliničnem inštitutu za specialno laboratorijsko diagnostiko sekvencirali na sekvenatorju Illumina NovaSeq6000. Po končanem sekvenciranju smo z bioinformatično analizo pretvorili svetlobne signale v zaporedje baz in vzorec ustrezno bioinformatično obdelali.

V PharmCAT smo podatke vnesli v obliki datoteke VCF. Poročilo, ki ga ustvari PharmCAT, je sestavljeno iz štirih sklopov: iz povzetka genotipov (angl. *Genotype Summary table*), priporočil za predpisovanje (angl. *Prescribing Recommendations*), podrobnosti ujemanja alelov (angl. *Allele Matching Details*) ter opozoril in omejitev (angl. *Disclaimers section*). Na Sliki 2 sta prikazana drugi in tretji sklop poročila PharmCAT, ki je trenutno na voljo le v angleškem jeziku.



Section II: Prescribing Recommendations

acenocoumarol

Primer smernic pri uporabi zdravila acenokumarol

Source	Genes	Implications	Recommendation	Classification
DPWG Guideline Annotation Population: Unspecified Dosing Info	Genotype: VKORC1: rs9923231 variant (T)/ rs9923231 variant (T) Phenotype: -1639 AA	An INR ≥ 6 , resulting in an increased risk of bleeding, occurs in 8-12% of these patients during the first weeks of treatment with standard regulation by the Anticoagulation Clinic. The genetic variation increases the sensitivity to acenocoumarol.	Monitoring by the ANTICOAGULATION CLINIC (National INR Monitoring Service): - recommend to use 50% of the standard initial dose OTHERWISE: - recommend to use 50% of the standard initial dose - recommend more frequent monitoring of the INR	Unspecified

Priporočajo uporabo polovice standardnega začetnega odmerka

Citations:

- Pharmacogenetics: from bench to byte—an update of guidelines. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011. PMID:21412232

Section III: Allele Matching Details

- [CYP2B6 allele match data](#)
- [CYP2C19 allele match data](#)
- [CYP2C9 allele match data](#)
- [CYP3A5 allele match data](#)
- [CYP4F2 allele match data](#)
- [DPYD allele match data](#)
- [RYR1 allele match data](#)
- [UGT1A1 allele match data](#)
- [VKORC1 allele match data](#)

Seznam farmakogenov, za katere smo uspeli določiti genotipe

Seznam farmakogenov, za katere nismo uspeli določiti genotipov

No data provided for ABCG2, CACNA1S, CFTR, CYP2D6, CYP3A4, G6PD, NUDT15, SLC01B1, TPMT.

CYP2B6 allele match data

Podatki, ki jih je orodje upoštevalo pri določanju genotipa za CYP2B6

Alleles Matched:	*2/*5 *5/*10
Phasing Status:	Unphased PharmCAT reports the genotype(s) that receive the highest score during the matcher process. In case of unphased data, additional genotypes might be possible and cannot be ruled out.
Alleles Not Considered:	The following alleles are not considered due to 43 missing positions of the total 47 positions: *3, *8, *11, *12, *14, *15, *17, *21, *22, *23, *24, *25, *27, *28, *31, *32, *35, *44, *45, *46, *47, *48, *49 Carriage of these alleles might result in a different phenotype and different guideline recommendations.

Slika 2: Poročilo PharmCAT. Na sliki sta prikazana drugi (II.) in tretji (III.) del poročila, ki ga ustvari PharmCAT: II. Priporočila za predpisovanje (Prescribing Recommendations), III. Podrobnosti ujemanja alelov (Allele Matching Details). V črnih okvirjih so podani komentarji k našim rezultatom.

Figure 2: PharmCAT report. The figure shows section two (II.) and three (III.) of the report generated by PharmCAT: II. Prescribing Recommendations, III. Allele Matching Details. The comments on our results are shown in black boxes.

>>

Z orodjem PharmCAT smo v genomu referenčnega vzorca HG002 zaznali genetske različice v devetih od 18 farmakogenov, za katere je orodje podalo fenotip in po potrebi priporočila glede prilagajanja odmerka ali izbire zdravila. Vsi rezultati, ustvarjeni z orodjem PharmCAT, so se ujemali z referenčnimi podatki za omenjeni vzorec. Poročilo je vključevalo: *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A5*, *CYP4F2*, *DPYD*, *RYR1*, *UGT1A1* in *VKORC1*. V preostalih devetih farmakogenih (*ABCG2*, *CACNA1S*, *CFTR*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *G6PD*, *NUDT15*, *SLCO1B1* in *TPMT*) v datoteki VCF ni bilo različic, zato PharmCAT ni podal genotipov. Orodje omogoča tudi ročen vnos genotipov za farmakogene *CYP2D6*, *MT-RNR1* (kodiran v mitohondrijskem genomu), *HLA-A* in *HLA-B*.

Zaradi kompleksnosti omenjenih farmakogenov in prisotnosti strukturnih različic PharmCAT ne omogoča neposredne opredelitve genotipa teh farmakogenov, bi pa lahko genotip določili z drugimi orodji in podatke vnesli v orodje PharmCAT. Kot dodatni orodji za priklic *HLA-B/HLA-A* razvijalci predlagajo Optitype, za *CYP2D6* pa StellarPGx ali Stargazer (76).

ZAKLJUČEK

NGS predstavlja močno in vsestransko orodje za določanje različic v farmakogenih. Uveljavlja se na področju populacijskih farmakogenetskih študij in za odkrivanje novih različic, omogoča pa tudi ponovno rabo podatkov sekvenciranja, ki so že bili pridobljeni za diagnostične namene. Na področju farmakogenomike lahko pričakujemo nadaljnji razmah sekvenciranja dolgih branj, saj predstavlja boljše orodje za določanje večjih strukturnih različic in omogoča neposredno določanje haplotipov oz. faziranja. Kljub svoji vsestranskosti NGS ne more v celoti nadomestiti klasičnih, tarčnih metod genotipizacije farmakogenetskih različic, temveč jih lahko dopolnjuje. Orodja za klinično podporo odločanju, kot je denimo orodje PharmCAT, pa omogočajo, da bodo farmakogenomski podatki, pridobljeni z NGS, postali uporabni tudi v klinični praksi.

LITERATURA

1. Dolžan V. Genetic polymorphisms and drug metabolism. Zdrav Vestn. 2007;76:(II)-5-12.
2. Redenšek Sara DV. Principi farmakogenetike - od genetske variabilnosti do terapevtskih priporočil. Farm Vestn. 2021;72:90-9.
3. Lauschke VM, Milani L, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomic biomarkers for improved drug therapy—recent progress and future developments. The AAPS J. 2018;20:1-16.
4. Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. Br J Clin Pharmacol. 2001;52(4):345.
5. Ingelman-Sundberg M, Mkrtschian S, Zhou Y, Lauschke VM. Integrating rare genetic variants into pharmacogenetic drug response predictions. Hum Genomics. 2018;12:1-12.
6. Ingelman-Sundberg M, Nebert DW, Lauschke VM. Emerging trends in pharmacogenomics: from common variant associations toward comprehensive genomic profiling. Hum Genomics. 2023;17(1):105.
7. Santos M, Niemi M, Hiratsuka M, Kumondai M, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM, et al. Novel copy-number variations in pharmacogenes contribute to interindividual differences in drug pharmacokinetics. Genet Med. 2018;20(6):622-9.
8. Chanfreau-Coffinier C, Hull LE, Lynch JA, DuVall SL, Damrauer SM, Cunningham FE, et al. Projected prevalence of actionable pharmacogenetic variants and level A drugs prescribed among US Veterans Health Administration pharmacy users. JAMA Netw Open. 2019;2(6):e195345-e.
9. Verma SS, Keat K, Li B, Hoffecker G, Risman M, Center RG, et al. Evaluating the frequency and the impact of pharmacogenetic alleles in an ancestrally diverse Biobank population. J Transl Med. 2022;20(1):550.
10. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). Genet Med. 2017;19(2):215-23.
11. Abdullah-Koolmees H, Van Keulen AM, Nijenhuis M, Deneer VH. Pharmacogenetics guidelines: overview and comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPgX guidelines. Front Pharmacol. 2021;11:595219.
12. Bank P, Caudle K, Swen J, Gammal R, Whirl-Carrillo M, Klein T, et al. Comparison of the guidelines of the clinical pharmacogenetics implementation consortium and the Dutch pharmacogenetics working group. Clin Pharmacol Ther. 2018;103(4):599-618.
13. Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agúndez JA, Black JL, et al. PharmVar genefocus: CYP2D6. Clin Pharmacol Ther. 2020;107(1):154-70.
14. Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [assessed on 25. 8. 2025]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>.
15. Ehmann F, Caneva L, Prasad K, Paulmichl M, Maliepaard M, Llerena A, et al. Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. The pharmacogenomics journal. 2015;15(3):201-10.



16. PharmGKB [assessed on 6. 2. 2025]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/>.
17. Gene – drug CPIC [assessed on 5. 2. 2025]. Available from: <https://cpicpgx.org/genes-drugs/>.
18. Caspar SM, Schneider T, Meienberg J, Matyas G. Added value of clinical sequencing: WGS-based profiling of pharmacogenes. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2308.
19. Thorn CF, Klein TE, Altman RB. PharmGKB: the pharmacogenomics knowledge base. *Pharmacogenomics: methods and protocols Methods Mol Biol*. 2013;311-20.
20. Alshabeeb MA, Alyabsi M, Aziz MA, Abohelaika S. Pharmacogenes that demonstrate high association evidence according to CPIC, DPWG, and PharmGKB. *Front Med*. 2022;9:1001876.
21. AMP-Association for molecular pathology [assessed on 12. 3. 2025]. Available from: <https://www.amp.org/clinical-practice/practice-guidelines/>.
22. Just KS, Turner RM, Dolžan V, Cecchin E, Swen JJ, Gurwitz D, et al. Educating the next generation of pharmacogenomics experts: global educational needs and concepts. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(2):313.
23. Gurwitz D, Zika E, Hopkins MM, Gaisser S, Ibarreta D. Pharmacogenetics in Europe: barriers and opportunities. *Pub Health Gen*. 2009;12(3):134-41.
24. Lopes JL, Harris K, Karow MB, Peterson SE, Kluge ML, Kotzer KE, et al. Targeted genotyping in clinical pharmacogenomics: what is missing? *J Mol Diagn*. 2022;24(3):253-61.
25. Aquilante CL, Zinch I, Beitelshes AL, Langae TY. Common laboratory methods in pharmacogenomics studies. *Am J Health Syst Pharm*. 2006;63(21):2101-10.
26. Shahandeh A, Johnstone DM, Atkins JR, Sontag J-M, Heidari M, Daneshi N, et al. Advantages of array-based technologies for pre-emptive pharmacogenomics testing. *Microarrays*. 2016;5(2):12.
27. Scott SA, Tan Q, Baber U, Yang Y, Martis S, Bander J, et al. An allele-specific PCR system for rapid detection and discrimination of the CYP2C19*4A,*4B, and*17 alleles: implications for clopidogrel response testing. *J Mol Diagn*. 2013;15(6):783-9.
28. Langae T, Hamadeh I, Chapman AB, Gums JG, Johnson JA. A novel simple method for determining CYP2D6 gene copy number and identifying allele(s) with duplication/multiplication. *PLoS One*. 2015;10(1):e0113808.
29. Cha E-Y, Jeong H-E, Kim W-Y, Shin HJ, Kim H-S, Shin J-G. Brief introduction to current pharmacogenomics research tools. *Transl Clin Pharmacol*. 2016;24(1):13-21.
30. Zhou Y, Lauschke VM. Next-generation sequencing in pharmacogenomics—fit for clinical decision support? *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2024;17(3):213-23.
31. Graansma LJ, Zhai Q, Busscher L, Menafrá R, van den Berg RR, Kloet SL, et al. From gene to dose: Long-read sequencing and*allele tools to refine phenotype predictions of CYP2C19. *Front Pharmacol*. 2023;14:1076574.
32. Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein C, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;90(4):625-9.
33. Nguyen CM, Mendes MA, Ma JD. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotyping to predict myelosuppression risk. *PLoS Curr*. 2011;3:RRN1236.
34. Díaz-Villamarín X, Pinar-Morales R, Barrero-Hernández FJ, Antúnez-Rodríguez A, Cabeza-Barrera J, Morón-Romero R. Pharmacogenetics of siponimod: A systematic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;153:113536.
35. Magavern EF, McDermott JH, Caulfield MJ, Newman WG. CYP2C19 genetic testing for Mavacamten and ischaemic stroke treatment: What does the result mean for cardiovascular prescribers in the UK and Europe? : Oxford University Press; 2024. p. 481-3.
36. Haidar CE, Crews KR, Hoffman JM, Relling MV, Caudle KE. Advancing pharmacogenomics from single-gene to preemptive testing. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2022;23(1):449-73.
37. Swen JJ, van der Wouden CH, Manson LE, Abdullah-Koolmees H, Blagec K, Blagus T, et al. A 12-gene pharmacogenetic panel to prevent adverse drug reactions: an open-label, multicentre, controlled, cluster-randomised crossover implementation study. *Lancet*. 2023;401(10374):347-56.
38. Caspar SM, Schneider T, Stoll P, Meienberg J, Matyas G. Potential of whole-genome sequencing-based pharmacogenetic profiling. *Pharmacogenomics*. 2021;22(3):177-90.
39. Yang W, Wu G, Broeckel U, Smith C, Turner V, Haidar C, et al. Comparison of genome sequencing and clinical genotyping for pharmacogenes. *Clin Pharmacol Ther*. 2016;100(4):380-8.
40. Halman A, Lunke S, Sadedin S, Moore C, Conyers R. Benchmarking pharmacogenomics genotyping tools: Performance analysis on short-read sequencing samples and depth-dependent evaluation. *Clin Transl Sci*. 2024;17(8):e13911.
41. Ly RC, Shugg T, Ratcliff R, Osei W, Lynnes TC, Pratt VM, et al. Analytical validation of a computational method for pharmacogenetic genotyping from clinical whole exome sequencing. *J Mol Diagn*. 2022;24(6):576-85.
42. Mauleekoonphairoj J, Chamnanphon M, Khongphatthanayothin A, Sutjaporn B, Wandee P, Poovorawan Y, et al. Phenotype prediction and characterization of 25 pharmacogenes in Thais from whole genome sequencing for clinical implementation. *Sci Rep*. 2020;10(1):18969.
43. Kozyra M, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Rare genetic variants in cellular transporters, metabolic enzymes, and nuclear receptors can be important determinants of interindividual differences in drug response. *Genet Med*. 2017;19(1):20-9.
44. Prešern U, Kovač, J, Šket, R, Tesovnik, T, Debeljak, M, Jenko Bizjan, B. Uporaba sekvenciranja naslednje generacije v klinični diagnostiki prirojenih bolezni. *Laboratorijska medicina*. 2023;5(1):51-9.
45. Sahana S, Bhoyar RC, Sivasdas A, Jain A, Imran M, Rophina M, et al. Pharmacogenomic landscape of Indian population using whole genomes. *Clin Transl Sci*. 2022;15(4):866-77.
46. Sivasdas A, Scaria V. Pharmacogenomic survey of Qatari populations using whole-genome and exome sequences. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(4):590-600.
47. Wang Q, Shashikant C, Jensen M, Altman N, Girirajan S.
48. Reisberg S, Krebs K, Lepamets M, Kals M, Mägi R, Metsalu K, et al. Translating genotype data of 44,000 biobank participants into clinical pharmacogenetic recommendations: challenges and solutions. *Genet Med*. 2019;21(6):1345-54.



49. Lanillos J, Carcajona M, Maietta P, Alvarez S, Rodriguez-Antona C. Clinical pharmacogenetic analysis in 5,001 individuals with diagnostic Exome Sequencing data. *NPJ Genom Med.* 2022;7(1):12.
50. Annotation of DPWG Guideline for irinotecan and UGT1A1 PharmGKB [assessed on 12. 3. 2025]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166104951>.
51. Tremmel R, Zhou Y, Schwab M, Lauschke VM. Structural variation of the coding and non-coding human pharmacogenome. *NPJ Genom Med.* 2023;8(1):24.
52. Gordon AS, Tabor HK, Johnson AD, Snively BM, Assimes TL, Auer PL, et al. Quantifying rare, deleterious variation in 12 human cytochrome P450 drug-metabolism genes in a large-scale exome dataset. *Hum Mol Genet.* 2014;23(8):1957-63.
53. John S, Klumsathian S, Own-eium P, Eu-ahsunthornwattana J, Sura T, Dejsuphong D, et al. A comprehensive Thai pharmacogenomics database (TPGxD-1): phenotype prediction and variants identification in 942 whole-genome sequencing data. *Clin Transl Sci.* 2024;17(6):e13830.
54. Ye Z, Mayer J, Leary EJ, Kitchner T, Dart RA, Brilliant MH, et al. Estimating the efficacy of pharmacogenomics over a lifetime. *Front Med.* 2023;10:1006743.
55. Kurose K, Sugiyama E, Saito Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27(1):9-54.
56. CYP2C19*2 PharmGKB [assessed on 13. 3. 2025]. Available from: <https://www.pharmgkb.org/haplotype/PA165980635>.
57. Kennedy A, Ma G, Manshaei R, Jobling RK, Kim RH, Lewis T, et al. A call for increased inclusivity and global representation in pharmacogenetic testing. *NPJ Genom Med.* 2024;9(1):13.
58. Blagec K, Swen JJ, Koopmann R, Cheung K-C, Crommentuijn-van Rhenen M, Holsappel I, et al. Pharmacogenomics decision support in the U-PGx project: results and advice from clinical implementation across seven European countries. *PLoS One.* 2022;17(6):e0268534.
59. Petra BG, Janez J, Vita D. Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway influence the risk for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia & lymphoma.* 2007;48(4):786-92.
60. Pjevac M, Redenšek Trampuž S, Blagus T, Dolžan V, Bon J. Case report: application of pharmacogenetics in the personalized treatment of an elderly patient with a major depressive episode. *Frontiers in Psychiatry.* 2023;14:1250253.
61. Hočevár K, Maver A, Peterlin B. Actionable pharmacogenetic variation in the slovenian genomic database. *Front Pharmacol.* 2019;10:240.
62. Jelovac M, Pavlovic D, Stankovic B, Kotur N, Ristivojevic B, Pavlovic S, et al. Comprehensive pharmacogenomics profiling of the Serbian population. *Front Pharmacol.* 2025;16:1553536.
63. Tremmel R, Pirmann S, Zhou Y, Lauschke VM. Translating pharmacogenomic sequencing data into drug response predictions—How to interpret variants of unknown significance. *Br J Clin Pharmacol.* 2025;91(2):252-63.
64. Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Whaley RM, Woon M, Lavertu A, Altman RB, et al. Pharmacogenomics clinical annotation tool (Pharm CAT). *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2020;107(1):203-10.
65. Twesigomwe D, Drögemöller BI, Wright GE, Siddiqui A, da Rocha J, Lombard Z, et al. StellarPGx: a Nextflow pipeline for calling star alleles in cytochrome P450 genes. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;110(3):741-9.
66. Shugg T, Ly RC, Osei W, Rowe EJ, Granfield CA, Lynnes TC, et al. Computational pharmacogenotype extraction from clinical next-generation sequencing. *Front Oncol.* 2023;13:1199741.
67. Lee S-b, Wheeler MM, Patterson K, McGee S, Dalton R, Woodahl EL, et al. Stargazer: a software tool for calling star alleles from next-generation sequencing data using CYP2D6 as a model. *Genet Med.* 2019;21(2):361-72.
68. Hari A, Zhou Q, Gonzaludo N, Harting J, Scott SA, Qin X, et al. An efficient genotyper and star-allele caller for pharmacogenomics. *Genome Res.* 2023;33(1):61-70.
69. PharmCAT [assessed on 9. 4. 2025]. Available from: <https://pharmcat.org/>.
70. Zook JM, Hansen NF, Olson ND, Chapman L, Mullikin JC, Xiao C, et al. A robust benchmark for detection of germline large deletions and insertions. *Nat Biotechnol.* 2020;38(11):1347-55.
71. Ebert P, Audano P, Zhu Q, Rodriguez-Martin B, Porubsky D, Bonder M, et al. Haplotype-resolved diverse human genomes and integrated analysis of structural variation. *Science* 372, eabf7117. 2021.
72. Olivucci G, Iovino E, Innella G, Turchetti D, Pippucci T, Magini P. Long read sequencing on its way to the routine diagnostics of genetic diseases. *Front Genet.* 2024;15:1374860.
73. Chen X, Shen F, Gonzaludo N, Malhotra A, Rogert C, Taft RJ, et al. Cyrius: accurate CYP2D6 genotyping using whole-genome sequencing data. *Pharmacogenomics J.* 2021;21(2):251-61.
74. CYP2D6 PharmVar [assessed on 9. 4. 2025]. Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>.
75. Kaptsis D, Lewis M, Sorich M, Battersby M. Long-read sequencing of CYP2D6 may improve psychotropic prescribing and treatment outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Psychopharmacol.* 2024;38(9):771-83.
76. Twesigomwe D, Wright GE, Drögemöller BI, Da Rocha J, Lombard Z, Hazelhurst S. A systematic comparison of pharmacogene star allele calling bioinformatics algorithms: a focus on CYP2D6 genotyping. *NPJ Genom Med.* 2020;5(1):30.
77. van der Lee M, Rowell WJ, Menafra R, Guchelaar H-J, Swen JJ, Anvar SY. Application of long-read sequencing to elucidate complex pharmacogenomic regions: a proof of principle. *Pharmacogenomics J.* 2022;22(1):75-81.
78. Barthélémy D, Belmonte E, Pilla LD, Bardel C, Duport E, Gautier V, et al. Direct Comparative Analysis of a Pharmacogenomics Panel with PacBio HiFi® Long-Read and Illumina Short-Read Sequencing. *J Pers Med.* 2023;13(12):1655.
79. Shumate A, Zimin AV, Sherman RM, Puiu D, Wagner JM, Olson ND, et al. Assembly and annotation of an Ashkenazi human reference genome. *Gen Biol.* 2020;21(1):129.