



Budućnost cjelogenomskog sekvenciranja u pedijatriji

The future of whole genome sequencing in pediatrics

Petar Brlek^{1,2}, Dragan Primorac^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10} 

¹Specijalna bolnica Sv. Katarina, 10000 Zagreb

²Medicinski fakultet, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, 31000 Osijek

³Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, 21000 Split

⁴Department of Biochemistry & Molecular Biology, The Pennsylvania State University, State College, PA 16802, USA

⁵The Henry C. Lee College of Criminal Justice and Forensic Sciences, University of New Haven, West Haven, CT 06516, USA

⁶Medical School REGIONED, 96450 Coburg, Germany

⁷Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, 51000 Rijeka

⁸Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, 31000 Osijek

⁹Medicinski fakultet, Sveučilište u Mostaru, 88000 Mostar

¹⁰National Forensic Sciences University, Gujarat 382007, India

Ključne riječi

WHOLE GENOME SEQUENCING, PEDIJARIJA,
FARMAKOGENOMIKA, ONKOGENETIKA,
PERSONALIZIRANA MEDICINA, NUTRIGENETIKA

Key words

WHOLE GENOME SEQUENCING, PEDIATRICS,
PHARMACOGENOMICS, ONCOGENETICS,
PERSONALIZED MEDICINE, NUTRIGENETICS

SAŽETAK. Sekvenciranje cijeloga genoma (eng. *Whole genome sequencing* – WGS) postaje sve zastupljeniji genetički dijagnostički test u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Inicijativa za medicinski genom (eng. *Medical Genome Initiative* – MGI), prepoznala je WGS kao prioritetnu dijagnostičku metodu za otkrivanje rijetkih genetskih bolesti. Jedna od ključnih prednosti WGS-a u odnosu na sekvenciranje cijelog egzoma (eng. *Whole exome sequencing* – WES) jest mogućnost analize nekodirajućih dijelova genoma, koji čine oko 98,5% naše DNA, a sadrže ponavljajuće sekvence, sekvence koje kodiraju za nekodirajuće molekule RNA, te brojne regulatorne elemente ključne za kontrolu genske ekspresije. Primjena WGS-a ima značajan potencijal u pedijatriji i budućnost je dijagnostike genetskih bolesti u djece. Implementacija WGS-a u rutinsku pedijatrijsku praksu pruža nove mogućnosti za razvoj personalizirane medicine i poboljšanje zdravlja dječje populacije, uključujući i preventivno djelovanje radi sprječavanja razvoja multifaktorijskih bolesti poput dijabetesa, astme i pretilosti. U farmakogenomici, WGS omogućuje personalizirano doziranje lijekova na temelju genetičkog profila, smanjujući nuspojave i povećavajući učinkovitost terapije. U području dječje onkologije, WGS omogućuje pravodobnu dijagnostiku, personaliziranu terapiju i praćenje napredovanja maligne bolesti. Kontinuirani razvoj tehnologije sekvenciranja genoma i smanjenje troškova omogućit će sve veću dostupnost i primjenu WGS-a u svakodnevnoj kliničkoj praksi te otvoriti nove mogućnosti za individualiziranu medicinu i poboljšanje zdravlja dječje populacije.

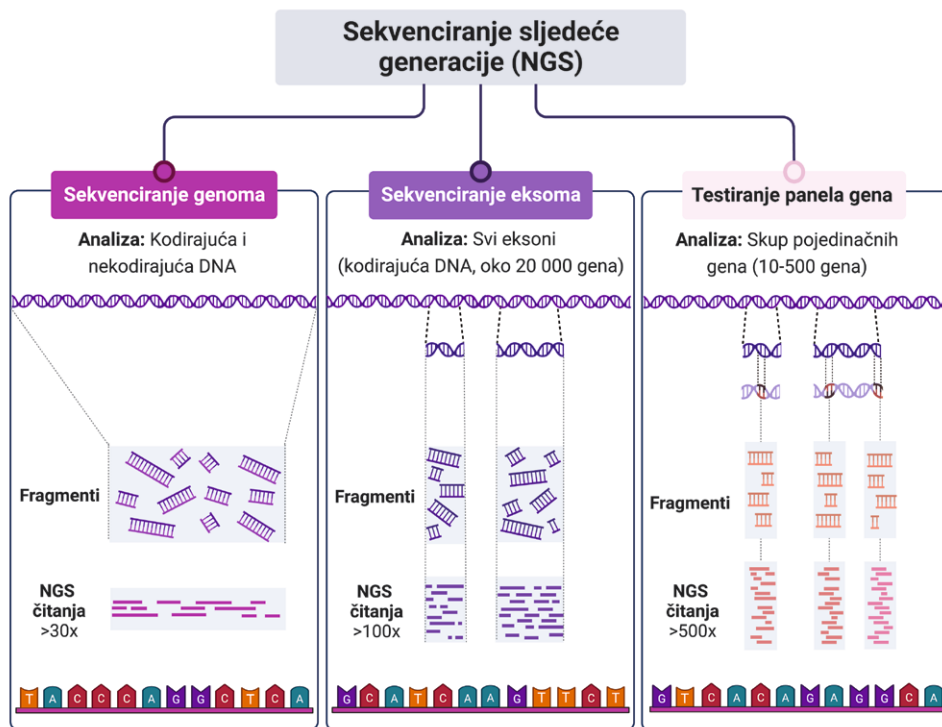
SUMMARY. Whole Genome Sequencing (WGS) is becoming a genetic diagnostic test of choice in everyday clinical practice. The Medical Genome Initiative (MGI) has recognized WGS as a priority diagnostic method for detecting rare genetic diseases. One key advantage of WGS over Whole Exome Sequencing (WES) is its ability to analyze non-coding regions of the genome, which make up approximately 98.5% of our DNA. These regions contain repetitive sequences, sequences that encode non-coding RNA molecules, and numerous regulatory elements crucial for controlling gene expression. The application of WGS holds significant potential in pediatrics and represents the future of genetic disease diagnosis in children. Implementing WGS into routine pediatric practice offers new possibilities for personalized medicine and improving the health of the pediatric population, including preventive interventions to avoid the development of multifactorial diseases such as diabetes and obesity. In pharmacogenomics, WGS enables personalized drug dosing based on a person's genetic profile, reducing side effects and increasing treatment effectiveness. In the field of pediatric oncology, WGS allows for personalized therapy and monitoring of tumor progression. Continued advancements in genome sequencing technology and cost reduction will increase the availability and application of WGS in clinical practice, opening new avenues for individualized medicine and enhancing the health of the pediatric population.

Cjelogenomsko sekvenciranje (eng. *Whole genome sequencing* – WGS) ima potencijal za zamjenu većine ostalih oblika DNA testiranja te je sve zastupljeniji kao genetički dijagnostički test prvog izbora u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Sukladno preporukama konzorcija vodećih zdravstvenih i istraživačkih organizacija u SAD-u i Kanadi, Inicijative za medicinski genom (eng. *Medical Genome Initiative* – MGI), kao i europske ini-

cijative EuroGentest, sekvenciranje cijeloga genoma (WGS) prioritetna je dijagnostička metoda za otkrivanje rijetkih genetskih bolesti.¹⁻² Kako bi se olakšalo šire

✉ Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Dragan Primorac, dr. med., <https://orcid.org/0000-0001-5565-080X>,
Specijalna bolnica Sv. Katarina, 10000 Zagreb
e-pošta: dragan.primorac@svkatarina.hr



SLIKA 1. POSTUPAK NGS (ENG. NEXT-GENERATION SEQUENCING) UKLJUČUJE VISOKOPROTOČNO PARALELNO SEKVENCIJANJE MOLEKULA DNA ILI RNA, OMogućUJUĆI RAZLIČITE PRIMJENE POPUT SEKVENCIJANJA CIJELOGA GENOMA (WGS), SEKVENCIJANJA EGZOMA (WES), ANALIZE TRANSKRIPTOMA, EPIGENOMA I DRUGIH. SLIKA POKAZUJE USPOREDBU WGS-A, WES-A TE TESTIRANJE POJEDINAČNIH PANELA GENA I NJIHOVE TEHNIČKE MOGUĆNOSTI.

FIGURE 1. THE NGS (NEXT-GENERATION SEQUENCING) PROCESS INVOLVES THE HIGH-THROUGHPUT PARALLEL SEQUENCING OF DNA OR RNA MOLECULES, ENABLING VARIOUS APPLICATIONS SUCH AS WHOLE-GENOME SEQUENCING (WGS), EXOME SEQUENCING (WES), TRANSCRIPTOME AND EPIGENOME ANALYSIS, AND MORE. THE FIGURE ILLUSTRATES A COMPARISON OF WGS, WES, AND SINGLE-GENE PANEL TESTING AND THEIR TECHNICAL CAPABILITIES.

usvajanje sekvencioniranja cijeloga genoma u kliničkoj praksi, MGI je formirala radnu skupinu zaduženu za izdavanje smjernica za vrjednovanje te usvajanje najbolje kliničke prakse u interpretaciji i izvješćivanju o kliničkom WGS-u kao sveobuhvatnom dijagnostičkom genetičkom testu.² Sukladno navedenom, 5. srpnja 2023. godine i Predsjedništvo Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti poduprlo je Strategiju razvoja primijenjene genomike u Hrvatskoj koju je donio Odbor za primijenjenu genomiku HAZU-a.

Najznačajniji korak u povijesti WGS-a bio je Projekt ljudskoga genoma (eng. *Human Genome Project* – HGP). HGP je pokrenut 1990. godine i omogućio je, kao međunarodni projekt, potpuno mapiranje ljudskoga genoma. Projekt je uspješno završen 2003. godine omogućivši prekretnicu u molekularnoj biologiji i medicini, kao i osnovu za dalji razvoj tehnologija WGS-a.³ Danas, brzi napredak tehnologije sekvenciranja sljedeće generacije (eng. *Next-generation sequencing* – NGS), otvara nove mogućnosti u pedijatrijskoj praksi, a jedna od najvažnijih metoda upravo je sekvenciranje cijeloga genoma. Nove metode za WGS, poput sekvenciranja nanoporama (eng. *Oxford Nanopore Technologies*), omogućuju detaljnu analizu preko 3 milijarde (10^9) pa-

rova baza koje sačinjavaju ljudski genom, ali usporedo omogućuju i analizu ljudskog epigenoma.⁴ Ovakav multi-OMICS pristup važan je za napredak i razvoj personalizirane medicine 21. stoljeća.

Jedna od ključnih prednosti WGS-a u odnosu na sekvenciranje cijelog egzoma (eng. *Whole exome sequencing* – WES) jest mogućnost analize nekodirajućih dijelova genoma (Slika 1). Nekodirajuća DNA sadrži različite komponente uključujući ponavljajuće sekvence (telomere, centromere, satelitna DNA), sekvence koje kodiraju za različite tipove nekodirajućih RNA molekula te brojne regulatorne elemente (promotori, pojačivači (eng. *enhancers*) i utišivači (eng. *silencers*).⁵⁻⁶ Nekodirajuće molekule RNA te regulatorni elementi imaju ključnu ulogu u kontroli ekspresije gena. Ova su područja genoma posebno važna u razumijevanju multifaktorijalnih genetskih bolesti u djece.⁷ WGS omogućuje detaljnu analizu nekodirajućih regija, što pruža mogućnost identifikacije varijanti koje mogu utjecati na regulaciju gena i razvoj bolesti.⁶

Klinička analiza genoma može se podijeliti u tri faze: primarnu, sekundarnu i tercijarnu analizu. Primarna analiza obuhvaća tehničke komponente sekvenciranja sljedeće generacije, uključujući ekstrakci-

ju DNA, pripremu biblioteke te preliminarnu kontrolu kvalitete uzorka. Sekundarna analiza uključuje bioinformatičku obradu podataka dobivenih sekvenciranjem, uključujući sravnjenje (eng. *alignment*) dobivene sekvence sa sekvencom referentnog humanog genoma te dodatne računalne operacije koje korigiraju mogućnost pogrešaka tijekom analize.² Na kraju, tercijarna analiza obuhvaća interpretaciju varijanti, uključujući označavanje, filtriranje, i kliničku klasifikaciju varijanti, tumačenje nalaza te izradu medicinskog nalaza genetičkog testa. Razmatranje ovoga preglednog rada obuhvatit će tercijarnu analizu, odnosno kliničku interpretaciju i primjenu WGS-a u pedijatriji.

Nekodirajući dijelovi genoma u dijagnostici rijetkih bolesti

Nekodirajući dijelovi genoma, koji čine oko 98,5% naše DNA, dugo su smatrani "smećem" genoma jer nisu kodirali za proteine. Međutim, napretkom tehnologije NGS-a te završetkom HGP-a sve je više istraživanja potvrđivalo da nekodirajući dijelovi genoma imaju ključnu ulogu u regulaciji gena i mogu imati znatan utjecaj na nastanak bolesti.⁸ Upravo WGS pruža mogućnost otkrivanja varijanti u nekodirajućim regijama, što otvara nove perspektive u razumijevanju nastanka genetskih bolesti u djece.⁷ Cjelogenomskom analizom moguće je otkriti uzrok rijetkih nasljednih bolesti, uključujući mitohondrijske bolesti, neurološka stanja, metaboličke bolesti, hematološke poremećaje, poremećaje u razvoju kostiju i mekih tkiva te otkrivanje rizika za nastanak multifaktorijskih bolesti poput šećerne bolesti i pretilosti u djece.^{7,9} S obzirom na kontinuiranost novih znanstvenih spoznaja, sekvenciranje cijeloga genoma daje mogućnost otkrivanja novih genskih promjena koje mogu dovesti do bolesti. Također, omogućuje prevenciju i pravodobno liječenje zdravstvenih problema koji nisu bili inicijalni razlog testiranja.¹⁰ Ovakva proaktivna briga o zdravlju, u kontekstu preventivne medicine već u dječjoj dobi, pruža bolje ishode liječenja, a pacijentima jamči prevenciju nastanka bolesti, na vrijeme, prije pojave odmaklih stadija bolesti s otežanim liječenjem.¹⁰⁻¹¹

Mutacije u regulatornim elementima nekodirajućih regija genoma dovode do promjena u ekspresiji gena, što može imati znatan utjecaj na fenotipske manifestacije i razvoj bolesti. Primjerice, mutacije u pojačivačima (eng. *enhancers*) mogu utjecati na vezanje transkripcijskih faktora i promijeniti razinu ekspresije određenih gena, što rezultira razvojem bolesti.¹² Otkrivanje varijanti u regulatornim regijama putem WGS-a pruža mogućnost identifikacije novih varijanti kao uzroka genetskih bolesti u djece, kod kojih dosadnje analize nisu uspjele dokazati uzrok u kodirajućoj DNA. Identificiranje specifičnih varijanti u regulatornim elementima omogućuje bolje razumijevanje

molekularnih mehanizama koji su u osnovi bolesti. To može dovesti do otkrića novih terapijskih ciljeva i razvoja novih terapijskih strategija.¹³ Dodatno, genske varijante u nekodirajućim regijama mogu imati implikacije za razumijevanje složenih genetskih bolesti koje uključuju interakciju više gena i okolišnih faktora. Primjerice, promjene u specifičnim genima mogu povećati osjetljivost na određene okolišne čimbenike, kao što je prijemčljivost za infekcije (poput infekcije *H. pylori*), što može rezultirati povećanim rizikom za nastanak multifaktorijskih bolesti poput želučanog ulkusa i razvoja karcinoma želuca.¹⁴

WGS pruža mogućnost detaljne analize nekodirajućih regija genoma i otkrivanja genskih varijanti koje se nalaze izvan kodirajućih sekvenci. Napredak u tehnologiji sekvenciranja i bioinformatičkih alata omogućuje sve precizniju i pouzdaniju identifikaciju ovih varijanti, a integracija ovih podataka s drugim kliničkim informacijama može pružiti holistički pristup u razumijevanju genetskih bolesti kod djece.¹⁵

Farmakogenomika u pedijatriji

U pedijatriji su za postizanje optimalne terapijske učinkovitosti i smanjenje nuspojava ključni čimbenici pravilno doziranje lijekova i individualizirana terapija. Upravo u tom kontekstu, WGS ima značajnu primjenu u području farmakogenomike. Farmakogenomika (PGx) omogućuje utvrđivanje rizika od neželjenih reakcija na lijekove ili njihove neučinkovitosti.¹⁶ Naime, mnoge studije jasno upućuju na to da su različite varijante gena povezanih s lijekovima (farmakogeni) povezane s različitim ishodima liječenja i štetnim nuspojavama lijekova. Mogućnost postojanja genske varijante koja bi mogla rezultirati gubitkom funkcije u farmakogenima iznosi čak 93% za svaku osobu.¹⁶⁻¹⁸ Stoga, identifikacija genskih varijanti povezanih s metabolizmom lijekova utječe na propisivanje lijekova, omogućujući odabir pravog lijeka i doze, čime se mogu smanjiti potencijalni neželjeni učinci ili terapijska neučinkovitost.¹⁸ Primjena cjelogenomskog testiranja u području farmakogenomike u kliničkoj praksi kontinuirano raste, otvarajući put otkrivanju novih varijanti farmakogena te omogućuje personalizirano, farmakogenomski vođeno liječenje.

WGS omogućuje detaljnu analizu genetičkog profila djeteta i identifikaciju genskih varijanti koje su povezane s metabolizmom lijekova. Ove varijante mogu utjecati na aktivnost enzima, transportera i receptora koji sudjeluju u metabolizmu lijekova, što rezultira različitim brzinama metabolizacije i individualnim odgovorom na terapiju.¹⁷ Na temelju informacija dobivenih WGS-om, moguće je personalizirati doze lijekova za svako dijete kako bi se postigla optimalna koncentracija lijeka u tijelu i postigao najbolji mogući terapijski učinak. Specifične genske varijante u djeteta

utječu na brzinu metabolizma lijeka ili na njegovu interakciju s drugim tvarima u tijelu. Bez poznavanja ovih genetičkih informacija, postoji rizik od smanjenog djelovanja lijeka ili pojave nuspojava lijeka. Personalizacija doziranja lijekova na temelju WGS-a omogućuje preciznije prilagođavanje terapije i minimiziranje rizika za nastanak nuspojava u djece.¹⁹ Osim toga, WGS također može identificirati genetske varijante koje su povezane s nepoželjnim reakcijama na određene anestetike, poput rizika za malignu hipertermiju kod mutacija u genima *CACNA1S*, *RYR1* i *STAC3*. Neki pacijenti mogu biti genetički predisponirani za nastanak maligne hipertermije za vrijeme ili ubrzo nakon operacije.²⁰ Identifikacija varijanti u kodirajućoj DNA te varijantama u regulatornim regijama navedenih gena putem WGS-a omogućuje prilagodbu anestezika kako bi se izbjegle potencijalne komplikacije uključujući multiorgansko zatajenje i smrt u djece s rizikom za malignu hipertermiju.

WGS omogućuje rano otkrivanje genetskih varijanti koje mogu utjecati na metabolizam lijekova, čime se omogućuje prilagođavanje doza lijekova tijekom rasta i razvoja, ali i kasnije, u odrasloj dobi. Dodatno, primjena WGS-a u farmakogenomici omogućuje identifikaciju genetskih varijanti u regulatornim regijama koje mogu utjecati na individualni odgovor djeteta na terapiju i odrediti izbor odgovarajućih lijekova.²¹ Ova personalizacija terapije može biti od posebnog značenja u slučaju djece s ozbiljnim genetskim bolestima ili u onkološkim stanjima, gdje je optimalna terapija presudna za postizanje pozitivnog ishoda liječenja.

Nasljedne i multifaktorijalne bolesti u pedijatriji

Personalizirana medicina i preventivne strategije za multifaktorijalne bolesti u djece najdinamičnija su i najinovativnija polja medicine za razvoj pedijatrije. Multifaktorijalne bolesti u djece uključuju širok spektar stanja poput dijabetesa, astme, pretilosti i onkoloških bolesti, a njihov razvoj rezultat je složene interakcije genetičkih i okolišnih čimbenika.²²⁻²⁵ Analiza genoma putem WGS-a omogućuje identifikaciju varijanti u genima, ali i nekodirajućim regijama koje su povezane s multifaktorijalnim bolestima. Ove genske varijante mogu biti točkaste mutacija, polimorfizmi gena (eng. *Single nucleotide polymorphisms* – SNP) ili promjene broja kopija gena (eng. *Copy number variation* – CNV).²⁶ Na temelju informacija dobivenih WGS-om, mogu se provesti preventivne mjere kako bi se smanjio rizik od nastanka bolesti. Jedna od najvažnijih intervencija jest promjena u stilu života, uključujući prehranu, tjelesnu aktivnost, izbjegavanje štetnih navika poput pušenja i konzumacije alkohola. Primjerice, ako se u djeteta identificira genska varijanta povezana s povećanim rizikom za razvoj pretilosti i meta-

boličkog sindroma, potrebno je planirati strategije prehrane kako bi se smanjila vjerojatnost razvoja pretilosti kod djeteta.²⁷ Pretilost u djece ozbiljan je globalni zdravstveni problem koji se povećava posljednjih desetljeća, a može dovesti do dugoročnih zdravstvenih komplikacija uključujući dijabetes, srčane bolesti i psihičke poremećaje. Istraživanja pokazuju iznimnu važnost analize nekodirajućih dijelova DNA u utvrđivanju nutrigenetičkog profila koji omogućuje personaliziranu prehranu prilagođenu genetičkom profilu pacijenta.²⁸ Ovom analizom moguće je utvrditi koje se hranjive tvari unesene hranom ili suplementacijom metaboliziraju normalno, a koje se hranjive tvari metaboliziraju usporeno ili je njihov metabolizam onemogućen. Literatura upućuje na činjenicu da je najučestalija pojavnost iznenadne srčane smrti u dobi od 16 do 20 godina, a pravodobna dijagnostika s pomoću analize cijeloga genoma može znatno utjecati na promjenu paradigme vezano za postojeće dijagnostičke i terapijske kriterije.²⁹⁻³⁰

WGS omogućuje praćenje djece s identificiranim genetičkim rizikom i ranu intervenciju. Redovito praćenje zdravstvenog stanja u djeteta uz provođenje specifičnih testova i kliničkog pregleda, može otkriti rane znakove bolesti ili odstupanja od urednih parametara. Važno je istaknuti da WGS nije samo alat za identifikaciju genetičkog rizika već i za razumijevanje molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi multifaktorijalnih bolesti. Analiza varijanti gena i nekodirajućih regulatornih dijelova genoma omogućuje otkrivanje bioloških puteva i mehanizama koji su uključeni u razvoj bolesti. Ove spoznaje mogu biti od iznimne važnosti za razvoj novih terapijskih ciljeva i strategija prevencije.³¹

Primjena WGS-a u prevenciji nastanka multifaktorijalnih bolesti u djece otvara nove mogućnosti za individualiziranu medicinu. Identifikacija genetskih varijanti povezanih s povećanim rizikom omogućuje provođenje preventivnih mjera, promjena u načinu života i ranu intervenciju kako bi se smanjio rizik od bolesti.³² Kombinacija genetskog profila, kliničke procjene i informacija o okolišnim čimbenicima omogućuje holistički pristup u prevenciji i upravljanju smanjenjem rizika za multifaktorijalne bolesti u djece. Osim toga, na temelju dosadašnjeg kliničkog iskustva Centra za genetiku i personaliziranu medicinu Specijalne bolnice Sv. Katarina, gdje su do sada klinički interpretirani rezultati WGS-a u preko 400 pacijenata, nameće se cjelogenomsko sekvenciranje kao potreba ne samo zbog potvrde dijagnoze bolesti i razumijevanja mehanizma nastanka bolesti već i zbog terapeutskog pristupa.³³⁻⁴⁰

Primjena WGS-a u dječjoj onkologiji

Dječja onkologija izazovno je područje medicine koje zahtijeva sveobuhvatan i individualiziran pristup

liječenju. Svaki slučaj dječjeg tumora na molekularnoj razini jedinstven je i zahtijeva detaljnu analizu genetičkog profila tumora kako bi se pružila personalizirana terapija i postigao najbolji mogući ishod liječenja.⁴¹ Upravo u tom kontekstu WGS ima ključnu ulogu. WGS omogućuje cjelovitu analizu tumorskog genoma, što rezultira detaljnim uvidom u mutacije prisutne u tumorskim stanicama. Identifikacija specifičnih genetskih varijanti povezanih s pojedinačnim slučajevima dječjih tumora omogućuje preciznu dijagnostiku i pruža informacije o molekularnim mehanizmima koji pridonose biološkoj agresivnosti tumora.²⁵ Cjelogenomska analiza pomaže u razumijevanju patogeneze tumora i omogućuje utvrđivanje specifičnih terapijskih ciljeva.

Personalizirana terapija temeljena na WGS-u omogućuje odabir optimalnog tretmana za svakog pacijenta. Na temelju genetičkog profila tumora, mogu se identificirati specifične genske promjene koje su ključne za preživljavanje i rast tumora.⁴¹⁻⁴² Otkrivanje prisutnosti određenih genskih mutacija može upućivati na mogućnost ciljanog liječenja koje će usmjeriti terapiju prema specifičnom molekularnom putu povezanom s karakteristikama tumorskih stanica. Dodatno, WGS može pružiti informacije o genetičkom mehanizmu rezistencije na određenu terapiju, poput rezistencije na kemoterapeutike u akutnoj mijeloičnoj leukemiji u djece.⁴³ Identifikacija genskih promjena koje pridonose rezistenciji na određene lijekove ili terapijske modalitete, omogućuje pravodobne intervencije kako bi se preusmjerila terapija na alternativne lijekove koji će biti učinkovitiji. Ovaj personaliziran pristup terapiji pridonosi smanjenju neželjenih nuspojava i povećanju stope uspjeha liječenja u djece oboljele od raka.

WGS također ima važnu ulogu u praćenju napredovanja onkološke bolesti. Redovito sekvenciranje tumorske DNA tijekom vremena omogućuje praćenje evolucije genetičkih promjena u tumoru. Ova kontinuirana analiza tumorskog genoma može otkriti promjene koje su ključne za progresiju bolesti, omogućujući pravodobne promjene u terapiji kako bi se bolje kontroliralo napredovanje tumora.⁴⁴ Znanstvena istraživanja temeljena na analizi slobodne cirkulirajuće DNA (eng. *Circulating free DNA* – cfDNA) dobivene tekućom biopsijom, pokazuju obećavajuće rezultate u praćenju i liječenju malignih bolesti djece, pružajući informacije o promjenama tumorske DNA koje omogućuju personalizaciju terapije i poboljšanje ishoda liječenja.⁴⁵⁻⁴⁶ Ova tehnologija omogućuje praćenje dinamičkih promjena u tumorskom genomu tokom terapije, što može biti od ključne važnosti u borbi protiv raka kod pedijatrijskih pacijenata.

Važno je istaknuti primjenu WGS-a i u kontekstu prevencije nastanka malignih oboljenja u odraslih, a čija bi prevencija trebala započeti od pedijatrijske dobi. Multicentrično znanstveno istraživanje objavljeno u

znanstvenom časopisu *JAMA Oncology*, provedeno na populaciji od 2984 pacijenta sa solidnim tumorima, otkriva da svaki osmi pacijent, odnosno čak 13,3% pacijenata s rakom ima nasljednu mutaciju (patogenu varijantu) gena povezanu s povišenim rizikom za onkološku bolest od svojeg rođenja. Zapanjujuća je činjenica da su čak u polovine (47,4%) tih pacijenata utvrđene varijante nepoznatog kliničkog značenja (eng. VUS) čiji će utjecaj na rizik od razvoja karcinoma biti razjašnjen tek u budućnosti.⁴⁷ Mutacije koje povećavaju rizik od nastanka tumora mogu se naslijediti ako su prisutne u jajnim stanicama ili spermijima roditelja. Ako roditelj svom djetetu prenese mutirani gen *BRCA1* ili *BRCA2*, dijete će imati povećan rizik da tijekom života oboli od raka dojke (40 – 80%), jajnika (11 – 40%), prostate (39%) i gušterače (1 – 7%) te nekoliko drugih vrsta malignih tumora. Testiranje WGS-om može biti korisno za pacijentice s nasljednom predispozicijom za karcinom. Čak 20 – 25% slučajeva karcinoma dojke ili jajnika uzrokovano je nasljednim mutacijama gena *BRCA1* i *BRCA2*, a zasad je nepoznato koliki je postotak slučajeva uzrokovan mutacijama u nekodirajućim regijama genoma.⁴⁸ WGS može pružiti bolje razumijevanje rizika i omogućiti ranu intervenciju te time poboljšati ishode liječenja i pravodobno smanjiti rizik od razvoja karcinoma.

Varijante nepoznatog kliničkog značenja jedan su od najvećih izazova u interpretaciji podataka dobivenih WGS-om. Analiza ogromnih količina podataka i identifikacija relevantnih genskih varijanti zahtijeva napredne bioinformatičke alate i ekspertizu medicinskih genetičara. Također, interpretacija varijanti u nekodirajućem genomu i razumijevanje njihove uloge u razvoju tumora jest dodatan izazov.⁴⁹⁻⁵⁰ Ipak, WGS pruža detaljnu analizu tumorskog genoma u djece oboljele od raka, što omogućuje personaliziranu terapiju, identifikaciju novih terapijskih ciljeva i praćenje napredovanja bolesti. Njegova primjena u dječjoj onkologiji pomaže u poboljšanju dijagnostike, terapije i praćenja djece s onkološkim bolestima. Unatoč izazovima u interpretaciji i analizi podataka, kontinuirani razvoj tehnologije i bioinformatičkih alata omogućuju sve precizniju i efikasniju primjenu WGS-a u dječjoj onkologiji.

Izazovi za buduću primjenu WGS-a u svakodnevnoj kliničkoj praksi

Interpretacija varijanti u intronskim regijama gena te nekodirajućem genomu izazov je u istraživanju genetskih bolesti i razumijevanju njihovih mehanizama, a otkrivanje patogenih varijanti omogućuje personalizirani terapijski pristup za brojne nasljedne bolesti.⁵¹⁻⁵³ Nekodirajuće regije genoma često sadrže velik broj varijanti koje mogu biti funkcionalno neutralne ili čiji je funkcionalni značaj još uvijek nepoznat. Stoga, kako bismo u potpunosti razumjeli njihovo djelovanje i pove-

zanost s fenotipom, važno je razviti nove metode i alate za analizu i interpretaciju ovih varijanti.⁵⁴ Nekodirajuće regije mogu sadržavati regulatorne elemente, kao što su promotori, pojačivači i utišivači, koji reguliraju ekspresiju gena.⁶ Varijante u ovim regijama mogu utjecati na vezanje transkripcijskih faktora i promijeniti razinu ekspresije gena, što rezultira fenotipskim promjenama.⁵ Međutim, problem je identifikacija funkcionalno relevantnih varijanti među mnogobrojnim neutralnim varijantama. Razvoj novih metoda i bioinformatičkih alata za analizu nekodirajućeg dijela genoma postaje sve važniji kako bismo razumjeli funkcionalne posljedice varijanti u ovim regijama. Tehnike sekvenciranja, kao što su ChIP-seq (eng. *chromatin immunoprecipitation sequencing*) i ATAC-seq (eng. *assay for transposase-accessible chromatin sequencing*), omogućuju identifikaciju regulatornih elemenata te dobivanje informacija o vezanju transkripcijskih faktora i modificiranju histona u određenim regijama genoma. Integracija ovih podataka s podacima o genetskim varijantama omogućuje identifikaciju funkcionalno relevantnih varijanti i njihovu povezanost s fenotipom.⁵⁵⁻⁵⁶

Od iznimne je važnosti razvoj bioinformatičkih alata te velikih baza podataka koje omogućuju lakšu interpretaciju varijanti u nekodirajućem genomu. Bioinformatički softveri za interpretaciju varijanti predviđaju funkcionalni značaj varijanti na temelju komparativne genomske analize, evolucijske očuvanosti pojedinih dijelova genoma, predikcije utjecaja promjena u sekvenci na proteinsku strukturu uključujući procjenu stabilnosti proteina, aktivnosti enzima i interakcije s drugim molekulama, vezanja transkripcijskih faktora i drugih funkcionalnih elemenata.⁵⁷ Također je važno integrirati ove podatke s drugim kliničkim informacijama kako bi se dobio cjelovit uvid u pravilnu kliničku interpretaciju genskih varijanti. Napredak u razumijevanju nekodirajućeg genoma i interpretaciji funkcionalno relevantnih varijanti otvara nova polja istraživanja i terapijske mogućnosti, uključujući otkrivanje novih bioloških puteva i mehanizama nastanka bolesti. S obzirom na najnovije rezultate, a koje je nedavno publicirao *The Telomere-to-Telomere (T2T) Consortium*, nužno je predvidjeti tehnologije i postupke (sekvenciranje dugih sekvenci, eng. *long-read sequencing*) koji će uz analizu eukromatina istodobno analizirati i dio genoma koji sadrži uzastopno ponavljajuće dijelove DNA, uglavnom u centromernim i telomernim regijama (heterokromatin). Zahvaljujući najmodernijoj tehnologiji, takozvanim hibridnim sekvenciranjem cijeloga genoma koje se koristi kombinacijom sekvenciranja dugih (eng. *long-read*) i kratkih (eng. *short-reads*) sekvenci kako bi se iskoristile prednosti različitih tehnologija, danas je omogućeno brže i jeftinije sekvenciranje s visokom preciznošću u čitanju pojedinačnih nukleotida i boljom kvalitetom analize genoma.⁵⁸

Klinička interpretacija varijanti u nekodirajućem genomu izazov je u razumijevanju genetskih bolesti, ali u razumijevanju farmakogenomike te personaliziranog pristupa terapiji.⁵⁹⁻⁶⁰ Razvoj novih metoda i alata za analizu i interpretaciju ovih varijanti ključan je za otkrivanje njihova funkcionalnog značaja i povezanosti s fenotipom. Integracija različitih eksperimentalnih tehnika, bioinformatičkih alata i kliničkih podataka omogućuje sve dublje razumijevanje nekodirajućeg genoma i potencijalne terapijske primjene, a daljnja istraživanja i tehnološki napredak bit će ključni za otkrivanje novih bioloških mehanizama i razvoj novih terapija u području genetskih bolesti djece.⁶¹⁻⁶²

Zaključak

Primjena WGS-a ima značajan potencijal u pedijatriji i budućnost je dijagnostike genetskih bolesti u djece. Brzi napredak tehnologije sekvenciranja genoma omogućuje sve bržu i kvalitetniju analizu genoma, s visokom preciznošću i sve manjim troškovima. Implementacija WGS-a u rutinsku pedijatrijsku praksu pruža nove mogućnosti za personaliziranu medicinu i poboljšanje zdravlja dječje populacije, uključujući i preventivno djelovanje radi sprječavanja razvoja multifaktorijskih bolesti. Važno je educirati pedijatre o prednostima i izazovima primjene WGS-a kako bi se osigurala njegova učinkovita integracija u pedijatrijsku praksu. U budućnosti, očekuje se da će WGS postati standardni dijagnostički alat u pedijatriji, omogućujući preciznu i personaliziranu skrb za djecu s genetskim i drugim bolestima.

INFORMACIJE O SUKOBU INTERESA

Autori nisu deklarirali sukob interesa relevantan za ovaj rad.

INFORMACIJA O FINANCIRANJU

Za ovaj članak nisu primljena financijska sredstva.

DOPRINOS AUTORA

KONCEPCIJA ILI NACRT RADA: DP, PB

PRIKUPLJANJE, ANALIZA I INTERPRETACIJA PODATAKA: DP, PB

PISANJE PRVE VERZIJE RADA: DP, PB

KRITIČKA REVIZIJA: DP, PB

LITERATURA

1. Souche E, Beltran S, Brosens E, Belmont JW, Fossum M, Riess O i sur. Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. *Eur J Hum Genet.* 2022;30(9): 1017-1021. doi:10.1038/s41431-022-01113-x
2. Austin-Tse CA, Jobanputra V, Perry DL, Bick D, Taft RJ, Venner E i sur. Best practices for the interpretation and reporting of clinical whole genome sequencing. *NPJ Genom Med.* 2022;7(1):27. Published 2022 Apr 8. doi:10.1038/s41525-022-00295-z

3. Giani AM, Gallo GR, Gianfranceschi L, Formenti G. Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019 Nov 17;18:9-19. doi: 10.1016/j.csbj.2019.11.002.
4. Bowden R, Davies RW, Heger A, Pagnamenta AT, de Cesare M, Oikonen LE *i sur*. Sequencing of human genomes with nanopore technology. *Nat Commun*. 2019 Apr 23;10(1):1869. doi: 10.1038/s41467-019-09637-5.
5. Zhong W, Liu W, Chen J, Sun Q, Hu M, Li Y. Understanding the function of regulatory DNA interactions in the interpretation of non-coding GWAS variants. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 19;10:957292. doi: 10.3389/fcell.2022.957292.
6. Moyon L, Berthelot C, Louis A, Nguyen NTT, Roest Crollius H. Classification of non-coding variants with high pathogenic impact. *PLoS Genet*. 2022 Apr 29;18(4):e1010191. doi: 10.1371/journal.pgen.1010191.
7. Costain G, Walker S, Marano M, Veenma D, Snell M, Curtis M, *i sur*. Genome Sequencing as a Diagnostic Test in Children With Unexplained Medical Complexity. *JAMA Netw Open*. 2020 Sep 1;3(9):e2018109. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.18109.
8. Gibbs RA. The Human Genome Project changed everything. *Nat Rev Genet*. 2020 Oct;21(10):575-576. doi: 10.1038/s41576-020-0275-3.
9. Oprea TI. Exploring the dark genome: implications for precision medicine. *Mamm Genome*. 2019 Aug;30(7-8):192-200. doi: 10.1007/s00335-019-09809-0.
10. Vassy JL, Christensen KD, Schonman EF, Blout CL, Robinson JO, Krier JB *i sur*. The Impact of Whole-Genome Sequencing on the Primary Care and Outcomes of Healthy Adult Patients: A Pilot Randomized Trial. *Ann Intern Med*. 2017 Jun 27;167(3):159-169. doi: 10.7326/M17-0188.
11. Jezkova J, Shaw S, Taverner NV, Williams HJ. Rapid genome sequencing for pediatrics. *Hum Mutat*. 2022 Nov;43(11):1507-1518. doi: 10.1002/humu.24466.
12. Maurya SS. Role of Enhancers in Development and Diseases. *Epigenomes*. 2021 Oct 4;5(4):21. doi: 10.3390/epigenomes5040021.
13. Cano-Gamez E, Trynka G. From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. *Front Genet*. 2020 May 13;11:424. doi: 10.3389/fgene.2020.00424.
14. Fan R, Han X, Gong Y, He L, Xue Z, Yang Y, *i sur*. Alterations of Fucosyltransferase Genes and Fucosylated Glycans in Gastric Epithelial Cells Infected with *Helicobacter pylori*. *Pathogens*. 2021 Feb 4;10(2):168. doi: 10.3390/pathogens10020168.
15. Pereira R, Oliveira J, Sousa M. Bioinformatics and Computational Tools for Next-Generation Sequencing Analysis in Clinical Genetics. *J Clin Med*. 2020 Jan 3;9(1):132. doi: 10.3390/jcm9010132.
16. Primorac D, Bach-Rojecky L, Vađunec D, Juginović A, Žunić K, Matišić V, *i sur*. Pharmacogenomics at the center of precision medicine: challenges and perspective in an era of Big Data. *Pharmacogenomics*. 2020 Jan;21(2):141-156. doi: 10.2217/pgs-2019-0134.
17. Matišić V, Brlek P, Molnar V, Pavelić E, Čemerin M, Vrdoljak K, *i sur*. Experience with comprehensive pharmacogenomic multi-gene panel in clinical practice: a retrospective single-center study. *Croat Med J*. 2022 Jun 22;63(3):257-264. doi: 10.3325/cmj.2022.63.257.
18. Crisafulli C, Romeo PD, Calabrò M, Epasto LM, Alberti S. Pharmacogenetic and pharmacogenomic discovery strategies. *Cancer Drug Resist*. 2019 Jun 19;2(2):225-241. doi: 10.20517/cdr.2018.008.
19. Brittain HK, Scott R, Thomas E. The rise of the genome and personalised medicine. *Clin Med (Lond)*. 2017 Dec;17(6):545-551. doi: 10.7861/clinmedicine.17-6-545.
20. Biesecker LG, Dirksen RT, Girard T, Hopkins PM, Riazi S, Rosenberg H, *i sur*. Genomic Screening for Malignant Hyperthermia Susceptibility. *Anesthesiology*. 2020 Dec 1;133(6):1277-1282. doi: 10.1097/ALN.0000000000003547.
21. Tafazoli A, Guchelaar HJ, Miltyk W, Kretowski AJ, Swen JJ. Applying Next-Generation Sequencing Platforms for Pharmacogenomic Testing in Clinical Practice. *Front Pharmacol*. 2021 Aug 25;12:693453. doi: 10.3389/fphar.2021.693453.
22. Zhao J, Grant SF. Genetics of childhood obesity. *J Obes*. 2011;2011:845148. doi: 10.1155/2011/845148.
23. Sansone F, Attanasi M, Di Pillo S, Chiarelli F. Asthma and Obesity in Children. *Biomedicines*. 2020 Jul 21;8(7):231. doi: 10.3390/biomedicines8070231.
24. Ikegami H, Noso S, Babaya N, Kawabata Y. Genetics and pathogenesis of type 1 diabetes: prospects for prevention and intervention. *J Diabetes Investig*. 2011 Nov 30;2(6):415-20. doi: 10.1111/j.2040-1124.2011.00176.x.
25. Oberg JA, Ruiz J, Ali-Shaw T, Schlechtweg KA, Ricci A, Kung AL, *i sur*. Whole-Genome and Whole-Exome Sequencing in Pediatric Oncology: An Assessment of Parent and Young Adult Patient Knowledge, Attitudes, and Expectations. *JCO Precis Oncol*. 2018 Mar 14;2:PO.17.00104. doi: 10.1200/PO.17.00104.
26. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell*. 2019 Mar 21;177(1):70-84. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.032.
27. Gregory JW. Prevention of Obesity and Metabolic Syndrome in Children. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Oct 1;10:669. doi: 10.3389/fendo.2019.00669. PMID: 31632348; PMCID: PMC6779866.
28. Mullins VA, Bresette W, Johnstone L, Hallmark B, Chilton FH. Genomics in Personalized Nutrition: Can You "Eat for Your Genes"? *Nutrients*. 2020 Oct 13;12(10):3118. doi: 10.3390/nu12103118.
29. Primorac D, Odak L, Perić V, Čatić J, Šikić J, Radeljić V, *i sur*. Sudden Cardiac Death-A New Insight Into Potentially Fatal Genetic Markers. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Mar 22;8:647412. doi: 10.3389/fmed.2021.647412.
30. Brlek P, Pavelić ES, Mešić J, Vrdoljak K, Skelin A, Manola Š, *i sur*. State-of-the-art Risk-modifying Treatment of Sudden Cardiac Death in an Asymptomatic Patient with a Mutation in the SCN5A Gene and Review of the Literature. 2023 (U recenziji)
31. Medico-Salsench E, Karkala F, Lanko K, Barakat TS. The non-coding genome in genetic brain disorders: new targets for therapy? *Essays Biochem*. 2021 Oct 27;65(4):671-683. doi: 10.1042/EBC20200121.
32. Strianese O, Rizzo F, Ciccarelli M, Galasso G, D'Agostino Y, Salvati A, *i sur*. Precision and Personalized Medicine: How Genomic Approach Improves the Management of Cardiovascular and Neurodegenerative Disease. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 6;11(7):747. doi: 10.3390/genes11070747.
33. Boban Lj, Rod E, Plečko M, Slišković AM, Korbler J, Primorac D. Molecular basis of osteogenesis imperfecta and future medical treatment. *Paediatr Croat*. 2017; 61:147-55. 26.
34. Stubbe A, Primorac D, Hoppner W. Molecular genetic analysis of Osteogenesis Imperfecta in clinical practice. *Paediatr Croat*. 2017; 61:141-6. 2.

35. Shapiro J, Primorac D, Rowe D.W. Mutations in type I Osteogenesis Imperfecta. In Principles of Bone Biology. (Eds. J. Bilezikian, L. Raisz, G. Rodan). New York: Academic Press 1996:889-902. 7.
36. Plotkin H, Primorac D, Rowe D.W. Osteogenesis Imperfecta. In: Pediatric Bone: Biology & Diseases. (Editor Francis Glorieux). New York: Academic Press 2003. 1.
37. Stover ML, Primorac D, Liu SC, McKinstry MB, Rowe DW. Defective splicing of mRNA from one COL1A1 allele of type I collagen in nondeforming (type I) osteogenesis imperfecta. J Clin Invest. 1993 Oct;92(4):1994-2002. doi: 10.1172/JCI116794.
38. Johnson C, Primorac D, McKinstry M, McNeil J, Rowe D, Lawrence JB. Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. J Cell Biol. 2000 Aug 7;150(3):417-32. doi: 10.1083/jcb.150.3.417.
39. Primorac D, Rowe DW, Mottes M, Barisić I, Anticević D, Mirandola S, *i sur.* Osteogenesis imperfecta at the beginning of bone and joint decade. Croat Med J. 2001 Aug;42(4):393-415.
40. Jeleč Ž, Primorac D, Antičević D. Personalized surgery approach in severe form of osteogenesis imperfecta type III: point of view. J Pediatr Orthop B. 2019 Sep;28(5):505-508. doi: 10.1097/BPB.0000000000000598.
41. Malone ER, Oliva M, Sabatini PJB, Stockley TL, Siu LL. Molecular profiling for precision cancer therapies. Genome Med. 2020 Jan 14;12(1):8. doi: 10.1186/s13073-019-0703-1.
42. Subbiah V. The next generation of evidence-based medicine. Nat Med. 2023 Jan;29(1):49-58. doi: 10.1038/s41591-022-02160-z. Epub 2023 Jan 16.
43. McNeer NA, Philip J, Geiger H, Ries RE, Lavallée VP, Walsh M, *i sur.* Genetic mechanisms of primary chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia. Leukemia. 2019 Aug;33(8):1934-1943. doi: 10.1038/s41375-019-0402-3.
44. Zhao EY, Jones M, Jones SJM. Whole-Genome Sequencing in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019 Mar 1;9(3):a034579. doi: 10.1101/cshperspect.a034579.
45. Weiser DA, West-Szymanski DC, Fraint E, Weiner S, Rivas MA, Zhao CWT, *i sur.* Progress toward liquid biopsies in pediatric solid tumors. Cancer Metastasis Rev. 2019 Dec;38(4):553-571. doi: 10.1007/s10555-019-09825-1.
46. Talotta D, Almasri M, Cosentino C, Gaidano G, Moia R. Liquid biopsy in hematological malignancies: current and future applications. Front Oncol. 2023 Apr 20;13:1164517. doi: 10.3389/fonc.2023.1164517.
47. Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, *i sur.* Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. JAMA Oncol. 2021 Feb 1;7(2):230-237. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.6252.
48. Barišić I, Primorac D. Najčešće nasljedne bolesti. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi, 2., dopunjeno i izmijenjeno izdanje. Topić E, Primorac D, Štefanović M, (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 515-544, 2018.
49. Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, Wilkinson E, Fish M, Ramsuran V, *i sur.* Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. Front Genet. 2020 Oct 23;11:544162. doi: 10.3389/fgene.2020.544162.
50. Zhu Y, Tazearslan C, Suh Y. Challenges and progress in interpretation of non-coding genetic variants associated with human disease. Exp Biol Med (Maywood). 2017;242(13):1325-1334. doi:10.1177/1535370217713750
51. Brlek P, Bulić L, Glavaš Weinberger D, Bošnjak J, Pavlović T, Tomić S, *i sur.* Successful Treatment of a Rare Cholesterol Homeostasis Disorder Due to CYP27A1 Gene Mutation with Chenodeoxycholic Acid Therapy. Biomedicines. 2023 May 12;11(5):1430. doi: 10.3390/biomedicines11051430.
52. Brlek P, Antičević D, Molnar V, Matišić V, Robinson K, Aradhya S, *i sur.* X-Linked Osteogenesis Imperfecta Possibly Caused by a Novel Variant in PLS3. Genes (Basel). 2021 Nov 23;12(12):1851. doi: 10.3390/genes12121851.
53. Esplin ED, Oei L, Snyder MP. Personalized sequencing and the future of medicine: discovery, diagnosis and defeat of disease. Pharmacogenomics. 2014 Nov;15(14):1771-1790. doi: 10.2217/pgs.14.117.
54. Oakeson KF, Wagner JM, Mendenhall M, Rohrwasser A, Atkinson-Dunn R. Bioinformatic Analyses of Whole-Genome Sequence Data in a Public Health Laboratory. Emerg Infect Dis. 2017 Sep;23(9):1441-1445. doi: 10.3201/eid2309.170416.
55. Vimont N, Quah FX, Schöepfer DG, Roudier F, Dirlewanger E, Wigge PA *i sur.* ChIP-seq and RNA-seq for complex and low-abundance tree buds reveal chromatin and expression co-dynamics during sweet cherry bud dormancy. Tree Genetics & Genomes 16, 9 (2020). doi: 10.1007/s11295-019-1395-9
56. Raurell-Vila H, Ramos-Rodríguez M, Pasquali L. Assay for Transposase Accessible Chromatin (ATAC-Seq) to Chart the Open Chromatin Landscape of Human Pancreatic Islets. Methods Mol Biol. 2018;1766:197-208. doi: 10.1007/978-1-4939-7768-0_11.
57. Domené S, Scaglia PA, Gutiérrez ML, Domené HM. Applying Bioinformatic Platforms, In Vitro, and In Vivo Functional Assays in the Characterization of Genetic Variants in the GH/IGF Pathway Affecting Growth and Development. Cells. 2021 Aug 12;10(8):2063. doi: 10.3390/cells10082063.
58. Completing human genomes. Nat Methods. 2022 Jun;19(6):629. doi: 10.1038/s41592-022-01537-9.
59. Primorac D, Höppner W, *ur.* Pharmacogenetics in clinical practice Experience with 55 commonly used drugs. Zagreb, Hamburg, Philadelphia 2022.
60. Primorac D, Höppner W, Bach-Royeck L, *ur.* Pharmacogenomics in Clinical Practice. Springer Nature (In press).
61. Hassan M, Awan FM, Naz A, deAndrés-Galiana EJ, Alvarez O, Cernea A, *i sur.* Innovations in Genomics and Big Data Analytics for Personalized Medicine and Health Care: A Review. Int J Mol Sci. 2022 Apr 22;23(9):4645. doi: 10.3390/ijms23094645.
62. Vockley J, Aartsma-Rus A, Cohen JL, Cowsert LM, Howell RR, Yu TW, *i sur.* Whole-genome sequencing holds the key to the success of gene-targeted therapies. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2023 Mar;193(1):19-29. doi: 10.1002/ajmg.c.32017.