

# Генетические аспекты диагностики в профилактической медицине

Сидонец И. В., Мешков А. Н.

ФГБУ "Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины" Минздрава России. Москва, Россия

Секвенирование первого генома человека и последовавшее за ним стремительное развитие технологий, вызвавших существенное снижение стоимости генетического анализа и ускорение сроков его проведения, сделали возможным широкое внедрение методов генетической диагностики в клиническую практику. Современные методы молекулярной генетики позволяют анализировать наследственные факторы как на уровне хромосом методами молекулярной цитогенетики, так и на уровне точечных мутаций с помощью полимеразной цепной реакции, микрочипов или секвенирования. Темпы развития методов секвенирования следующего поколения позволяют предсказать скорое внедрение в практику персонализированного медицинского анализа большого массива генетических данных, которые

можно будет использовать для прогнозирования исхода заболевания, оценки его течения, а также для назначения и коррекции фармакотерапии. В этом обзоре рассмотрены различные и, в т.ч., новые подходы к генетической диагностике как редких, так и распространенных заболеваний, их достоинства и ограничения.

**Ключевые слова:** профилактическая медицина, генетическая диагностика, секвенирование, полимеразная цепная реакция, цитогенетика.

Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2014; 13 (4): 75–80

Поступила 10/06–2014

Принята к публикации 12/08–2014

## Genetics for diagnostics in preventive medicine

Sidonets I. V., Meshkov A. N.

FSBI State Scientific-Research Centre for Preventive Medicine of the Ministry of Health, Moscow, Russia

The sequencing of first human genome followed by rapid development of technologies, that led to significant lowering of costs for genetic analyze and its fast performing, made possible a broad invention of genetic diagnostics methods into clinical practice. Contemporary methods of molecular genetics make possible to research on inherited factors on chromosome level with molecular cytogenetics methods, and on the level of local mutations with the use of polymerase chain reaction, microchips and sequencing. Temps of the next generation sequencing methods provide the opportunity to predict soon inclusion in practice of

the personalized medical analysis of large genetic data massive, that can be used for the disease outcome prediction, estimation of its course, and for the prescription and correction of pharmacotherapy. In this review, different (including novel) approaches to genetic diagnostics are explored for the rare as common diseases, their benefits and restrictions.

**Key words:** preventive medicine, genetic diagnostics, sequencing, polymerase chain reaction, cytogenetics.

Cardiovascular Therapy and Prevention, 2014; 13 (4): 75–80

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, п.н. — пары нуклеотидов.

## Введение

Секвенирование первого генома человека и последовавшее за ним стремительное развитие технологий, вызвавших существенное снижение стоимости генетического анализа и ускорение сроков его проведения, сделали возможным широкое внедрение методов генетической диагностики в клиническую практику. В то же время практикующие врачи, зачастую, не могут разобраться в большом разнообразии методов и подходов, применяемых в генетической диагностике и правильно выбрать тот или иной анализ для пациента. В этом обзоре представлены различные и, в т.ч., новые

подходы к генетической диагностике как редких, так и распространенных заболеваний, их достоинства и ограничения.

### Диагностика наследственных заболеваний

Наследственное заболевание можно определить, как состояние организма, которое возникает в результате изменений в последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), унаследованных от родителей или возникших в качестве новых мутаций в половых клетках родителей. Патологические генетические изменения могут затрагивать большие фрагменты ДНК, содержащие множество генов или могут возникать на уровне отдель-

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Тел.: +7 (901) 512–12–71

e-mail: meshkov@lipidclinic.ru

[Сидонец И. В.\* — аспирант лаборатории "Молекулярной генетики", Мешков А. Н. — к.м.н., руководитель лаборатории].

ных их представителей. Первое можно отнести к геномным изменениям, которые варьируют от моносомий и трисомий (потеря или приобретение целых хромосом) до делеций и дупликаций тысяч оснований нуклеотидов. Диагностика таких вариаций стала возможной, когда было изобретено цитогенетическое тестирование.

#### Цитогенетика и цитогеномика

Основа метода — микроскопическое изучение хромосом человека. Цитогенетические методы более старые и постепенно уступают место новым технологиям. Однако они достаточно дешевые, внедрены в клиническую практику и используются для диагностики. Центральной задачей при проведении цитогенетического анализа является определение кариотипа — совокупности признаков (число, размеры, форма и т.д.) полного набора хромосом, присущей клеткам данного биологического вида, больным определенным заболеванием (для клинической практики). Хромосомный анализ производится на растущей культуре клеток человека, у которой ингибируется митоз, а затем производится подсчет и характеристика хромосом. Образцы могут быть взяты из периферической крови, амниотической жидкости, костного мозга или путем биопсии кожи. При кариотипировании хромосомы (аутосомы) ранжируются от 1 (наиболее длинной) до 22. Кариотип нормальной женщины содержит пару X-хромосом, мужчины — хромосомы X и Y. Основным методом анализа кариотипа остается техника дифференциального окрашивания хромосом. Дифференциальное окрашивание производят с помощью красителя Гимза-Романовского [1]. В зависимости от подготовки препарата (обработка протеазами или нагревание) можно получить окраски G-бэндинг и R-бэндинг, причем рисунок при R-окраске противоположен рисунку при G-окраске. G-бэндинг позволяет легко определить гомологичные хромосомы с помощью светового микроскопа. Однако, интерпретация результатов дифференциального окрашивания достаточно сложна, учитывая, что она включает анализ 400–500 полос на гаплотип.

Разработка метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH — от fluorescence hybridization) (лат. на месте) сделала более простой визуализацию и картирование хромосомных перестроек [2]. Флуоресцентный — означает, что специальный маркер возбуждаемый светом определенной длины волны излучает свет в более длинноволновой области в течение короткого времени ( $10^{-3}$  с), *in situ* показывает, что анализ хромосом, клеток или тканей производится на месте, на предметном стекле микроскопа. Короткая последовательность нуклеотидов, комплементарная последовательности изучаемого гена называется зонд. С помощью таких зондов,

помеченных флуоресцентными красителями, можно определить локализацию гена на хромосоме. С помощью зондов к центромерным повторам каждая хромосома может быть окрашена в различный цвет, что позволяет быстро оценить изменения в количестве хромосом. Применяя зонды, равномерно покрывающие всю хромосому, можно определить хромосомные aberrации — транслокации и делеции, в т.ч. сбалансированные транслокации. Преимуществом метода FISH является то, что с помощью него можно анализировать отдельную клетку, что важно для изучения опухолей и в пренатальной диагностике.

Анализ aberrаций хромосом по всей длине с помощью FISH возможен только на метафазных хромосомах. Однако при исследовании опухолей найти необходимое количество метафаз довольно сложно. Кроме того, морфология хромосом в опухолях сильно изменена, что затрудняет кариотипирование. Чтобы преодолеть эти сложности был разработан метод сравнительной геномной гибридизации CGH (comparative genomic hybridization) [3]. CGH является мощным и надежным подходом, связывающим классическую цитогенетику и молекулярно-генетические технологии. В последнее время эта технология преимущественно реализуется на микрочипах [4]. Она основана на когибридизации дифференциально окрашенных полногеномных тестовой и контрольной ДНК (смешанных в соотношении 1:1) с референсной ДНК на микрочипах. Окрашенные флуорохромами тестовая и контрольная ДНК конкурируют за связывание с референсной ДНК на микрочипах. В случае, если они связывают ее в соотношении 1:1, то можно говорить об отсутствии aberrации для данной пробы на чипе, если же сигнал от какого либо флуорофора преобладает, то это свидетельствует о микроделеции или вставке [5].

Этот метод имеет свои ограничения. С помощью него невозможно исключить сбалансированные хромосомные aberrации, точечные мутации, мозаицизм. Разрешающая способность большинства чипов варьирует между 1–5 млн. пар оснований. CGH широко применяется для анализа хромосомных перестроек при раке [6] и в пренатальной диагностике [7].

Несмотря на то, что аналитическая значимость цитогенетического тестирования очень высокая, интерпретация данных для клиники сопряжено с трудностями. В среднем цитогеномные микрочипы детектируют 1–2 делеции/вставки с длиной >1000 пар нуклеотидов (п.н.) на человека [8]. Благодаря появлению баз данных, содержащих популяционные данные по вставкам и делециям, процесс исключения значимых для развития вставок/делеций упрощается [9]. Однако множество вставок/делеций встречаются редко, и популяционные дан-

ные для них недостаточны. Тестирование образцов взятых у родителей позволит определить варианты полиморфизмов возникших *de novo*. В условиях лаборатории обычно можно определить патогенетическую значимость для вставок/делеций длиной >400 000 п.н. или их доброкачественность, если они унаследованы от здоровых родителей [10]. Последнее утверждение, однако, может быть несогласным в случае, если полиморфизм рецессивный и наследуется от обоих родителей или в случае, когда один дефектный полиморфизм получен от одного родителя, а другой возникает *de novo* [11].

#### Генетическое тестирование

Генетическое тестирование может быть разделено на 3 категории на основании степени генетической гетерогенности, ассоциированной с фенотипом. Первая — тесты, с помощью которых идентифицируют одну или несколько хорошо определенных мутаций. Примером такого теста может служить определение мутации в гене бета-глобина при серповидно-клеточной анемии [12] или лейденской мутации V фактора крови [13]. Вторая — тесты для заболеваний, которые ассоциированы с различными мутациями в одном и том же гене. Эти тесты обычно производят с помощью секвенирования ДНК. Примером такого теста является анализ мутаций в локусе 17q11.2, который вызывает нейрофиброматоз первого типа [14]. Третья группа тестов необходима для диагностики таких болезней как врожденная глухота [15] и кардиомиопатия [16], которые вызваны мутациями в одном из нескольких различных генов. Раньше было необходимо тестировать эти гены один за другим, при этом только тестирование наиболее частых вариантов могло снизить стоимость исследования. Теперь с появлением технологии параллельного секвенирования возможен одновременный анализ большого количества генов [17–18]. При этом, определение мутаций может быть подтверждено стандартным секвенированием по Сэнгеру. Следовательно, аналитическая значимость исследования велика, в то время как отрицательный результат не может обязательно исключать наличие мутации. С помощью параллельного секвенирования сложно определить мутации, связанные с изменениями структуры генов (инверсии или делеции).

В качестве материала для генетического тестирования наследуемых заболеваний может быть использована любая ткань, но обычно используется кровь. Генетическое тестирование может быть проведено задолго до проявления первых симптомов, позволяя осуществлять контроль заболевания, применяя терапевтические стратегии для снижения риска и семейное планирование. Тестирование на мутации по генам *BRCA1* и *BRCA2* у людей, имеющих в семье случаи заболевания раком яичников

или груди, может, например, оказать помощь в идентификации тех, у кого высокий риск этих заболеваний и провести хирургическое вмешательство или назначить медикаменты, снижающие риск [19]. Генетическое тестирование также позволяет определить более подходящие лекарственные препараты для каждого конкретного пациента. Подробную базу данных о генетических полиморфизмах, влияющих на выбор фармакотерапии можно найти на сайте PharmGKB (Pharmaco Genomics Knowledge Base) [20].

#### Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

ПЦР в реальном времени относится к тестам первой категории, когда нужно идентифицировать одну или несколько определенных мутаций. ПЦР — молекулярная технология, позволяющая увеличивать количество определенного участка ДНК в геометрической прогрессии с помощью термостабильной ДНК полимеразы и двух коротких затравок для нее — праймеров [21]. Праймеры представляют собой олигонуклеотидные пробы, каждая из которых гибридизуется к одной из цепей двуцепочечной ДНК. Пара праймеров направляет полимеризацию ДНК в противоположных направлениях и ограничивает участок ДНК, подлежащий амплификации. ПЦР включает 3 шага — денатурация ДНК, гибридизация праймеров и полимеризация ДНК, где каждый праймер выступает в качестве затравки. Классическая ПЦР позволяет определить качественное наличие или отсутствие мутации или небольшой делеции/вставки. Качественное определение исходного продукта стало возможным с изобретением ПЦР в реальном времени [22]. При проведении ПЦР в реальном времени количество двуцепочечной ДНК определяется на каждом цикле с помощью специфических олигонуклеотидных проб, содержащих флуоресцентную метку, либо с помощью флуоресцентных красителей, интеркалирующих только в двуцепочечную ДНК. Олигонуклеотидные пробы, называются также Taqman-зондами. Они содержат флуорофор и гаситель флуоресценции. В связи с тем, что флуорофор и гаситель, находясь на одной пробе, пространственно сближены, флуоресценция не происходит. Как только в результате ПЦР гибридизованная проба разрушается, благодаря 5'-3'-экзонуклеазной активности полимеразы, гаситель и флуорофор становятся пространственно разобщенными и флуоресцентный сигнал, соответствующий количеству анализируемой двуцепочечной ДНК, можно определять. Количество исходной ДНК можно рассчитать, используя калибровочные кривые.

ПЦР в реальном времени широко применяется для количественного определения вирусов [23], бактерий [24] или грибов [25] в тканях чело-

века. Также ПЦР в реальном времени используется для детекции лейкоэмических клеток после лечения. В этом случае от метода требуется высокая чувствительность, праймеры подбираются для детекции перестроек в генах иммуноглобулинов, к стыковым сайтам образовавшимся после транслокаций или других хромосомных aberrаций. В случае гематологических новообразований, ПЦР анализы оптимизированы для детекции нескольких опухолевых клеток нескольких видов лейкоэмий и лимфом [26–27].

Для детекции точечных мутаций и SNP (Single nucleotide polymorphism) разработано множество готовых наборов Taqman-проб. Каждая такая проба содержит 2 зонда, которые гибридизуются либо с наиболее распространенным аллелем, либо с минорным или мутантным аллелем. Пробы помечены разными флуоресцентными метками, и накопление флуоресцентного сигнала того или иного цвета может быть легко определено, что позволяет надежно обнаружить наличие гомозиготы или гетерозиготы [28].

Еще одной важной областью применения ПЦР в реальном времени является количественное измерение экспрессии генов. Изменения в экспрессии генов могут быть важным клиническим показателем, и в дальнейшем данные о дифференциальной экспрессии будут расширяться, валидироваться и входить в диагностическую практику. В клинической иммунологии, ПЦР в реальном времени широко применяется для анализа экспрессии цитокинов и хемокинов [29] — ключевых регуляторов дифференциации и активации множества иммунных клеток, модулирующих иммунный ответ. Нарушенный паттерн экспрессии цитокинов характеризует различные аутоиммунные, аллергические и инфекционные заболевания [30]. Также цитокины находятся в фокусе внимания при иммуносупрессорной терапии во время трансплантации органов. Использование ПЦР в реальном времени выявило роль цитокинов в диабете 1-го [31] и 2-го типов [32], аутоиммунном энцефалите [33] и др.

#### **Секвенирование по Сэнгеру**

Секвенирование (определение последовательности нуклеотидов) по Сэнгеру относится ко второй группе генетических тестов, применяемых, когда нужно определить заболевание, ассоциированное с различными мутациями в одном и том же гене. Секвенирование по Сэнгеру, также известное как метод обрыва цепи, является золотым стандартом в молекулярной диагностике, благодаря высокой надежности и информационному содержанию [34]. Для проведения секвенирования производится ПЦР с использованием специфического праймера к участку целевого гена. В реакционную смесь добавляют исследуемую ДНК, праймер, ДНК-полимеразу, дезоксирибонуклеотиды,

а также 4 вида дидезоксирибонуклеотидов несущих различные флуоресцентные метки. Там, где полимераз встраивает дидезоксинуклеотид дальнейший синтез не возможен. Таким образом, получается смесь продуктов синтеза ДНК различной длины. Продукты реакции разделяются с помощью капиллярного электрофореза полиакриламидном геле, что позволяет легко определять места включения дидезоксирибонуклеотидов и, следовательно, определить последовательность гена. Секвенирование по Сэнгеру широко используется для диагностики таких генетических заболеваний, как гемохроматоз, болезни Хантингтона и многих других.

#### **Экзомное и геномное секвенирование**

Экзомное и геномное секвенирование доступны для клинических диагностических тестов и могут быть проведены методами параллельного секвенирования [35–37]. Параллельное секвенирование — стремительно развивающаяся технология, позволяющая прочитать большие количества генетической информации. О мощности этой технологии говорит тот факт, что секвенирование генома человека, выполнявшееся с помощью секвенирования по Сэнгеру в течение 10 лет международным консорциумом, можно осуществить теперь на одном приборе в течение 2 нед. [38]. Важно учесть, что стоимость секвенирования также значительно снизилась и возможно продолжит снижаться. На данный момент стоимость секвенирования экзона человека составляет 600 долларов США (Axeq Technologies, Inc.). Умеренно высокая цена и высокая мощность параллельного секвенирования делают возможным в скором времени создание персонализированной медицины и фармакологии, где назначения лекарственных препаратов будут производиться, исходя из результатов экзомных и транскриптомных данных.

Для проведения параллельного секвенирования готовят, так называемые, геномные библиотеки. Для этого ДНК, выделенную из крови пациента, расщепляют с помощью ультразвука на фрагменты длиной 150–300 нуклеотидов. К фрагментам пришивают с обоих концов адапторы, которые содержат баркоды и участки для посадки праймеров для амплификации фрагментов. Затем библиотеки фрагментов ДНК амплифицируют с помощью ПЦР. В случае секвенирования экзотов пул фрагментов соответствующих экзому выделяют с помощью специфических к экзомным участкам олигонуклеотидных проб, связанных с магнитными частицами. Затем производится определение последовательности полученных фрагментных библиотек методами пиросеквенирования, секвенирования путем синтеза, ионного полупроводникового секвенирования и секвенирования путем лигирования.



В связи с тем, что экзом составляет 1–2% генома, экзомное секвенирование значительно дешевле геномного, при этом для большинства мутаций в экзоне можно предсказать патогенность биоинформатическими методами. Важно отметить, что полное секвенирование экзома пока не реализовано, удалось отсеквенировать 90–95% его последовательности. При этом для некоторых генов покрытие крайне мало или отсутствует [39, 40].

Геномное и экзомное секвенирование может быть полезно для детекции мутаций, которые не предполагались для клинического фенотипа. Для множества генетических нарушений фенотип неспецифичен (умственная отсталость), неясен (для редких заболеваний) или варьирует от пациента к пациенту, что делает сложным выбор гена для тестирования. Поэтому проведение полноэкзомного секвенирования может быть полезно для установления диагноза, снижения расходов на дальнейшие дорогостоящие анализы, прогнозирования предполагаемых осложнений и, возможно, назначения терапии [41].

Экзомное секвенирование часто выполняется на трио, состоящим из ребенка и обоих родителей (или из заболевшего индивидуума и здоровых сиблингов). Это позволяет отфильтровать значительное количество генетических полиморфизмов, влияющих на фенотип. Исследование родительских образцов позволяет детектировать новые доминантные мутации в пробанде. В случае рецессивных мутаций, мутантные варианты должны быть обнаружены в обеих копиях гена. Важным непреднамеренным результатом экзомного секвенирования является идентификация мутаций, которые могут быть не критичны для основного заболевания, но нести полезную прогностическую информацию, например, упомянутый ранее ген *BRCA1* [42].

Стоит также отметить, что основную стоимость генетического исследования с помощью методов параллельного секвенирования будет составлять биоинформатический анализ. Скорее всего, его будут продолжать автоматизировать и, возможно, он станет доступным для подготовленных клиницистов.

#### Микрочипы

ДНК-микрочипы прочно входят в диагностическую практику и подобно параллельному секвенированию позволяют проводить обширный генетический анализ вплоть до полногеномного скринирования маркеров болезни. ДНК-микрочип состоит из тысяч коротких олигонуклеотидов пришитых ковалентно к стеклу. Около тысячи идентичных нуклеотидов, гибридизованных с меченой ДНК отображаются как флуоресцирующее пятно. На чипе может содержаться до нескольких тысяч проб. ДНК-микрочипы применяются в различных

направлениях: для изучения дифференциальной экспрессии, для полногеномной сравнительной гибридизации, упоминавшейся выше, для изучения экспрессии микроРНК, для детекции SNP и для анализа уровня метилирования ДНК. Мечение флуоресцентными метками осуществляется при обратной транскрипции или при комплементарном синтезе ДНК. В случае использования одной флуоресцентной метки можно сравнивать уровень сигнала для разных образцов, в случае использования двух образцов случай-контроль, образцы можно метить разными флуоресцентными маркерами (обычно это Cy3 и Cy5) и анализировать на одном микрочипе. В этом случае появляется возможность дополнительного внутреннего контроля, когда относительный сигнал между двумя образцами не зависит от их абсолютных значений, и может сравниваться с данными для других пар [43].

С помощью микрочипов для анализа SNP были проведены многочисленные исследования, посвященные поиску полногеномных ассоциаций полиморфизмов с генетическими заболеваниями. Было обнаружено множество ассоциаций, большинство из которых имеет слабый эффект [44, 45]. Дальнейшее изучение возможной роли комбинаций слабых взаимодействий может открыть важную компоненту в генетике сложных многофакторных заболеваний [46].

В клинической диагностике входит в практику применение микрочипов для диагностики и модулировании терапевтических назначений в онкологии. Изучение изменений в паттернах экспрессии позволяет определить, какие сигнальные пути активированы в каждом конкретном случае развития опухоли. Для рака груди определены паттерны экспрессии в зависимости от гистологических показателей, наличия метастазов, активации гена *ERBB2*, мутаций в гене *p53*. Используя эти паттерны можно детально классифицировать случаи болезни и сделать более точный прогноз заболевания [47–49].

#### Заключение

Современные методы молекулярной генетики позволяют анализировать наследственные факторы как на уровне хромосом методами молекулярной цитогенетики, так и на уровне точечных мутаций с помощью ПЦР, микрочипов или секвенирования. Темпы развития методов секвенирования следующего поколения позволяют предсказать скорое внедрение в практику персонифицированного медицинского анализа большого массива генетических данных, которые можно будет использовать для прогнозирования исхода заболевания, оценки его течения, а также для назначения и коррекции фармакотерапии.

## Литература

1. Smeets DF. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem* 2004; 37 (6): 439–46.
2. Harper ME, Saunders GF. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 1981; 83 (3): 431–9.
3. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258 (5083): 818–21.
4. Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; 29 (3): 263–4.
5. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet* 2002; 70 (5): 1269–76.
6. Salahshourifar I, Vincent-Chong VK, Kallarakkal TG, et al. Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2014.
7. Shaffer LG and Rosenfeld JA. Microarray-based prenatal diagnosis for the identification of fetal chromosome abnormalities. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13 (6): 601–11.
8. Chen W, Hayward C, Wright AF, et al. Copy number variation across European populations. *PLoS One* 2011; 6 (8): e23087.
9. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* 2009; 84 (4): 524–33.
10. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010; 86 (5): 749–64.
11. Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, et al. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* 2010; 42 (3): 203–9.
12. Quinn CT. Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. *Pediatr Clin North Am* 2013; 60 (6): 1363–81.
13. Press RD, Bauer KA, Kujovich JL, et al. Clinical utility of factor V Leiden (R506Q) testing for the diagnosis and management of thromboembolic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126 (11): 1304–18.
14. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat* 2000; 15 (6): 541–55.
15. Geelhoed EA, Harrison K, Davey A, et al. Parental perspective of the benefits of genetic testing in children with congenital deafness. *Public Health Genomics* 2009; 12 (4): 245–50.
16. Groeneweg JA, van der Heijden JF, Dooijes D, et al. Arrhythmogenic cardiomyopathy: diagnosis, genetic background, and risk management. *Neth Heart J* 2014.
17. Klee EW, Hoppman-Chaney NL, Ferber MJ. Expanding DNA diagnostic panel testing: is more better? *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11 (7): 703–9.
18. Dixon-Salazar TJ, Silhavy JL, Udpal N, et al. Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. *Sci Transl Med* 2012; 4 (138): 138ra78.
19. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2003; 21 (12): 2397–406. <https://www.pharmgkb.org/>.
20. Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263–73.
21. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6 (10): 995–1001.
22. Ohga S, Kubo E, Nomura A, et al. Quantitative monitoring of circulating Epstein-Barr virus DNA for predicting the development of posttransplantation lymphoproliferative disease. *Int J Hematol* 2001; 73 (3): 323–6.
23. van Haeften R, Palladino S, Kay I, et al. A quantitative LightCycler PCR to detect *Streptococcus pneumoniae* in blood and CSF. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47 (2): 407–14.
24. White PL, Shetty A, Barnes RA. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol* 2003; 52 (Pt 3): 229–38.
25. Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, et al. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res* 1998; 58 (17): 3957–64.
26. Jaeger U and Kainz B. Monitoring minimal residual disease in AML: the right time for real time. *Ann Hematol* 2003; 82 (3): 139–47.
27. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999; 14 (5–6): 143–9.
28. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001; 25 (4): 386–401.
29. Borish LC and Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2 Suppl): S460–75.
30. Gysemans CA, Waer M, Valckx D, et al. Early graft failure of xenogeneic islets in NOD mice is accompanied by high levels of interleukin-1 and low levels of transforming growth factor-beta mRNA in the grafts. *Diabetes* 2000; 49 (12): 1992–7.
31. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, et al. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D (3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77 (1): 47–57.
32. Van Etten E, Branisteanu DD, Overbergh L, et al. Combination of a 1,25-dihydroxyvitamin D3 analog and a bisphosphonate prevents experimental autoimmune encephalomyelitis and preserves bone. *Bone* 2003; 32 (4): 397–404.
33. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *1977. Biotechnology* 1992; 24: 104–8.
34. Gonzaga-Jauregui C, Lupscki JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med* 2012; 63: 35–61.
35. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, et al. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012; 20 (5): 490–7.
36. Bick D and Dimmock D. Whole exome and whole genome sequencing. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23 (6): 594–600.
37. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, et al. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Hum Genomics* 2011; 5 (6): 577–622.
38. Kiezun A, Garimella K, Do R, et al. Exome sequencing and the genetic basis of complex traits. *Nat Genet* 2012; 44 (6): 623–30.
39. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12 (11): 745–55.
40. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 2011; 13 (3): 255–62.
41. Kohane IS, Hsing M, Kong SW. Taxonomizing, sizing, and overcoming the incidentalome. *Genet Med* 2012; 14 (4): 399–404.
42. Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 1996; 6 (7): 639–45.
43. Holden AL. The SNP consortium: summary of a private consortium effort to develop an applied map of the human genome. *Biotechniques* 2002; Suppl: 22–4, 26.
44. Zhang TX, Haller G, Lin P, et al. Genome-wide association study identifies new disease loci for isolated clubfoot. *J Med Genet* 2014.
45. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009; 461 (7265): 747–53.
46. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347 (25): 1999–2009.
47. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415 (6871): 530–6.
48. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406 (6797): 747–52.