

NEXT-GENERATION SEQUENCING – СЪЩНОСТ НА ТЕХНОЛОГИЯТА И ПРИЛОЖЕНИЕ В ТЪКАННОТО ТИПИЗИРАНЕ И МОЛЕКУЛЯРНАТА ДИАГНОСТИКА НА МИЕЛОИДНИ НЕОПЛАЗИИ

И. Павлов, М. Иванова-Шиварова

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“ – София

NEXT-GENERATION SEQUENCING: OVERVIEW OF THE SEQUENCING TECHNOLOGY AND APPLICATION IN TISSUE TYPING AND MOLECULAR DIAGNOSTICS OF MYELOID NEOPLASMS

I. Pavlov, M. Ivanova

Department of Clinical Immunology with Stem Cell Bank, University Hospital “Aleksandrovska” – Sofia

Резюме:	Next-generation sequencing (NGS) технологията превъзхожда стандартните секвенционни методи по отношение на капацитет и чувствителност, възможността за мултиплексно изследване на проби, клонално секвениране на отделни молекули, цена за изследването и др. Тези предимства, както и възможността за нови диагностични подходи правят въвеждането на NGS в клиничната диагностика все по-необходимо. В този обзор са представени методологичните аспекти, предимствата и недостатъците на най-широко използваните NGS платформи, както и кратко описание на приложенията на технологията в областта на тъканното типизиране и молекулярната диагностика на миелоидни неоплазии.
Ключови думи:	next-generation sequencing, молекулярна диагностика, тъканно типизиране, миелоидни неоплазии
Адрес за кореспонденция:	Иван Павлов, GSM: 0887067676, e-mail: ivanypavlov@yahoo.com
Summary:	Next-generation sequencing (NGS) technologies are superior to conventional sequencing methods in terms of sequencing capacity and sensitivity, the ability to multiplex samples, clonal sequencing of single molecules, cost benefits and others. These advantages as well as the possibility of developing new diagnostic approaches lead to the indispensable implementation of NGS in clinical diagnostics. This review presents the methodology aspects, the advantages and disadvantages of the most widely used NGS platforms and a brief description of NGS applications in tissue typing and molecular diagnostics of myeloid neoplasms.
Key words:	next-generation sequencing, molecular diagnostics, tissue typing, myeloid neoplasms
Address for correspondence:	Ivan Pavlov, Tel.: +359 887067676, e-mail: ivanypavlov@yahoo.com

ВЪВЕДЕНИЕ

Краят на проекта за секвенирането на човешкия геном през 2003 г. постави началото на нова ера в геномната медицина. Развитието на технологиите за секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing – NGS), познати още като масивно паралелно секвениране, е ключово за прилагането на генетичните тестове в клинич-

ната практика. Това ще доведе до коренна промяна в диагностицирането, прогнозирането и лечението на много заболявания.

След въвеждането на NGS през 2005 [1] и пускането на пазара на първите секвенатори от ново поколение през 2007-2008 г. приложението на технологията в сферата на генетичните проучвания нарасна многократно. NGS може да се приложи

за секвенционен анализ на всяка част от генома, включително целия геном, отделни екзони и други региони, представляващи интерес, и грубо може да се класифицира като пълно геномно секвениране, пълно екзомно секвениране, таргетно ДНК секвениране, РНК секвениране и метилационно ДНК секвениране [2, 3, 4].

ДНК секвенирането, използвано в хода на проекта човешки геном, се базира почти изцяло на Sanger метода (първо поколение секвениране), описан за първи път през 1977 г. [5]. Техническото усъвършенстване на метода чрез въвеждането на флуоресцентни бои и капиллярна електрофореза доведе до автоматизиране на техниката и по този начин увеличи секвенционния капацитет от няколко стотици до няколко хиляди бази за единичен анализ [6]. При NGS технологиите секвенционният капацитет надвишава една терабаза (1×10^{12}), като тази драстична разлика в сравнение със Sanger секвенирането се постига чрез масивно паралелно секвениране, основащо се на принципа „секвениране чрез синтез“ (Sequencing-By-Synthesis – SBS) [7]. Забележително е как с увеличаване на производителността намалява цената на изследването, като ярък пример за това е възможността на HiSeq X платформата на Illumina да секвенира човешки геном на цена 1000 \$.

Платформите за секвениране от следващо поколение най-общо могат да се разделят на второ и трето поколение. Обща черта на системите от второ поколение е нуждата от клонално амплифициране на ДНК за създаването на консенсусна матрица, преди да започне секвенирането. Друга обща черта е способността им да прочетат и двата края на ДНК фрагмент, което се означава като paired-end секвениране. Платформите от трето поколение използват метод на единично молекулно секвениране, елиминирайки нуждата от амплификация на ДНК матрица.

ВТОРО ПОКОЛЕНИЕ СЕКВЕНИРАНЕ

Roche платформа и методология

Секвенаторът 454 на компанията RocheLife Science е първата и може би една от най-широко използваните платформи за масивно паралелно секвениране. Всички 454 системи използват SBS технологията, като самото секвениране се осъществява чрез пиросеквениране. При него комплекс от ензими и оптически уреди отчитат отделянето на пирофосфат при свързването на нуклеотиди от ДНК полимеразата, като удълже-

ни хомополимерни повтори затрудняват процеса и са източник на грешки [8, 9]. Методиката е съпоставима с тази при секвенирането с Ion Torrent платформата.

Първият етап от секвенционния процес започва със създаването на ДНК библиотека. За тази цел ДНК в пробите се фрагментира и след процес на поправка на краищата (end-repair) към двойно-верижните фрагменти се лигират адаптери. Използват се два вида адаптери, А и В, вторият от които носи биотинова група. След лигиране и денатурация към сместа от фрагменти се добавят стрептавидин-натоварени микросфери, за да се пречисти библиотеката. Хомозиготните А-А фрагменти се отмиват, тъй като не съдържат биотинов маркер. Двойната стрептавидин-биотин връзка спомага за елиминирането и на хомозиготните В-В фрагменти. Остават само хетерозиготните А-В фрагменти, съставляващи вече пречистената ДНК библиотека. Следва амплификация на библиотеката чрез емулсионен PCR (emPCR) [10]. При този етап се използват микросфери към които всеки фрагмент се свързва чрез А адаптера. Емулсията вода в масло е създадена така, че да улови една микросфера със само един прикрепен ДНК фрагмент и заедно с всички необходими PCR компоненти създава условия за масивна паралелна амплификация. По този начин върху повърхността на всяка микросфера се получават стотици хиляди клонално амплифицирани ДНК фрагменти [11]. След премахване на емулсията амплифицираната библиотека се поставя в пикотитърна плака, съдържаща милиони ямки с размер, позволяващ на една ямка да побере само една микросфера [1]. Към всяка една от ямките се добавят и ензим-конюгирани микросфери, съдържащи ДНК полимераза, луцифераза и АТФ сулфурилаза.

Следващият етап включва секвенционната реакция, при която към плаката в строго определен ред се добавят отделни разтвори, съдържащи един от четирите нуклеотида. При инкорпорирането на всеки нуклеотид към новосинтезиращата се верига се освобождава пирофосфат, който се улавя от сулфурилазата и се конвертира в АТФ. В присъствието на АТФ луциферазата окислява луциферин, което води до формирането на оксилуциферин и квант светлина. Светлинният квант се отчита от оптичната система на секвенатора. Ако матричната верига съдържа хомополимерен участък, интензитетът на излъчената светлина е право пропорционален на броя идентични бази,

добавени към комплементарната верига. Това може да е източник на грешка, тъй като отчетеният светлинен сигнал не винаги е точен индикатор на броя инкорпорирани бази [12].

Illumina платформа и методология

HiSeq и MiSeq платформите на Illumina използват различна секвенционна техника спрямо Roche, базираща се на флуоресцентно белязани терминаращи нуклеотиди. Друга характерна черта при Illumina е използването на ДНК библиотеки, които се амплифицират чрез мостов PCR. За тази цел геномната ДНК се фрагментира, краищата се поправят, и към 3' края на всеки фрагмент се добавят поли-А краища чрез Klenow ДНК-полимераза (3'→5' ехо-) [13]. Полиаденилираните опашки служат за добавяне на частично комплементарни адаптери към двата края на двойноверижните фрагменти. Библиотеката се селектира спрямо дължината на фрагментите и се поставя във „флоу-клетка“, за да се извърши мостовата амплификация [14]. Използват се два характерни олигонуклеотидни праймера, forward и reverse, комплементарни на лигираните към библиотека адаптери [8]. Праймерите са свързани с 5' края си към повърхността на „флоу-клетката“ чрез гъвкави линкери, така че амплифицираните от даден ДНК фрагмент молекули остават групирани в клъстер от около 1000 клонални ампликона. Преди самото секвениране ампликоните се линеализират и към 3' краищата се добавят секвенционни праймери. Тогава към „флоу-клетката“ се добавят серия реактиви и SBS етапът започва.

Секвенционният етап е цикличен, като всеки цикъл представлява удължаване на новосинтезираната верига със само един нуклеотид. Използваните от Illumina нуклеотиди са модифицирани по два начина. Първо, всяка от четирите бази е свързана със специфичен флуорохром, което не изисква да бъдат добавяни към „флоу-клетката“ поотделно [15]. Второ, базите наподобяват дидеоксинуклеотидите, използвани при Sanger секвенирането, но те са „обратими терминатори“ – 3' хидроксилният остатък е блокиран от разцепваща се фракция, която не позволява инкорпорирането на повече от една база към новата верига [8]. Затова всеки цикъл се записва самостоятелно и секвенирането не може да продължи преди терминаращият край да се разцепи от нуклеотида и да разкрие хидроксилната група. Този секвенционен метод преодолява трудностите при секвенирането на хомополимерни повтори и позволява обратна връзка в реално време след

всеки секвенционен цикъл. Illumina платформите са податливи на някои слабости, главно засягащи дължината на четене, което може да е свързано с непълно или неравномерно отстраняване на терминаращата група. Въпреки това високата точност прави Illumina предпочитана платформа в много лаборатории, особено след представянето на настолния модел, MiSeq, подходящ за малки геноми, екзоми и таргетно секвениране [16].

Thermo Fisher платформа и методология

През 2011 и 2012 г. Life Technologies, с ера собственост на Thermo Fisher Scientific, представи платформите от следващо поколение Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) и Ion Proton. В основата им лежи изцяло нов подход за масивно паралелно секвениране и въпреки че се основава на SBS, той не се нуждае от флуоресцентно маркирани или хемилуминисцентни нуклеотиди, нито от оптическа система за детекция на инкорпорирането на нуклеотиди. Вместо това се използва чип, разработен на базата на полупроводникова технология, за да отчита не отделянето на пирофосфат по време на свързването на нуклеотид, а отделянето на протон, което също съпътства този процес. С други думи, полупроводниковият чип играе ролята на pH метър, който отчита промяната в pH, настъпваща при образуването на фосфодиестерна връзка в хода на синтезиращата се верига [15]. По този начин се ускорява времето за секвениране, което заедно с ниската цена и възможността за автоматизиране на подготовката на ДНК библиотеки правят Ion Torrent подходящ инструмент за таргетно секвениране и малки геномни анализи. От друга страна, PGM системата няма нужния капацитет за екзомно или геномно секвениране, като за тези цели се използва Ion Proton.

Работният процес започва със създаването на ДНК библиотека. Геномната ДНК първо се фрагментира до вериги с базова дължина 200-400, краищата се поправят и библиотеката се амплифицира и пречиства. След това към краищата на фрагментите се добавят адаптери. При мултиплексно секвениране, като секвениране на повече от един пациент, към фрагментите се добавят специфични молекулни баркодове [12]. Качеството на библиотеката се определя най-често с количествен PCR и след това тя се амплифицира чрез emPCR [10]. За процесите на амплификация и последното обогатяване на библиотеката (library enrichment), Life Technologies създаде системата „Ion OneTouch“, която автоматизира процеса и

значително намалява лабораторната работа [16]. След тази стъпка ДНК библиотеката се поставя в Ion Torrent чип и се центрофугира, за да се осигури максималното натоварване на чипа, и след това се иницира секвенционният процес.

В хода на секвенирането към чипа се добавят отделни разтвори на нативни нуклеотиди в определен ред. На дъното на всяка ямка на чипа има сензор. Той отчита промяната в рН, дължаща се на освободения протон при всяко инкорпориране на нуклеотид. Тъй като процесът не включва никакви оптически уреди, секвенционните реакции протичат при висока скорост, което съкращава времето за изследване. Както при 454 платформите, трудностите при прочита на дълги хомополимерни повтори се запазват [2].

ТРЕТО ПОКОЛЕНИЕ СЕКВИРАНЕ

Pacific Bioscience платформа и методология

PacBio RS на компанията Pacific Biosciences е първата платформа от т.нар. трето поколение секвениране. Платформата използва метод на единично молекулно секвениране, означен като SMRT (single-molecule-real-time) секвениране. Едно от основните предимства на метода пред платформите от втора генерация е по-голямата дължина на фрагментите, което улеснява картирането и сглобяването на секвенциите, както и секвенирането на дълги хомополимерни повтори. Може да се използва за детекция на генни изоформи и базови модификации (метиране) съответно чрез транскриптомен и епигенетичен анализ. Сред недостатъците на метода са ниската производителност, високият процент на грешка и високата цена за база.

SMRT секвенирането отчита нуклеотидната последователност по време на репликацията на таргетна ДНК молекула. Въпросната матрица е едноверижна кръгова ДНК, наречена SMRTbell, която се образува чрез свързването на специфични (hairpin) адаптери към двата края на двойноверижна ДНК молекула [17]. Изследваната проба се поставя в SMRT клетка (чип) където SMRTbell дифундира в наноскопична ямка, наречена ZMW (zero-mode waveguide), която предоставя най-малкия обем за детекция на светлина [18]. На дъното на всяка ZMW ямка е закотвена единична полимераза, която може да свърже един от двата адаптера на SMRTbell и да започне репликацията. Към чипът се добавят флуоресцентно белязани нуклеотиди и секвенционният процес започва. След отчитане на флуоресцентния сигнал, флуорохромът от инкорпорирания нуклеотид се отделя и полимеразата свързва следващата комплементарна база. В зависимост от живота на полимеразата двете вериги на SMRTbell молекулата могат да бъдат транскрибирани множество пъти. По този начин се увеличава точността на прочита, което зависи и от дължината на таргетната ДНК.

Таблица 1 [15, 16, 18, 19] представя в сравнителен аспект техническите характеристики и производителността на изброените NGS технологии. Те представляват част от най-широко използваните платформи, които биха намерили приложение в клиничната диагностика. Основните приложения на тази технология в диагностичен аспект са в областта на: диагностика на генетични заболявания, неоплазии, тъканно типизиране, молекулярна онкология и др.

Таблица 1. Преглед на техническите параметри и производителността на различните поколения секвенционни платформи

Производител	Thermo Fisher	Roche		Illumina		Thermo Fisher		Pacific Bioscience
Платформа	3730xl	454 GS FLX +	454 GS Junior	MiSeq	HiSeq 2500 HTv4	PGM 316 чип	Proton PI чип	RS II: P6-C4
Поколение	1	2	2	2	2	2	2	3
Метод	Sanger	SBS П	SBS П	SBS ОФТ	SBS ОФТ	SBS pH	SBS pH	SMRT
Амплификация	PCR	emPCR	emPCR	мостов PCR	мостов PCR	emPCR	emPCR	–
Дължина на прочит (bp)	600-1000	до 1000	700	2 x 300	2 x 125	400	200	1-1,5 x 10 ⁴ средно
Степен на грешка (%)	0,001	1	1	0,1	0,1	1	1	13
Производителност	60 Kb	700 Mb	35 Mb	15 Gb	1 Tb	1 Gb	10 Gb	500 Mb-1 Gb
Време/run	0,5-3 ч	23 ч	10 ч	65 ч	до 6 дни	3-5 ч	2-4 ч	0,5-4 ч
Цена за Mb (USD)	500	8,57	28,6	0,09	0,03	0,5	0,1	0,4-0,8

П – пиросеквениране; ОФТ – обратими флуоресцентно белязани терминатори

HLA ТИПИЗИРАНЕ

Следващото поколение секвениране намира широко приложение при генетичен анализ на силно полиморфни гени, какъвто е HLA регионът. В рутинната клинична диагностика HLA типизирането най-често служи за определяне степента на тъканно сходство между донор и реципиент при трансплантация, както и за диагностика на редица HLA-асоциирани заболявания. Конвенционално използваните ДНК базирани методи за HLA типизиране са SSP (sequence-specific primers), SSOP (sequence-specific oligonucleotide probes) и Sanger секвениране (sequence-based typing; SBT), последният от които досега се счита за най-информативен [20]. Тези техники се фокусират върху секвенирането на антиген-разпознаващото място на HLA молекулата, най-полиморфния регион в HLA гените и с най-голяма клинична значимост. Стандартно се типизират само 2 и 3 екзон на HLA клас I гените и 2 екзон на HLA клас II гените, като други HLA гени обикновено не се изследват заради финансовите и времевите ограничения. Въпреки това клиничното значение на други екзони остава неизвестно. Високият секвенционен капацитет на NGS технологиите позволява анализирането на по-големи региони и дори пълните геномни секвенции на няколко HLA гена при сто-тици проби изследвани паралелно.

Повечето от NGS-базираните методи за HLA типизиране са разработени, като се използват PCR техники за създаване на ДНК библиотеки. През 2009 г. *Gabriel et al.* и *Bentley et al.* за първи път представят такъв метод чрез платформата Roche/454 GS FLX [21, 22]. Той се фокусира върху клинично значимите екзони, които до този момент са анализирани чрез гореспоменатите стандартни техники. Различни PCR подходи, като long PCR и обратна транскриптаза (RT) PCR, са използвани за NGS HLA типизиране [23, 24, 25]. Те се различават преди всичко по праймерния дизайн и вида на използваната платформа. В частност long PCR методът позволява секвениране на целия HLA ген, включително интрони, нетранслирания участък, upstream и downstream региони, осъществявайки HLA типизиране с висока разграничителна способност.

Наскоро няколко компании представиха NGS китове за HLA типизиране, базирани на long PCR за подготовка на ДНК библиотека. Един тях е Omixon Holotype HLA, който кит ние успяхме да тестваме в клинични условия. Той използва MiSeq платформа за NGS и амплифицира 7 локу-

са (HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DRB1, -DPB1 и -DQA1). Резултатите от типизираните проби бяха съпоставими с тези, получени от SBT (данните не са показани), като неразграничими алелни комбинации за определени локуси бяха разрешени, което представлява лимитираща черта на SBT техниката, за чието решаване са нужни допълнителни тестове, които оскъпяват и удължават изследването. Слаба страна на тествания метод е трудоемкият лабораторен процес, който би могъл да се автоматизира, главно при стъпките на подготовка на библиотеките, за да се намалят лабораторното време, както и разходът на реагенти и консумативи.

МОЛЕКУЛЯРНА ДИАГНОСТИКА НА МИЕЛОИДНИ НЕОПЛАЗИИ

Появата и развитието на NGS технологиите спомогна за изясняване на молекулните механизми, стоящи в основата на развитието на миелоидните неоплазии. През 2008 г. *Ley et al.* използваха масивно паралелно секвениране за анализ на целия геном на пациент с остра миелоидна левкемия, идентифицирайки нови мутации в кодиращите региони на гени с неясна дотогава роля [26]. Оттогава изследванията в тази област на онкологията доведоха до установяване на често срещани соматични мутации, респективно молекулни пътища на патогенеза. Най-често засегнатите гени кодират сигнални протеини, транскрипционни фактори, епигенетични модулатори, туморни супресори, както и компоненти на сплайсозомата [27]. Бе показано, че част от тези мутации влияят на преживяемостта на пациентите, което ги превръща в потенциална мишена за бъдещи терапевтични подходи при тази група заболявания. В част от случаите използването на Sanger секвенирането или други конвенционални техники за детекция на соматичните мутации е лесно приложимо, когато гените притежават т.нар. „горещи точки“ на мутация. В останалата част обаче мутациите са разпръснати по цялата дължина на гена, обхващайки региони от няколко килобази. В тези случаи таргетното ампликонно секвениране чрез NGS предлага подходяща алтернатива.

Изхождайки от тази позиция, ние тестваме и първоначално валидирахме метод за мутационен анализ на пациенти с миелоидни неоплазии чрез собствен генен панел на полупроводниковата система Ion Torrent PGM [28]. Панелът обхваща кодиращите екзони на 9 клинично значими

гени, както следва: ASXL1, EZH2, CALR, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2 и U2AF1. Анализът показва 14 соматични кодиращи мутации в 7 от пробите ($n = 16$), засягащи 6 от тестваните гени. Три от установените мутации не присъстваха в базата данни Cosmic (v.67). Основен лимитиращ фактор на метода е броят селектирани гени. Този подход допълва няколко други разработки, използващи Illumina-базиран панел [29], и показва приложимостта на NGS технологията за таргетно ампликонно секвениране при клинични проби на пациенти с миелоидни неоплазии. Разбира се, включването на нов или вече разработен NGS метод в рутинната клинична диагностика се нуждае от независимо валидиране и стандартизиране [30].

Библиография

- Margulies, M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**, 2005, № 7057, 376-380.
- Hui, P. Next generation sequencing: chemistry, technology and applications. *Top Curr Chem*, **336**, 2014, 1-18.
- Yang, Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **12**, 2014, № 5, 190-197.
- Ma, Y, Shi N, Li M, Chen F, Niu H. Applications of Next-generation Sequencing in Systemic Autoimmune Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13**, 2015, № 4, 242-249.
- Sanger, F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 1977, № 12, 5463-5467.
- Metzker, ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*, **15**, 2005, № 12, 1767-1776.
- Lin, B, Wang J, Cheng Y. Recent patents and advances in the next-generation sequencing technologies. *Recent Pat Biomed Eng*, 2008, № 1, 60-67.
- Shendure, J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, **26**, 2008, № 10, 1135-1145.
- Su, Z, Ning B, Fang H, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, **11**, 2011, № 3, 333-343.
- Casey, G, Conti D, Haile R, Duggan D. Next generation sequencing and a new era of medicine. *Gut*, **62**, 2013, № 6, 920-932.
- Natrajan, R, Reis-Filho JS. Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, **11**, 2011, № 4, 425-444.
- Smith, AM, Heisler LE, St Onge RP, et al. Highly-multiplexed barcode sequencing: an efficient method for parallel analysis of pooled samples. *Nucleic acids research*, **38**, 2010, № 13, e142.
- Sam, LT, Lipson D, Raz T, et al. A comparison of single molecule and amplification based sequencing of cancer transcriptomes. *PloS One*, **6**, 2011, № 3, e17305.
- Stranneheim, H, Lundeberg J. Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology J*, **7**, 2012, № 9, 1063-1073.
- Niedringhaus, TP, Milanova D, Kerby MB, et al. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical chemistry*, **83**, 2011, № 12, 4327-4341.
- Liu, L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 251364.
- Travers KJ, Chin CS, Rank DR, et al. A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Res*, **38**, 2010, № 15, e159.
- Schadt, EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet*, **19**, 2010, № R2, R227-240.
- <http://allseq.com/kb-category/sequencing-platforms/>
- Erlich, H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens*, **80**, 2012, № 1, 1-11.
- Gabriel, C, Danzer M, Hackl C, et al. Rapid high throughput human leukocyte antigen typing by massively parallel pyrosequencing for high-resolution allele identification. *Hum Immunol*, **70**, 2009, № 11, 960-964.
- Bentley, G, Higurashi R, Hoglund B, et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens*, **74**, 2009, № 5, 393-403.
- Lind, C, Ferriola D, Mackiewicz K, et al. Next-generation sequencing: the resolution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Hum Immunol*, **71**, 2010, № 10, 1033-1042.
- Lank, SM, Golbach BA, Creager HM, et al. Ultra-high resolution HLA genotyping and allele discovery by highly multiplexed cDNA amplicon pyrosequencing. *BMC Genomics*, **13**, 2012, 378.
- Hosomichi, K, Jinam TA, et al. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. *BMC Genomics*, **14**, 2013, 355.
- Ley, TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*, **456**, 2008, № 7218, 66-72.
- Murati, A, Brecqueville M, Devillier R, et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer*, **12**, 2012, 304.
- Ivanova, M, Shivarov V, Pavlov I, Lilakos K, Naumova E. Clinical Evaluation of a Novel Nine-Gene Panel for Ion Torrent PGM Sequencing of Myeloid Malignancies. *Mol Diagn Ther*, **20**, 2016, № 1, 27-32.
- Kuo, FC, Dong F. Next-generation sequencing-based panel testing for myeloid neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep*, **10**, 2015, № 2, 104-11.
- McCourt, CM, McArt DG, Mills K, et al. Validation of next-generation sequencing technologies in comparison to current diagnostic gold standards for BRAF, EGFR and KRAS mutation analysis. *PLoS One*, **8**, 2013, № 7, e69604.

Постъпил за печат на 18 август 2016 г.