



Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 2 / 2016 г.

ISSN 1314-3581
<http://journal.raredis.org>

Нови геномни технологии при диагностиката на вродени аномалии

Марта Михайлова, Драга Тончева, Савина Хаджидекова

Категра Медицинска генетика, Медицински факултет,
Медицински университет – София

Резюме

Вродените малформации и интелектуалният дефицит (ВМ/ИД) представляват сериозен проблем, поради тяхната висока честота (3-5%). ВМ/ИД са причина за 33% от неонаталната смъртност. В приблизително 40% от случаите генетичният дефект остава неясен. Много от тях имат хетерогенна етиология и затова те са трудни за диагностициране. Цитогенетичният метод не е достатъчен за поставяне на диагноза при голям процент от ВМ/ИД, които остават без уточнена етиология.

В пост-геномната ера новите диагностични подходи ще позволят по-добро разбиране на молекулните основи на вродените аномалии. Два от най-информативните методи за диагноза са микрочиповата сравнителна геномна хибридизация (array CGH, СГХ) и секвениране от следващо поколение (NGS). Тенденцията през последните години е тези технологии да се използват за откриване на кандидат гени за ВМ/ИД и диагностициране на пациенти с неуточнена клинична картина.

Ключови думи: вродени аномалии, секвениране от следващо поколение, микрочипова СГХ.

New genomic technologies in the diagnosis of congenital anomalies

Marta Mihajlova, Draga Toncheva, Savina Hadjidekova

Department of Medical Genetics, Medical Faculty,
Medical University of Sofia

Abstract

Congenital malformations and intellectual disabilities (CM/ID) represent a serious problem due to their high frequency (3-5 %). CM/ID are responsible for 33% of neonatal mortality. In about 40% of the cases the underlying genetic defects are still unidentified. Congenital anomalies are etiologically heterogeneous which makes them a serious diagnostic problem.

The cytogenetic method is often insufficient for the diagnosis of a large number of anomalies which thus remain with unknown etiology.

The new methodological approaches in the post-genomic era will allow a better molecular understanding of congenital anomalies. Two of the most informative methods for diagnosis are microarray comparative genomic hybridization (array CGH) and next-generation sequencing (NGS).

The tendency in the recent years is to use these genomic technologies to detect candidate genes in CM/ID and to diagnose patients with uncertain clinical findings.

Keywords: congenital anomalies, next-generation sequencing (NGS), microarray, (array CGH).

Кореспонденция:

Д-р Марта Михайлова, гм
e-mail: marta.mih@gmail.com

Correspondence:

Marta Mihajlova, MD, PhD
e-mail: marta.mih@gmail.com

Въведение

Неонаталната детска смъртност е сериозен проблем, причинен в немалък процент от случаите от вродени аномалии. Причината за около 40% от тях все още остава неясна.

Поради трудното поставяне на диагноза, ВМ/ИД се превръщат в един от най-актуалните проблеми в медицината. Сложността произхожда и от тяхната значителна клинична и генетична хетерогенност. В България се раждат всяка година около 3500 нови болни с генетично заболяване. ВМ/ИД засягат сериозно обществото като цяло и в частност семейната единица. Те водят до нарастване на заболяемостта и смъртността и влияят негативно на раждаемостта. Цената за отглеждане и лечение на генетично болните е изключително висока. Финансово ангажиран е всеки член на обществото посредством бюджета, социалното и здравно осигуряване.

При около 40-60 % от случаите причините за аномалиите, не могат да бъдат открити с конвенционално кариотипиране. Този метод е с ниска резолюция, отнема много време, трудоемък е и труден за автоматизиране. През последните три десетилетия използването на молекулярни и молекулярно-цитогенетични техники като FISH (Fluorescent in Situ Hybridization), QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), подобри диагностиката на много неясни дисморфични синдроми, но се изисква предварителна информация за подозираната хромозомна аномалия и местоположението ѝ.

Високият процент на вродени малформации с неясна етиология и бързото развитие на геномиката, разкриват необходимостта от прилагане на скринингови методи с висока разделителна способност за диагностика, консултиране, превенция и лечение на вродени аномалии.

Новите геномни технологии за провеждане на скрининг като сравнителна геномна хибридизация (aCGH) и следващите – секвениране от следващо поколение (NGS), комбинират предимствата на конвенционалните технологии, като позволяват цялостен геномен скрининг с висока резолюция.

В тази статия ще разгледаме използването на aCGH и NGS технологиите при диагностиката на пациенти с вродени аномалии.

Дискусия

Микрочиповите технологии все по-често намират приложение като основен генетичен скринингов метод за диагностициране на пациенти с нарушения в развитието. Този метод позволява откриване на субмикроскопски хромозомни нарушения.

Високата разделителна способност на микрочипова-

та СГХ я прави основен метод на избор при детекцията на кандидат-районите за гени, отговорни за различни генетични заболявания [1]. В някои случаи с неясна етиология са открити фамилни микроструктурни аберации, предавани в небалансиран вид в поколението. Поради ограниченията на конвенционалните методи тези геномни аберации остават недиагностицирани. Разбирането на същността на небалансираните геномни аберации посредством СГХ при пациенти, доведе до описването на нови синдроми и до доизясняване на описаните вече [2-9].

В Катедрата по Медицинска генетика за първи път в България се проведе цялостен геномен скрининг чрез микрочипов ДНК анализ на пациенти с ВМ/ИД [10]. Установиха се 17,3% честота на патологични микроструктурни аберации. Открити бяха за първи път пет комбинирани микроструктурни делеции и дупликации. В друго проучване на Авджиева-Тзавелма и сътр. са изследвани 83 деца с аутистично поведение, съпроводено или не с дисморфични стигми и/или умствена недостатъчност, с цитогенетични, молекулярно-цитогенетични и молекулярни методи [11-13]. Като краен резултат от всички проведени изследвания молекулната причина е разкрита при 12 деца (14%). Чуждестранни проучвания в областта също показват положителните страни на използвания метод [14].

Микрочиповите технологии са разработени в края на 90-те години от Solinas – Toldo и сътр. и Pinkel и сътр. [15, 16]. Най-често използваните от тях – CNVs чиповете, се базират на конкурентна хибридизация между белязани с различни флуорохроми контролна и тествана ДНК върху фиксирани на твърд носител ДНК фрагменти. Методът е високо ефективен при анализ на болести зависими от генната доза, тъй като в една реакция може да се изследва за вариации в броя копия в целия геном. Предлагат се два варианта чипове: таргетни и чипове за цялостен геномен анализ (ЦГА) [9, 17, 18]. Предимствата на ЦГА са няколко: скриниране на генома в рамките на единична реакция, откриване на нови микроделеционни и микродупликационни синдроми [19], изследване на болни, чиито симптоми са извън критериите на познатите генетични синдроми и уловяване детекцията на патологични CNVs [20]. Известни недостатъци са цената на метода и необходимостта в някои случаи от изследване на родителите – при CNVs с неясно клинично значение.

В научната литература се натрупват все повече данни, показващи предимствата на микрочиповите технологии пред конвенционалните методи. Едни от тях са:

- високата разделителна способност.
- детекция на ниско-степенен мозаицизъм.
- откриване на хромозомен дисбаланс при привидно балансирани преустройства.

Методът има и своите ограничения. С него не могат да се открият балансиранни транслокации, моногенни дефекти и кратни промени на хаплоидния хромозомен набор.

Благодарение на високата си резолюция и чувствителност, микрочиповата технология се превърна в ключов подход при диагностицирането на пациенти с множество вродени малформации, и/или умствено увреждане [21].

Именно високата разделителна способност на метода доведе до значително увеличаване на броя идентифицираните гени чрез молекулярно картиране, а вероятно предстои идентифициране и на още много с прилагането на тази технология.

Въпреки, че използването на микрочиповия ДНК анализ доведе до разкриване на молекулната природа при 15-17% от неясните случаи с ВМ/ИД, все още значителна част остават с неизвестна етиология. Предполага се, че половината имат генетична причина. Очевидна е нуждата от нови методи с по-висока резолюция за търсене на скрити генетични дефекти. Научно-изследователските възможности в областта на генетиката се увеличиха извънредно много след разработването на секвенирането от ново поколение (NGS – next generation sequencing). Скринирането на целия геном в една реакция при неограничена резолюция практически дава възможност за откриване на огромен брой генетични варианти. Преди три години България беше сред първите пет страни в Европа след Англия, Германия, Швейцария и Холандия, която въведе секвенирането от ново поколение. С въвеждането на тази нова геномна технология у нас стана възможно да се направи трансфер на върхови научни постижения в клиничната практика.

Секвениращите технологии претърпяха силен тласък в развитието си през последните няколко години. Полуавтоматичното секвениране по Sanger, което се прилага рутинно в България от много години, е златен стандарт в лабораторната диагностика, но има редица ограничения: времеемко е, трудоемко, изисква квалифицирани умения и има висока цена. Появата на секвенирането от ново поколение съществено промени пейзажа на геномната медицина, превъзхождайки класическото секвениране по много показатели – бързина (в една реакция могат да се изследват целия геном, екзом или панел от голям брой гени); точност на резултата; скрининг на генома без необходимост от предварителна информация относно суспектната генетична аномалия; ниска цена на анализа. Трябва да бъдат споменати и някои ограничения на технологията: неточно секвениране на повторени ДНК секвенции (несигурен резултат при динамични мутации); грешки при секвенирането на къси фрагменти (средно 200-500 нуклеотида); сложност на анализа на данните (необходимост от задълбочени познания в областта на биоинформатиката) [22-26].

Ресеквенирането на генома чрез NGS намира все по-голямо приложение в много области: **геномната медицина** – идентификация на нови гени и регулаторни елементи, участващи в патологичните процеси; подобряване на диагнозата и профилактиката на болестите; **фармакогеномиката** – дизайн на лекарствата въз основа на структурата на гените; изследване на ДНК мутации, асоциирани с предразположеност към заболяване или чувствителност към лекарства; **еволюцията и сравнителната биология** – сравняване на ДНК между различни организми може да разкрие историята на тяхната еволюция; **публичното здравеопазване и епидемиология** – секвенирането на генома на редица бактерии и вируси улесни идентификацията на нови вирулентни фактори и т.н [24].

NGS предлага три главни типа анализи – анализ на таргетни панели от гени, екзомно секвениране и цялостно геномно секвениране. Понастоящем по-малко от 10% от човешкия геном е характеризирани добре и ползата от секвенирането на целия геном на пациент би имало твърде ограничена полза при търсенето на генотип/фенотипни корелации. Следователно много по-подходящо за целите на медицинските проучвания би било секвенирането само на екзома (2% от генома, представляват протеин-кодиращи региони или екзони), менделианомата (кодиращите региони на 2993-те известни до момента болестни гени) или използването на таргетни панели от гени за определени заболявания [27, 28].

В последните няколко години екзомното секвениране се прилага усилено при търсенето на кандидат гени за различни заболявания [29-31]. То улеснява идентификацията на мутации при патологични фенотипи с неизвестна генетична причина [32].

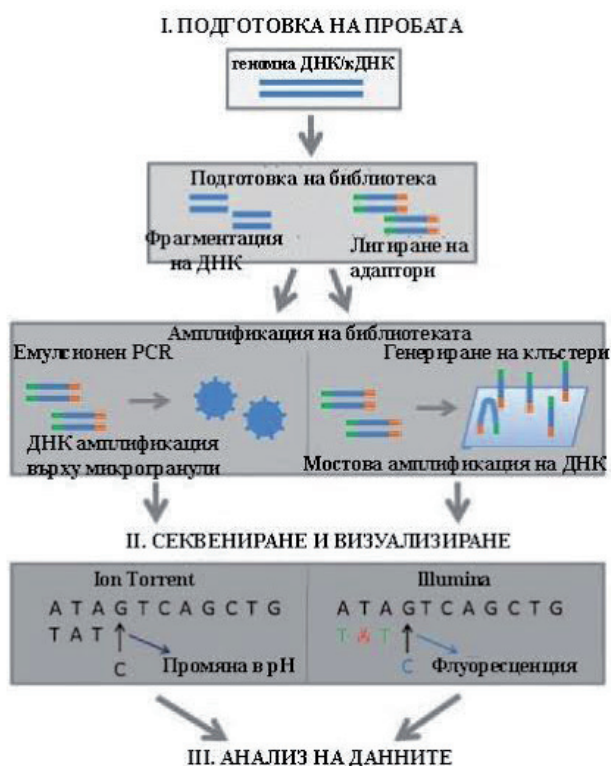
Технологията на NGS обхваща 3 главни стъпки: (1) подготовка на пробата; (2) секвениране и визуализация и (3) анализ на данните.

Подготовка на пробата. Подготовката на пробата включва създаване на библиотека от нуклеинови киселини (ДНК или комплементарна ДНК) и амплификацията им. Секвенционните библиотеки се конструират чрез фрагментиране на ДНК пробата и лигиране на адапторни секвенции (синтетични олигонуклеотиди с известна последователност) в краищата на ДНК фрагментите. Така подготвените библиотеки се амплифицират преди секвенирането им [22].

Секвениране и визуализация. Основният принцип на метода се основава на „секвениране чрез синтез“, включващо синтез на голям брой ДНК секвенции, които впоследствие се секвенират едновременно. Фрагментите от библиотеката служат като матрици, върху които се синтезират новите ДНК фрагменти. При включването на

нуклеотидите в растящата ДНК верига, те се регистрират дигитално като секвенция. Детекцията на инкорпорирането на нуклеотидите може да стане по два различни механизма: отчитане на рН промяна, индуцирана от освобождаването на водороден йон при свързването на нуклеотидите или детекция на флуоресценция, генерирана при инкорпорацията на флуоресцентно белязани нуклеотиди [22].

Анализ на данните. След приключване на секвенирането суровите данни преминават последователно през няколко вида анализ. Достъпни са редица софтуерни пакети за анализ на NGS - данните [33-36]. Първичната обработка на информацията включва отстраняване на адапторните секвенции и секвенционните разчитания с ниско качество. Същинският анализ може да се подраздели на 4 първични операции: (1) идентификация на отделните нуклеотиди/бази (base calling); (2) коректно позициониране на късите разчетени ДНК секвенции (50-400 bp) в генома спрямо референтна секвенция (read alignment); (3) идентификация на ДНК вариантите в анализираната секвенция спрямо референтен геном (variant calling); (4) анотация на вариантите (variant annotation) – дава информация за природата на варианта в зависимост от локализацията (в нетранслируем регион, екзон, интрон); функционалния тип (missense, nonsense, frameshift); структурния вид (делеции, инсерции, инверсии); клиничното значение (доброкачествени, вероятно доброкачествени, с неясно клинично значение, вероятно патологични, патологични) и др. (Диаграма 1).



Диаграма 1. Принцип на NGS технологията, включваща 3 главни стъпки: подготовка на пробата; секвениране и анализ на данните.

По-голям са изброени някои от методите за секвениране следващото поколение. Това са: (MPSS) - massively parallel signature sequencing, Polony sequencing, 454 pyrosequencing, Illumina (Solexa) sequencing, SOLiD sequencing, Ion Torrent semiconductor sequencing, DNA nanoball sequencing, Heliscope single molecule sequencing and Single molecule real time (SMRT) sequencing.

Методи в развитие са: Nanopore DNA sequencing, Tunnelling currents DNA sequencing, Sequencing by hybridization, Sequencing with mass spectrometry, Microfluidic Sanger sequencing, Microscopy-based techniques, RNAP sequencing, In vitro virus high-throughput sequencing.

Приложението на NGS осигурява изобилно количество данни за множество генетични варианти. Мнозинството от случаите идентифицирането на патологичните мутации представлява сериозно предизвикателство при търсенето на нови гени [37]. Сложността при обработката на данните, анализа и интерпретацията на резултатите изисква мощни биоинформатични подходи [38]. Много полезно при оценката на клиничното значение на генетичните варианти е сравняването на собствените данни с публично достъпни бази данни [39, 40]. Като цяло функционалните варианти в гените, отговорни за менделовите болести се толерират по-малко в сравнение с тези в гените, които не са асоциирани с известни болести [41]. Генетичните варианти могат да окажат ефект върху фенотипа чрез промяна нивата на генната експресия. Промяната на генната гоза може да доведе до промяна в нивата на иРНК, което да се отрази на количеството на синтезирания протеин. За определени гени и биохимични процеси, за които количеството количество на дадения протеин е критично, това може да доведе до болестен процес. Промяната на генната експресия, може да се дължи както на делеции, така и на дупликации. При гоза-зависимите гени делецията на един алел може да доведе до болестен фенотип, в случай, че оставащия върху хомоложната хромозома алел е с рецесивна патологична мутация.

При интерпретацията на вариациите се прави индивидуална оценка на всеки отделен вариант въз основа на участващия ген (асоцииран или не с менделовите болести); функционалния тип (missense, nonsense, frameshift); структурния тип (делеции, инсерции, инверсии и др); тип на унаследяване (доминантно, рецесивно или де ново). Генетичните варианти се категоризират в 5 групи съобразно клиничното им значение – (1) доброкачествени, (2) вероятно доброкачествени, (3) с неясно клинично значение, (4) вероятно патологични и (5) патологични. При интерпретацията и оценката на различните варианти се спазва специфичен алгоритъм.

Все още познанията ни относно значението на различните варианти са недостатъчни, което затруднява клиничната оценка на вариациите и откриването на ясни генотип-фенотипни корелации. Интерпретацията на вариантите с неясно клинично значение (VUS - variants of unknown clinical significance) засега са голямо предизвикателство при анализа на NGS данните. За да се разбере ролята им за заболяванията при човека, първоначално трябва да се изследва голяма контролна популация, за да се характеризира структурата, честотата, разпределението и неравновесната скаченост на всеки вариант [42]. Развитието на геномните технологии за скриниране на целия геном разкри неочаквано голям брой вариации. При интерпретацията на VUS клиничните лаборатории, освен на обществено достъпни бази данни, могат да се основават и на собствени бази данни с нормални варианти, получени при валидирането на гадена NGS платформа, преди въвеждането ѝ в рутинната практика. В допълнение от огромно значение за определяне на клиничното значение на тези варианти е институциите да си обменят информация. Публикуваните неотдавна резултати от секвенирането на 1092 човешки генома, проведено от “The 1000 Genomes Project Consortium” улесняват не само интерпретацията на данните от различни генетични асоциативни проучвания, но също така предлагат практичен модел за дизайн и интерпретация на NGS-базиран изследвания [42]. Вече е известно, че редица редки варианти, асоциират с някои комплексни заболявания, както и с редки генетични и Менделови болести [27]. Разкриването на природата и разпределението на генетичните варианти ще допринесе не само за изясняването на биологичното значение на де ново възникналите и редките наследствени варианти, асоциирани с редките и менделовите болести, но и за установяването на варианти, увеличаващи риска за някои мултифакторни болести [43-45]. Важен етичен въпрос е дали да се съобщават на пациента случайни находки. Честотата на високо пенетрантни патологични или вероятно патологични варианти е под 3,4% при индивиди с европейски произход и под 1,2% при индивиди с африкански произход [46]. Понастоящем има консенсус, че животоспасяваща информация и данни за непосредствено клинично приложение следва да се оповестяват незабавно [47].

Заклучение

Прилагането на секвениране от следващо поколение увеличи драматично броя на откритите нови синдроми и гени както и детекцията на генетичните дефекти в голям брой вече описани синдроми с неизвестна етиология.

Безспорно разработването на NGS технологията е един от най-големите пробиви в областта на геномиката

в наши дни. Приложението ѝ в последните няколко години, заедно с прилагането на микрочипови ДНК технологии доведе до драстично увеличение не само на новооткрити синдроми и гени, но също така и до разкриване на генетичния дефект при голям брой вече описани синдроми с неизвестна етиология [48-53]. Разкриването на молекулните причини за ВМ/ИД ще доведе както до подобряване на генетичната диагностика и консултиране, така и до изработването на стратегии за профилактика и лечение.

Библиография

1. Zlotina A, Nikulina T, Yany N et al: Ring chromosome 18 in combination with 18q12.1 (DTNA) interstitial microdeletion in a patient with multiple congenital defects. *Mol Cytogenet.* 2016;9:18.
2. de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP et al: What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). *Eur J Pediatr.* 2007;166(7):637-43.
3. Feuk L, Carson AR, Scherer SW: Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006;7(2):85-97.
4. Friedman JM, Baross B, Delaney AD et al: Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation. *The American Journal of Human Genetics.* 2006;79(3):500-13.
5. Ishkhanian AS, Malloff CA, Watson SK et al: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet.* 2004;36(3):299-303.
6. Menten B, Maas N, Thienpont B et al: Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet.* 2006;43(8):625-33.
7. Sanlaville D, Lapiere JM, Turleau C et al: Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. *Eur J Med Genet.* 2005;48(3):214-31.
8. Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D et al: Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007;316(5823):445-9.
9. Shaffer LG, Bejjani BA: Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 2006;115(3-4):303-9.
10. Хаджигекова С: Микроструктурни геномни аберации при пациенти с вродени малформации. Дисертация при Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София. 2011;
11. Avdjieva-Tzavella D, Hadjidekova S, Rukova B et al: Detection of genomic imbalances by array-based comparative genomic hybridization in bulgarian patients with autism spectrum disorders. *Biotechnol & Biotechnol Eq.* 2012;26(6):3389-93.
12. Avdjieva-Tzavella D, Todorov T, Todorova A et al: Analysis of the genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 in bulgarian patients with autism. *Genetic counseling.* 2012;23(4):505-11.
13. Авджиева Д, Хаджигекова С, Рукова Б et al: Генетична характеристика на пациенти от аутистичния спектър. *Педиатрия.* 2012;4:20-26.
14. Cappuccino G, Vitiello F, Casertano A et al: New insights in the interpretation of array-CGH: autism spectrum disorder and positive family history for intellectual disability predict the detection of pathogenic variants. *Ital J Pediatr.* 2016;42(1):39.
15. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S et al: Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;20(4):399-407.
16. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D et al: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet.* 1998;20(2):207-11.
17. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN et al: Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* 2004;36(9):949-51.
18. Erdogan F, Ullmann R, Chen W et al: Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome tiling

- path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. *Am J Med Genet A*. 2007;143(2):172-8.
19. Barber JC, Maloney VK, Huang S et al: 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(1):18-27.
 20. Veltman JA, de Vries BB: Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *J Mol Diagn*. 2006;8(5):534-7; discussion 37-9.
 21. Vianna GS, Medeiros PF, Alves AF et al: Array-CGH analysis in patients with intellectual disability and/or congenital malformations in Brazil. *Genet Mol Res*. 2016;15(1):
 22. Quail MA, Smith M, Coupland P et al: A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012;13(341).
 23. Rehml HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P et al: ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*. 2013;15(9):733-47.
 24. Grada A, Weinbrecht K: Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol*. 2013;133(8):e11.
 25. Renkema KY, Stokman MF, Giles RH et al: Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;
 26. Renkema KY, Stokman MF, Giles RH et al: Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(8):433-44.
 27. Bamshad MJ, Shendure JA, Valle D et al: The Centers for Mendelian Genomics: a new large-scale initiative to identify the genes underlying rare Mendelian conditions. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(7):1523-5.
 28. Shen P, Wang W, Krishnakumar S et al: High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6549-54.
 29. Lai-Cheong JE, McGrath JA: Next-generation diagnostics for inherited skin disorders. *J Invest Dermatol*. 2011;131(10):1971-3.
 30. Rauch A, Wiczorek D, Graf E et al: Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet*. 2012;380(9854):1674-82.
 31. Brett M, McPherson J, Zang ZJ et al: Massively parallel sequencing of patients with intellectual disability, congenital anomalies and/or autism spectrum disorders with a targeted gene panel. *PLoS One*. 2014;9(4):e93409.
 32. Cullinane AR, Vilboux T, O'Brien K et al: Homozygosity mapping and whole-exome sequencing to detect SLC45A2 and G6PC3 mutations in a single patient with oculocutaneous albinism and neutropenia. *J Invest Dermatol*. 2011;131(10):2017-25.
 33. Gogol-Doring A, Chen W: An overview of the analysis of next generation sequencing data. *Methods Mol Biol*. 2012;802(249-57).
 34. Li H, Handsaker B, Wysoker A et al: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
 35. Danecek P, Auton A, Abecasis G et al: The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156-8.
 36. McKenna A, Hanna M, Banks E et al: The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297-303.
 37. 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.
 38. Manary MJ, Singhaku SS, Flannery EL et al: Identification of pathogen genomic variants through an integrated pipeline. *BMC Bioinformatics*. 2014;15(63).
 39. Zhang X: Exome sequencing greatly expedites the progressive research of Mendelian diseases. *Front Med*. 2014;8(1):42-57.
 40. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L et al: Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature*. 2010;467(7311):52-8.
 41. Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL et al: Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet*. 2013;9(8):e1003709.
 42. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD et al: An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.
 43. Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K et al: A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2011;43(12):1232-6.
 44. Momozawa Y, Mni M, Nakamura K et al: Resequencing of positional candidates identifies low frequency IL23R coding variants protecting against inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2011;43(1):43-7.
 45. Sanna S, Li B, Mulas A et al: Fine mapping of five loci associated with low-density lipoprotein cholesterol detects variants that double the explained heritability. *PLoS Genet*. 2011;7(7):e1002198.
 46. Dorschner MO, Amendola LM, Turner EH et al: Actionable, pathogenic incidental findings in 1,000 participants' exomes. *Am J Hum Genet*. 2013;93(4):631-40.
 47. Christenhusz GM, Devriendt K, Dierckx K: To tell or not to tell? A systematic review of ethical reflections on incidental findings arising in genetics contexts. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(3):248-55.
 48. Kahrizi K, Hu CH, Garshabi M et al: Next generation sequencing in a family with autosomal recessive Kahrizi syndrome (OMIM 612713) reveals a homozygous frameshift mutation in SRD5A3. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(1):115-7.
 49. Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O et al: De novo loss-of-function mutations in SETD5, encoding a methyltransferase in a 3p25 microdeletion syndrome critical region, cause intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 2014;94(4):618-24.
 50. Lepri FR, Scavelli R, Digilio MC et al: Diagnosis of Noonan syndrome and related disorders using target next generation sequencing. *BMC Med Genet*. 2014;15(14).
 51. Lapunzina P, Lopez RO, Rodriguez-Laguna L et al: Impact of NGS in the medical sciences: Genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies. *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 Suppl):241-9.
 52. Zhang R, Chen X, Li P et al: Molecular characterization of a novel ring 6 chromosome using next generation sequencing. *Mol Cytogenet*. 2016;9(33).
 53. Zhu X, Li J, Ru T et al: Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next-generation sequencing. *Prenat Diagn*. 2016;36(4):321-7.