

Pristopi za prepoznavo genetskih in epigenetskih biooznačevalcev v personalizirani medicini kroničnih bolezni

Approaches for the identification of genetic and epigenetic biomarkers in personalized medicine of chronic diseases

Vesna Gorenjak^{1,2}

¹Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta

²Sandoz Development Center, Lek d.d.

Avtor za korespondenco:

Dr. Vesna Gorenjak, mag. farm.

Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Taborska Ulica 8, 2000 Maribor, Slovenija

e-pošta: vesna.gorenjak@sandoz.com

POVZETEK

Personalizirana medicina temelji na uporabi genetskih in epigenetskih značilnosti posameznika za izboljšano preprečevanje, diagnostiko in zdravljenje bolezni, pri čemer biooznačevalci odražajo povezave med molekularnimi mehanizmi in kliničnimi znaki.

Namen prispevka je predstaviti razvoj in uporabo metod za odkrivanje genetskih in epigenetskih biooznačevalcev v sodobni personalizirani medicini ter ovrednotiti njihovo uporabnost v raziskovalnem in kliničnem okolju.

Opisani so pristopi kandidatnih genov in polimorfizmov, asociacijske študije celotnega genoma (GWAS), asociacijske študije celotnega epigenoma (EWAS), sekvenciranje celotnega genoma (WGS) ter celogenomsko bisulfitno sekvenciranje (WGBS).

Razvoj metod odraža prehod od hipotezno usmerjenih raziskav k celostnim, netačnim analizam. Študije kandidatnih genov so omejene s pristranskostjo in slabo ponovljivostjo, medtem ko GWAS omogočajo odkrivanje številnih genetskih različic z majhnim učinkom. EWAS dopolnjujejo ta vpogled z analizo epigenetskih sprememb, povezanih z okoljskimi dejavniki. WGS in WGBS zagotavljata najcelovitejši vpogled v genomsko in epigenomsko variabilnost, vendar ju omejujejo visoki stroški, kompleksnost analize in zahtevna interpretacija podatkov.

Zaključimo lahko, da kljub napredku ostaja prenos biooznačevalcev v klinično prakso omejen. Klasični diagnostični pristopi za zdaj ostajajo temelj klinične obravnave, medtem ko se genomika postopoma uveljavlja. Nadaljnji razvoj bo odvisen od učinkovite interpretacije velikih podatkovnih nizov in njihove integracije z naprednimi analitičnimi pristopi, vključno z umetno inteligenco.

Ključne besede: poligenske večfaktorske genetske bolezni, kompleksne genetske bolezni, GWAS, WGS, EWAS, genetska epidemiologija

ABSTRACT

Personalized medicine relies on the integration of individual genetic and epigenetic characteristics to improve disease prevention, diagnosis, and treatment, with biomarkers acting as a key bridge between molecular mechanisms and clinical practice.

The aim of this paper is to systematically present the development and application of methods for identifying genetic and epigenetic biomarkers in modern personalized medicine and to evaluate their utility in both research and clinical settings.

The review covers key approaches for the identification of genetic and epigenetic biomarkers, including candidate gene and polymorphism studies, genome-wide association studies (GWAS), epigenome-wide association studies (EWAS), whole-genome sequencing (WGS), and whole-genome bisulfite sequencing (WGBS).

Advances in genomic technologies have driven a transition from targeted, hypothesis-driven strategies to comprehensive, data-driven approaches. While candidate gene studies are constrained by selection bias and limited reproducibility, GWAS have enabled the systematic identification of numerous variants with modest individual effects. EWAS extend this framework by revealing epigenetic alterations influenced by environmental factors. WGS and WGBS provide the most extensive characterization of genomic and epigenomic variation, offering high-resolution insights, albeit at the cost of increased complexity, resource demands, and challenges in data interpretation.

Despite substantial methodological progress, the clinical implementation of identified biomarkers remains limited. For now, conventional diagnostic approaches continue to underpin clinical decision-making, while genomic tools are gradually being incorporated. Future advances will depend on improved strategies for data integration and interpretation, particularly through the application of artificial intelligence and other advanced computational methods.

Keywords: polygenic multifactorial genetic diseases, complex genetic diseases, GWAS, WGS, EWAS, genetic epidemiology

UVOD

Personalizirana medicina je pristop, pri katerem se preprečevanje, diagnosticiranje in zdravljenje bolezni prilagodijo posamezniku ali skupini posameznikov na podlagi njihovega genetskega in molekularnega profila ter drugih osebnih značilnosti. Njen namen je omogočiti izbiro najustrežnejšega pristopa za učinkovitejšo zdravstveno oskrbo. Za razvoj personalizirane medicine je ključnega pomena pridobivanje spoznanj o molekularnih in genetskih mehanizmih, ki so osnova za nastanek bolezni. Danes je vključena v številne moderne koncepte obravnave bolnikov, veliko pa se od nje še pričakuje predvsem na področju zgodnjega odkrivanja bolezni s pomočjo napredne diagnostike (1).

Čeprav se je personalizirana medicina kot znanstveni izraz prvič pojavila v študijah, objavljenih leta 1991, se je njen koncept razvil že davno pred tem. Znanstveniki so se že od nekdaj zavedali, da določena zdravljenja niso primerna za vse bolnike in so lahko v nekaterih primerih celo škodljiva. Eden najpreprostejših primerov so transfuzije krvi. Sistem krvnih skupin AB0 je bil odkrit leta 1900 in to znanje je pomagalo preprečiti zaplete pri transfuziji s preprostim testom krvne skupine, ki je vsakega posameznika kategoriziral v različne skupine na podlagi genotipov AB0. Ta enostaven primer dobro prikazuje poslanstvo današnje personalizirane medicine, ki želi bolnike razvrstiti v različne podskupine na podlagi njihovih genetskih predispozicij, da se omogočijo zgodnje napovedovanje tveganja za bolezni, natančno diagnozo in prognozo ter uporabo najučinkovitejših in najmanj škodljivih načinov zdravljenja za vsakega posameznika (2, 3).

Za uporabo personalizirane medicine v praksi potrebujemo specifične diagnostične biooznačevalce, ki omogočajo identifikacijo posameznikov z boleznijo in klasifikacijo podtipa bolezni. Genetski biooznačevalec je opredeljen kot značilnost DNK ali RNK, ki je indikator normalnih bioloških procesov, patogenih procesov ali odziva na terapevtske posege. Odraža izražanje, funkcijo ali regulacijo gena. Značilnosti DNK, ki jih uporabljamo kot genetske biooznačevalce, zaobjemajo t. i. polimorfizme posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), modifikacijo DNK (npr. metilacijo), insercije, delecije, variacije števila kopij idr. Pri RNK pa se osredotočamo na zaporedje RNK, ravni izražanja RNK, ravni mikro RNK idr. (4). V tem članku izraz genetska različica uporabljamo kot splošen izraz za spremembe v zaporedju DNK (npr. za-

menjave nukleotidov, insercije ali delecije), medtem ko polimorfizem označuje genetsko različico, ki se v populaciji pojavlja z relativno visoko frekvenco. Poseben primer je SNP, pri katerem se na določenem mestu v genomu med posamezniki razlikuje en sam nukleotid.

Analiza vezanosti (angl. *linkage analysis*) je bila ena prvih in ključnih metod v genetiki, ki je v obdobju pred visokozmogljivo genotipizacijo omogočala prepoznavanje kromosomskih regij, povezanih z dednimi boleznimi. S spremljanjem dedovanja markerjev v večgeneracijskih družinah je raziskovalcem omogočila prepoznavanje regij, povezanih z boleznijo, kar je nato usmerjalo izbor kandidatnih genov in preučevanje posameznih polimorfizmov. Med najpomembnejšimi dosežki tega pristopa je odkritje genov *BRCA1* in *BRCA2*, ki sta med prvimi omogočila genetsko testiranje za zgodnje prepoznavanje podvrženosti določenim tipom raka, razvoj tarčnih terapij, kot so zaviralci PARP, ter učinkovite preventivne strategije, vključno s preventivnimi kirurškimi posegi pri osebah z visokim tveganjem (5).

Pravi preboj personalizirane medicine je bil omogočen s Projektom človeški genom (angl. *Human Genome Project*), ki se je začel leta 1990 pod vodstvom ameriškega Nacionalnega centra za raziskave človeškega genoma. Sekvenčiranje treh milijard baznih parov, ki sestavljajo eno kopijo človeškega genoma, je bilo izvedeno v sodelovanju z 20 skupinami iz ZDA, Združenega kraljestva, Japonske, Francije, Nemčije in Kitajske ter je bilo zaključeno aprila 2003. Projekt je zagotovil nastanek obsežnih katalogov genomskih informacij o biološki strukturi in funkciji. Omogočil je raziskovanje osnovne fiziologije genoma ter postavil nov mejnik v medicinskih raziskavah (6).

SNP-ji, ki predstavljajo genetske različice v nukleotidnem zaporedju DNK, so postali središče zanimanja znanstvenikov. Kombinacije teh malih variacij v človeškem genomu namreč lahko oblikujejo posameznikovo nagnjenost k nekaterim boleznim, odzivnost na določena zdravljenja, dovzetnost na strupe iz okolja itd. Vzpostavitev povsem nove dobe v medicini je zahtevala ogromne napore v razvoju tehnologij, metodologij, ustvarjanju podatkovnih baz in velikih populacijskih kohort za pridobivanje informacij, ki bi pojasnile osnovo genetske regulacije kompleksnih bolezni, kot so srčno-žilna obolenja ali rak (7).

Genetska epidemiologija se je pojavila kot novo znanstveno področje, ki raziskuje vpliv genetskih dejavnikov na človeške lastnosti, predvsem na zdravje in bolezni, ter njihovo interakcijo z okoljskimi dejavniki. Njeno osrednje področje je preučevanje vzrokov in porazdelitve dednih ter kompleksnih bolezni v populacijah. Obsežne asociacijske študije celotnega genoma (angl. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS), ki genotipizirajo tisoče SNP-jev pri tisočih posameznikih, so identificirale SNP-je, od katerih vsak deloma prispeva k razumevanju nastanka kompleksnih bolezni. Vendar vse to ni zadostovalo za popolno razumevanje genetske regulacije kroničnih bolezni. Manjkajočo povezavo med vplivi okolja, genetiko in boleznimi, ki je GWAS niso mogle zagotoviti, je dopolnilo razumevanje epigenetskih sprememb na DNK. Študija metilacijskih sprememb na genomu (metilom) je postala najpogostejše uporabljeno epigenomsko orodje za proučevanje vpliva okolja na regulacijo genov. Visoko zmogljive tehnologije v kombinaciji z računalništvom in informatiko so omogočile specializirana orodja, ki se uporabljajo za analizo bioloških podatkov in podatkov iz genomike, transkriptomike, proteomike in drugih sorodnih področij (8). Tako imenovane omike zajemajo celostno preučevanje bioloških molekul, kot so geni (genomika), RNK (transkriptomika), proteini (proteomika) in metaboliti (metabolomika), ter njihovih interakcij (interaktom) oziroma povezav (integratom), kar omogoča sistemsko razumevanje bioloških procesov. Zaradi sposobnosti hkratnega preučevanja velike količine parametrov so omike postale temelj sodobnih pristopov pri odkrivanju novih biooznačevalcev, personalizirani medicini in razumevanju kompleksnih bolezni (9).

V nadaljevanju bodo predstavljeni pristopi, ki so uporabljeni za odkrivanje novih genetskih in epigenetskih biooznačevalcev, ter z njimi povezani načini uporabe v diagnostične namene.

ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE

Asociacijske študije so namenjene iskanju in oceni povezave fenotip-genotip oz. bolezni s posameznim polimorfizmom. Kot fenotip se v raziskavo vključi biološka/klinična značilnost, na osnovi katere lahko ocenjujemo bolezen, npr. povišan holesterol za oceno ateroskleroze ali povišan krvni tlak za oceno hipertenzije. Bolezni, kjer bi posamezen polimor-

fizem imel neposreden vpliv na razvoj patologije, so redke in jih poznamo kot monogenske bolezni. Primer takšne bolezni sta anemija srpastih celic ali cistična fibroza. Anemija srpastih celic nastane zaradi točkovne mutacije GAG → GTG v genu za β -globin, *HBB*. Ta sprememba povzroči pojav valina namesto glutamina v β -verigi hemoglobina, kar vodi do nastanka strukturno spremenjenega hemoglobina (HbS) in posledično do spremenjene oblike eritrocitov. Pri cistični fibrozi pa prihaja do mutacije v genu *CFTR*, ki kodira membranski protein, odgovoren za transport kloridnih ionov skozi celično membrano. Novejša spoznanja kažejo, da je tudi pri monogenih boleznih fenotip pogosto rezultat interakcije primarne mutacije ter drugih genetskih in okoljskih dejavnikov, kar lahko pomembno vpliva na potek bolezni, zato je tudi genetska osnova teh bolezni kompleksnejša, kot se je sprva domnevalo (10, 11).

Asociacijske študije raka, kardiovaskularnih bolezni in drugih stanj pogosto identificirajo polimorfizme, ki imajo posamezno majhen vpliv, v kombinacijah pa lahko znatno prispevajo k nagnjenosti posameznika za razvoj bolezni ter tudi njeni zgodnji diagnostiki in usmerjanju zdravljenja (12). Klasične vrste asociacijskih študij vključujejo študije kandidatnih polimorfizmov, kandidatnih genov, natančne preslikave in študije celotnega genoma oziroma epigenoma. Z napredkom umetne inteligence se tudi na tem področju začenja nova doba, ki bo s kombinacijo klasičnih metod in strojnega učenja omogočila zanesljivejšo analizo kompleksnih podatkovnih nizov in s tem naredila korak naprej k prepoznavanju klinično uporabnih bioznačevalcev (13).

Študije kandidatnih genov in kandidatnih polimorfizmov

Študije kandidatnih genov so pristop v genetskih raziskavah, pri katerem se na podlagi obstoječega biološkega znanja izberejo geni, za katere se domneva, da bi lahko vplivali na razvoj določenega fenotipa (bolezni ali lastnosti). V teh študijah se analizirajo genetske različice znotraj izbranih genov; najpogostejše so to SNP-ji. Po genotipizaciji kandidatnih genov v vzorcih DNK se pridobljeni podatki preverijo glede kakovosti, nato pa se izvede analiza asociacije, pri čemer je cilj ugotoviti, ali gen prispeva k variabilnosti opazovanega fenotipa (14). Pri študijah kandidatnih polimorfizmov se namesto celotnega gena izbere posamezen polimorfizem (npr. SNP), za katerega se domneva, da bi lahko vplival na razvoj določenega fenotipa. Takšne študije temeljijo na primerjavi pojavnosti izbira-

nih SNP-jev v skupini bolnikov s proučevano boleznijo in v skupini zdravih posameznikov (15).

Študije kandidatnih genov in kandidatnih polimorfizmov so bile v zgodnjih fazah genetske epidemiologije osrednji pristop za preučevanje genetske osnove bolezni v času, ko sekvenciranje celotnega genoma še ni bilo dostopno in so se raziskovalci omejili na posamezne gene ali omejeno število SNP-jev. Čeprav so bile te raziskave pomembne za razvoj zgodnjih genetskih modelov, so imele številne omejitve, med drugim pristranskost pri izbiri kandidatnih genov, nezadostno statistično moč ter slabo ponovljivost rezultatov. Razlog za to je dejstvo, da je dejanski vpliv posameznega SNP-ja na bolezen običajno zelo majhen, kar zahteva raziskave na velikem številu bolnikov. Zato so bile skupine, vključene v začetne študije, pogosto premajhne, ter so tako dale lažno pozitivne rezultate (16, 17). Danes imajo študije kandidatnega polimorfizma vlogo predvsem tam, kjer je biološka vloga določenega gena že dobro pojasnjena in podprta z eksperimentalnimi ali kliničnimi dokazi. Kot dopolnilo GWAS ali multiomikam za izbran SNP omogočajo oceno funkcionalne vloge, vendar kot samostojen pristop niso več prva izbira v preučevanju kompleksnih bolezni, saj ne zajamejo celotne genomske slike in pogosto spregledajo pomembne SNP-je zunaj vnaprej izbranih regij ter vpliv gen-gen interakcije na genetsko nagnjenje k bolezni.

Asociacijske študije celotnega genoma

GWAS so v zadnjih petnajstih letih postale eno ključnih orodij za preučevanje bolezni, saj omogočajo neodvisno ocenjevanje polimorfizmov znotraj celotnega genoma brez predhodnih hipotez, kot je to potrebno v primeru študij kandidatnega polimorfizma. Za razliko od študije kandidatnega polimorfizma, kjer se preučuje posamezne, vnaprej določene SNP, je pri GWAS vključenih veliko število polimorfizmov (do 2 milijona SNP), ki se nahajajo znotraj celotnega genoma, kar omogoča vzpostavljanje novih hipotez o genetski regulaciji bolezni. Genotipizirajo se SNP-ji, ki so vnaprej izbrani na podlagi njihove pogostosti v populaciji ter sposobnosti, da preko ocene vezavnega neravnotežja (angl. *linkage disequilibrium*) predstavljajo tudi druge bližnje variante. To omogoča učinkovito zajetje večine pogoste genetske variabilnosti v genomu. Glede na izbiro metode je lahko vključenih od več sto tisoč vse do 2 milijona polimorfizmov.

V GWAS se posameznikom najprej z uporabo visokozmogljivih genotipizacijskih platform, kot so SNP mikromreže (angl. *SNP arrays*), določi genotip polimorfizmov. Nato se z naprednimi bioinformatičnimi pristopi primerja pogostost milijonov genetskih polimorfizmov skupine zdravih posameznikov s pogostostjo istih polimorfizmov v skupini s preučevano značilnostjo (npr. povišan holesterol) pri bolnikih (npr. z aterosklerozo). Pri tem se iščejo genetske različice, ki se med skupinama pojavljajo s statistično značilno razliko. Na osnovi teh razlik lahko ocenimo, katere različice so povezane s povečanim ali zmanjšanim tveganjem za določeno stanje (npr. za povišan holesterol oziroma za aterosklerozo) (18).

Zanesljivost rezultatov GWAS je močno odvisna od velikosti skupin. Sodobne študije pogosto vključujejo več sto tisoč do več kot milijon udeležencev, saj šele tako dosežemo dovolj statistične moči za pravilno oceno majhnih učinkov posameznih genetskih različic, ki prispevajo k biološki/klinični značilnosti oziroma nastanku preučevane bolezni (18). Zaradi potrebne velike količine kakovostnih podatkovnih zbirk se GWAS pogosto odvijajo v sklopu mednarodnih raziskovalnih konzorcijev s sporazumi o izmenjavi podatkov, ki omogočajo združevanje rezultatov večjega števila kohort in s tem ustvarijo robustne, ponovljive znanstvene ugotovitve.

Rezultati GWAS imajo širok spekter aplikacij, saj s sočasno analizo in oceno ogromnega števila genetskih različic pri istem bolniku omogočajo globlji vpogled v biološke mehanizme kompleksnih bolezni, odkrivanje genov in bioloških poti, ki prispevajo k razvoju določenega fenotipa, ter s tem podpirajo razvoj novih terapevtskih tarč. Prav tako se GWAS uporabljajo za preučevanje dednosti preiskovanih fenotipov, za merjenje genetskih povezav med različnimi fenotipi ter za izdelavo poligenških ocen tveganja. V kliničnem in raziskovalnem kontekstu tako GWAS pomagajo pri razvoju personalizirane medicine, zgodnjem odkrivanju ogroženih posameznikov in prepoznavanju bioloških poti, ki so pomembne za razvoj zdravil (18).

Poligenška ocena tveganja (angl. *polygenic risk score*, PRS) temelji na spoznanju, da k skupni genetski nagnjenosti k bolezni prispevajo številni polimorfizmi, vsak z relativno majhnim učinkom. Z združevanjem vseh znanih alelov tveganja v statistično utežen seštevek poligenške ocene tveganja se omogoča kvantitativna ocena posameznikove genetske predispozicije za določeno bolezen (19). Čeprav

številne raziskave potrjujejo povezavo med PRS in klinično značilnostjo oziroma posredno z bolezenskim stanjem, American Heart Association (AHA) poudarja, da za rutinsko klinično uporabo še vedno ni na voljo standardizacije in validacije v različnih populacijah ter jasnih smernic o interpretaciji rezultatov. Kljub tem omejitvam se PRS vse pogosteje vključuje v klinično obravnavo kot dopolnilo tradicionalnim dejavnikom tveganja, zlasti pri srčno-žilnih boleznih, med drugim pri koronarni arterijski bolezni, hiperholesterolemiji in atrijski fibrilaciji (20).

Uporabnost metode podpira tudi nedavna prospektivna študija raka prostate, objavljena v *New England Journal of Medicine*, ki je pokazala, da moški z najvišjimi ocenami poligenškega tveganja izkazujejo znatno večjo verjetnost za razvoj raka, pri čemer bi številni primeri ostali neodkriti ob uporabi običajnih presejalnih metod. Rezultati kažejo, da lahko PRS pomembno dopolnjuje obstoječe pristope presejanja in usmerja personalizirane preventivne strategije, zlasti pri posameznikih z visokim genetskim tveganjem (21).

Asociacijske študije celotnega epigenoma

Epigenetski mehanizmi, kot so DNK metilacija (CpG), histonske modifikacije, remodeliranje kromatina ter epigenetska regulacija z nekodirajočimi RNK (npr. mikro RNK), omogočajo natančno uravnavanje ekspresije genov brez sprememb nukleotidnega zaporedja v DNK. Najbolj preučevani epigenetski bioznačevalec je DNK metilacija, pri kateri se na molekulo DNK, natančneje na citozin v CpG dinukleotidu, doda metilna skupina ($-CH_3$). Ta kemična modifikacija ne spremeni zaporedja DNK, vendar vpliva na izražanje genov, kar lahko pomembno vpliva na razvoj avtoimunskih bolezni, metabolnih motenj, Alzheimerjeve bolezni in raka (22).

Asociacijske študije celotnega epigenoma (angl. *epigenome-wide association studies*, EWAS) omogočajo sistematično preučevanje epigenetskih sprememb na ravni celotnega genoma. EWAS potekajo tako, da se izolirani DNK izmeri stopnja metilacije na genomskem nivoju. Klasična metoda za določanje metilacije je bisulfitno sekvenciranje, v novejših raziskavah pa se uporabljajo različni metilacijski čipi (npr. Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip). Po pridobitvi podatkov sledi statistična obdelava, pri kateri se med posameznimi skupinami prepoznajo

CpG mesta ali regije DNK, ki so različno metilirane (npr. med bolniki in kontrolno skupino). Te epigenetske spremembe se nato povežejo z geni in biološkimi potmi, kar omogoča nov vpogled v nastanek biološke/klinične značilnosti oziroma bolezni ter posredno odkrivanje biooznačevalcev, povezanih z boleznijo ali izpostavljenostjo dejavnikom, ki lahko prispevajo k razvoju posamezne bolezni. Takšni dejavniki vključujejo npr. kajenje, prehrano, onesnaženost okolja ali stres, ki lahko preko sprememb v metilaciji DNK vplivajo na izražanje genov in s tem na tveganje za razvoj bolezni (22).

EWAS ima danes ključno vlogo pri odkrivanju epigenetskih biooznačevalcev, ki bi lahko bili uporabni pri napovedovanju tveganja, zgodnji diagnostiki, določanju terapevtskih tarč in napovedi odziva na zdravljenje. Metilacijske ocene tveganja lahko natančneje napovedujejo tveganje za sladkorno bolezen tip 2 kot tradicionalni kazalniki. Lahko služijo tudi kot biooznačevalci za zgodnje odkrivanje kolorektalnega raka in avtizma. S pomočjo EWAS so bile odkrite tudi epigenetske tarče zdravljenja, kot so metilacije na *IL5RA* in *KCNH2* pri astmi ali *ABCG1* pri metaboličnih boleznih. Razvoj in uporaba inhibitorjev DNK metiltransferaze in inhibitorjev histonske deacetilaze ter naprednih programabilnih epigenetskih terapij, ki z uporabo sistemov, kot je CRISPR/dCas9, omogočajo specifično spreminjanje epigenetskih oznak na izbranih genih brez spreminjanja zaporedja DNK, dodatno potrjujejo, da epigenetski biooznačevalci in EWAS predstavljajo osrednji steber nastajajoče personalizirane epigenomske medicine (23, 24).

SEKVENCIARANJE CELOTNEGA GENOMA IN EPIGENOMA

Sekvenciranje celotnega genoma

Naslednica GWAS na področju vsegenomskih analiz je sekvenciranje celotnega genoma (angl. *whole genome sequencing*, WGS), ki jo je omogočila tehnologija sekvenciranja nove generacije (NGS). WGS je pristop, ki omogoča netačno in celovito analizo celotnega človeškega genoma v

eni sami preiskavi. Za razliko od GWAS, ki se osredotoča na vnaprej določene polimorfizme v genomu (do 2 milijonov), WGS omogoča popolno analizo celotnega DNK zapisa. S tem se zajame širok nabor genetskih različic – od polimorfizmov posameznih nukleotidov, manjših insercij in delecij, do strukturnih preureditev, ponovitev in variacij števila kopij. S tem predstavlja najbolj kompleksen in informacijsko bogat pristop k preučevanju genoma, saj omogoča enakomerno pokritost kodirajočih in nekodirajočih regij ter zaznavanje pomembnih genetskih različic, ki jih tarčne metode pogosto spregledajo. Zaradi svoje netačne narave WGS proizvede veliko količino podatkov, ki zahtevajo napredne bioinformatične pristope za interpretacijo rezultatov (25).

V medicini se WGS vse bolj uveljavlja kot prvovrstni diagnostični test, zlasti na področju neonatalnega presejanja novorojencev in odkrivanju redkih bolezni. Uporaba WGS v neonatalnem okolju omogoča hitrejšo genetsko diagnostiko pri kritično bolnih novorojencih ter zgodnejše odkrivanje redkih dednih bolezni, kar lahko pomembno vpliva na klinično obravnavo in izbiro ustreznega zdravljenja. Tak pristop ima potencial za izboljšanje izidov zdravljenja z omogočanjem pravočasnih in ciljno usmerjenih terapevtskih odločitev. Velike klinične študije so pokazale, da lahko WGS doseže visoke napovedne vrednosti, ki presegajo zmogljivosti večine tradicionalnih genetskih testov. S tem ni pomemben le za postavitev diagnoze, temveč tudi za odkrivanje povsem novih bolezenskih genov (26).

WGS vse bolj vpliva tudi na razvoj personalizirane medicine. Celovita genomska analiza omogoča identifikacijo farmakogenetskih različic, ki lahko usmerjajo izbiro in odmerjanje zdravil, ter razkriva mutacije, ki so pomembne za tarčne terapevtske pristope pri rakavih in drugih kompleksnih obolenjih. V klinični praksi se WGS uporablja tudi pri urgentnih stanjih, zlasti v neonatalni intenzivni medicini, kjer hitre izvedbe WGS omogočajo pravočasno in usmerjeno obravnavo kritično bolnih novorojenčkov. WGS omogoča tudi zanesljivo odkrivanje patogenih germinalnih mutacij v genih, kot sta *BRCA1* in *BRCA2*, kar je ključno pri oceni tveganja za raka dojke in jajčnikov ter pri odločitvah o izbiri tarčnih terapij. Zaradi teh aplikacij se WGS uveljavlja kot ena ključnih genomskih tehnologij sodobne medicine, ki povezuje diagnostiko, raziskovalno genomiko in omogoča razmah personaliziranih pristopov k zdravljenju (25, 26).

Celogenomsko bisulfitno sekvenciranje

Celogenomsko bisulfitno sekvenciranje (angl. *whole-genome bisulfite sequencing*, WGBS) predstavlja celovit pristop za analizo metilacije DNK na ravni celotnega genoma, saj omogoča določanje metilacijskega statusa posameznih CpG mest z visoko ločljivostjo. Metoda temelji na bisulfitni pretvorbi DNK, pri kateri se nemetilirani citozini pretvorijo v uracil, medtem ko metilirani ostanejo nespremenjeni, kar omogoča njihovo razlikovanje s sekvenciranjem. V primerjavi z metodami, ki temeljijo na mikromrežah (EWAS), WGBS ne zahteva vnaprej izbranih mest in omogoča odkrivanje novih ter redkih epigenetskih sprememb po celotnem genomu, vendar pa je povezan z večjimi stroški in zahtevnejšo bioinformatično analizo. S tem omogoča odkrivanje novih, prej nezaznanih metilacijskih sprememb, vključno z redkimi in tkivno specifičnimi vzorci, ter zagotavlja višjo ločljivost na ravni posameznega nukleotida. Tak pristop prispeva k natančnejšemu razumevanju epigenetske regulacije in odpira nove možnosti za identifikacijo biooznačevalcev, ki jih metode EWAS lahko spregledajo (27).

ZAKLJUČEK

Opisani pristopi so omogočili prepoznavo in ocenjevanje novih biooznačevalcev, kar je spodbudilo obsežno raziskovalno dejavnost in nastanek velikega števila objav o njihovi potencialni klinični uporabi. Kljub izrazitemu porastu znanstvene literature pa ostaja število biooznačevalcev, ki so dejansko vključeni v klinično prakso za odkrivanje, zdravljenje ali spremljanje pogostih kroničnih bolezni, še vedno omejeno. Za kronične bolezni je namreč značilno, da predstavljajo preplet številnih genetskih različic in okoljskih dejavnikov tveganja. Hkrati je tudi znano, da vsak posamezni dejavnik le malo prispeva k nastanku teh stanj, prava kombinacije velikega števila biooznačevalcev pa naša uporabne vrednosti, ki do zdaj niso bile dosegljive.

Napredek na področjih molekularne biologije, genetike in informatike je pospešil prepoznavo novih biooznačevalcev ter omogočil raziskovanje genomskih in epigenomskih označevalcev kot dopolnilo tradicionalnim kliničnim kazalnikom. Kljub tem dosežkom se na področju poligenetskih in večfaktorskih kroničnih bolezni še vedno nahajamo v prehodnem obdobju, v katerem klasični diagnostični in

terapevtski pristopi ostajajo zlati standard v klinični praksi, medtem ko se genetski testi, genske terapije in personalizirana zdravila postopoma uveljavljajo.

V zadnjih dveh desetletjih je bila zbrana velika količina podatkov, ki predstavlja priložnost in hkrati izziv. Treba jih je smiselno povezati in interpretirati z namenom poglobljenega razumevanja človeške biologije in patogeneze bolezni. Pri tem lahko upravičeno računamo na pomoč umezne inteligence. Takšen integrativen pristop bo pomembno prispeval k izboljšanju obstoječih strategij preprečevanja, napovedovanja in zdravljenja pogostih kroničnih bolezni ter jih nadgradil z orodji personalizirane medicine.

LITERATURA

1. Vicente AM, Ballensiefen W, Jönsson J-I. How personalised medicine will transform healthcare by 2030: the ICPeMed vision. *J Transl Med*. 2020;18(1):180.
2. Scholz N. Personalised medicine: The right treatment for the right person at the right time. European Parliamentary Research Service (EPRS); 2015. Report No.: PE 569.009.
3. Gorenjak V. Stratégies de médecine personnalisée pour l'étude et l'utilisation de nouveaux biomarqueurs: thèse. Nancy: Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie; 2019.
4. Novelli G, Ciccacci C, Borgiani P, Papaluca Amati M, Abadie E. Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2008;5(2):149–54.
5. Ott J, Wang J, Leal SM. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet*. 2015;16:275–84.
6. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860–921.
7. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177–86.
8. O'Rielly DD, Rahman P. Genetic epidemiology of complex phenotypes. *Methods Mol Biol*. 2021;2249:335–67.
9. Karczewski KJ, Snyder MP. Integrative omics for health and disease. *Nat Rev Genet*. 2018;19(5):299–310.
10. Gallati S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet*. 2014;7:133–46.
11. Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz TV, Stiles JK. Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights*. 2009;2:23–36.
12. Witte JS. Genome-wide association studies and beyond. *Annu Rev Public Health*. 2010;31:9–20.
13. Zhang X, Rahnavard A, Crandall KA. Machine learning enhances biomarker discovery: From multi-omics to functional genomics. *Med Res Arch*. 2025;13(8).

14. Singer JB. Candidate gene association analysis. In: DiPetrillo K, editor. Cardiovascular genomics: methods and protocols. Methods Mol Biol. 2009;573:223–30.
15. Bhatti P, Church DM, Rutter JL, Struwing JP, Sigurdson AJ. Candidate single nucleotide polymorphism selection using publicly available tools: a guide for epidemiologists. Am J Epidemiol. 2006;164(8):794–804.
16. Hart AB, de Wit H, Palmer AA. Candidate gene studies of a promising intermediate phenotype: failure to replicate. Neuropsychopharmacology. 2013;38(5):802–16.
17. van de Weijer MP, Pelt DHM, de Vries LP, Baselmans BML, Bartels M. A re-evaluation of candidate gene studies for well-being in light of genome-wide evidence. J Happiness Stud. 2022;23(6):3031–53.
18. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. Nat Rev Methods Primers. 2021;1:59.
19. Zheutlin AB, Ross DA. Polygenic risk scores: What are they good for? Biol Psychiatry. 2018;83(11):e51–3.
20. Lewis CM, Vassos E. Polygenic risk scores: from research tools to clinical instruments. Genome Med. 2020;12(1):44.
21. McHugh JK, Bancroft EK, Saunders E, Brook MN, McGrowder E, Wakerell S, et al. Assessment of a polygenic risk score in screening for prostate cancer. N Engl J Med. 2025;392(14):1406–17.
22. Wei S, Tao J, Xu J, Chen X, Wang Z, Zhang N, et al. Ten years of EWAS. Adv Sci (Weinh). 2021;8(20):2100727.
23. Yu X, Zhao H, Wang R, Chen Y, Ouyang X, Li W, et al. Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. Cell Death Discov. 2024;10(1):28.
24. Feehley T, O'Donnell CW, Mendlein J, Karande M, McCauley T. Drugging the epigenome in the age of precision medicine. Clin Epigenetics. 2023;15(1):6.
25. Austin-Tse CA, Jobanputra V, Perry DL, Bick D, Taft RJ, Venner E, et al. Best practices for the interpretation and reporting of clinical whole genome sequencing. NPJ Genom Med. 2022;7(1):27.
26. Stranneheim H, Lagerstedt-Robinson K, Magnusson M, Kvarnung M, Nilsson D, Lesko N, et al. Integration of whole genome sequencing into a healthcare setting: high diagnostic rates across multiple clinical entities in 3219 rare disease patients. Genome Med. 2021;13(1):40.
27. Adusumalli S, Mohd Omar MF, Soong R, Benoukraf T. Methodological aspects of whole-genome bisulfite sequencing analysis. Brief Bioinform. 2015;16(3):369–79.