

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России

СУСПИЦЫН Евгений Николаевич

СОКОЛЕНКО Анна Петровна

**Научно-образовательный курс для студентов медицинских ВУЗов и
врачей**

**«ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НОВОГО
ПОКОЛЕНИЯ
В МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКЕ»**

**Работа выполнена в рамках реализации мероприятий 1.1-1.5
федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические
кадры инновационной России» на 2009-2013 годы**

Введение

Начиная с последнего десятилетия XX века, мы являемся свидетелями огромного технологического скачка в молекулярной биологии и генетике. В настоящее время появились методы, позволяющие одновременно анализировать целый спектр биомолекул. Современные технологии делают возможным детекцию повреждений ДНК практически любого масштаба – от крупных хромосомных аномалий до однонуклеотидных замен; кроме того, можно оценить влияние тех или иных мутаций на уровне РНК и белка. В практическом смысле это привело к чрезвычайному расширению возможностей молекулярной диагностики.

Одной из важнейших прикладных задач медицинской генетики является выявление генетического повреждения, лежащее в основе патогенеза той или иной болезни. В первую очередь к сфере интересов генетиков относятся хромосомные и генные (моногенные) заболевания. Основными видами хромосомных повреждений являются делеции, дупликации, инсерции и транслокации. Традиционно для детекции таких нарушений используются цитогенетические (кариотипирование) или молекулярно-цитогенетические (флуоресцентная гибридизация *in situ*, сравнительная геномная гибридизация) методы. К менее масштабным повреждениям (мутациям), затрагивающим ген или его часть, в первую очередь относятся точковые мутации. «Золотым стандартом» диагностики в этом случае является ПЦР с последующим ДНК-секвенированием. Генетические нарушения могут передаваться по наследству или возникать *de novo* - в последнем случае семейный анамнез по данному заболеванию не отягощен.

Если изменение нуклеотидной структуры приводит к относительно «мягким» последствиям для функции гена и встречается в популяции достаточно часто (>1%), его обычно классифицируют как полиморфный вариант. Чаще всего

влияние таких вариабельных участков на здоровье невелико, однако в некоторых случаях полиморфные участки могут увеличивать риск развития мультифакториальных заболеваний (ревматоидный артрит, сахарный диабет, гипертоническая болезнь и т.д.) или обуславливать индивидуальные особенности ответа на лекарственные препараты. К основным видам полиморфизмов относят SNP и CNV. SNP (Single Nucleotide Polymorphism), произносится как «снип» - англоязычная аббревиатура, обозначающая однонуклеотидный полиморфизм. В среднем, SNP встречаются с частотой 1:300 п.н. Геном человека содержит около 10 миллионов «снипов». Следует подчеркнуть, что обычно вклад SNP в развитие заболеваний крайне незначителен: в большинстве случаев «неблагоприятный» генотип повышает риск заболевания не более чем в 1,5-2 раза. CNV (Copy Number Variation) – это индивидуальные вариации (дупликации и делеции) крупных (не менее 1000 пар оснований) участков ДНК. Участки, вариабельные по копийности, занимают около 12% человеческой ДНК. В последние годы многие CNV связывают с повышенным риском развития некоторых заболеваний, в частности, болезни Крона, псориаза, шизофрении, аутизма и биполярных расстройств.

Вместе с тем, главным объектом интереса медицинских генетиков по-прежнему остаются редкие мутации, которые серьезно нарушают функции генов и являются причинами моногенных заболеваний.

Задачей настоящего курса является краткий обзор новых технологий, применяемых в медицинской генетике XXI века.

Успехи современной цитогенетики

Повреждения хромосом лежат в основе патогенеза многих наследственных заболеваний. Поскольку диагностические возможности рутинного кариотипирования ограничены крупными повреждениями, важнейшей задачей цитогенетики является повышение разрешающей способности хромосомного анализа. Для этого постоянно ищутся пути совершенствования существующих методов. FISH, флуоресцентная гибридизация *in situ* – техника, впервые возникшая в 1969 году, использует гибридизацию флуоресцентно меченых ДНК-проб на цитогенетическом препарате. Проведение такого анализа требует синтеза пробы (зонда), комплементарного интересующему нас участку хромосомы (Рис.1). ДНК проба (зонд) метится флуоресцентным красителем (b). Существуют две стратегии мечения: прямое (справа) и непрямое (слева). Для непрямого мечения пробы метят модифицированными нуклеотидами, содержащими гаптен. Меченая проба и ДНК-матрица подвергаются денатурации (c), после этого проба по принципу комплементарности присоединяется к соответствующему участку ДНК (d). Если проба была мечена непрямым способом, то необходим дополнительный шаг визуализации гаптена с помощью специальных ферментных или иммунологических систем. Непрямое мечение позволяет усилить исходный сигнал, сделав его более ярким по сравнению с фоном. Повышение разрешающей способности данного метода, с одной стороны, связано с улучшением эффективности мечения и качества зондов. С другой стороны, совершенствуется этап подготовки хромосомного препарата. Для сравнения, разрешение метафазной FISH – порядка 5 Мб, FISH на интерфазных ядрах – 50 Кб-2Мб, а использование волоконной FISH (fibre FISH) позволило довести разрешение до 5-500 Кб [1]. Грандиозный прогресс в области детекции хромосомных

аномалий небольшого масштаба достигнут благодаря появлению сравнительной геномной гибридизации (CGH), о которой будет сказано ниже.

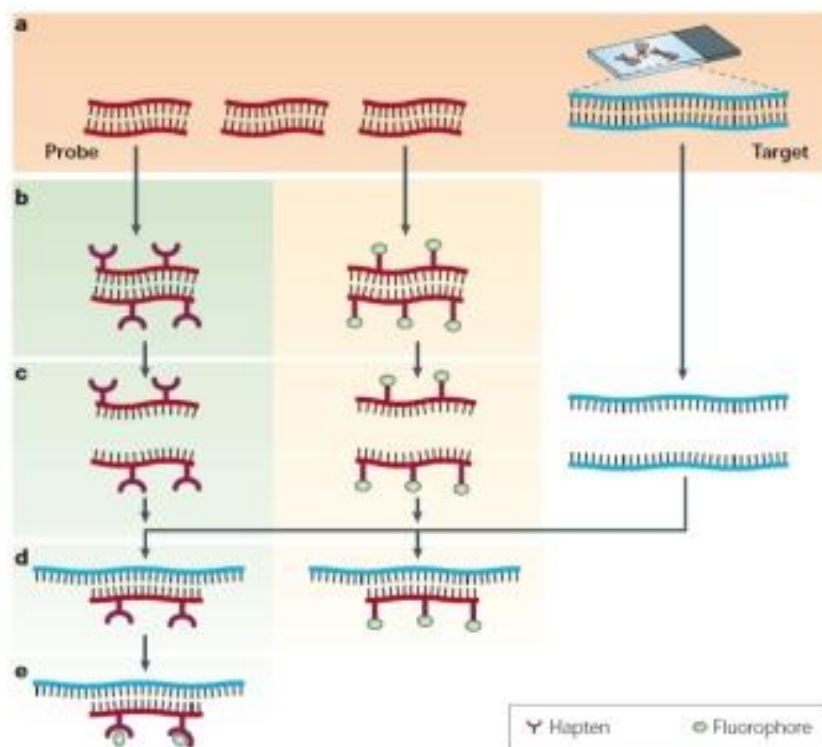


Рис. 1. Принцип флуоресцентной гибридизации *in situ* (объяснение в тексте) [1]

Технологии, основанные на использовании микрочипов (microarrays, «микроряды», «микроматрицы»)

Начиная с середины 90-х годов XX-века, появились технические возможности для размещения сотен и тысяч гибридизационных проб на небольшой площади (микрочип или слайд для микроскопии), что позволило проводить одновременный анализ большого количества молекул ДНК и РНК. Разрешающая способность микрочипов зависит от плотности, типа и длины специфических проб к соответствующим участкам ДНК или кДНК. Микрочипы успешно применяются для анализа экспрессионных «портретов» различных тканей (экспрессионные микрочипы, expression arrays), оценки

копийности участков генома (компаративная геномная гибридизация (arrayCGH), SNP-микрочипы), анализа профилей метилирования. Следует отметить, что в патоморфологии используется методика, называемая tissue microarray (ТМА). Под этим подразумевается размещение на одном микроскопном слайде большого количества «точек», взятых из разных участков какой-либо ткани, что позволяет экономить реагенты при проведении иммуногистохимических окрашиваний, а также дает возможность оценить морфологическую гетерогенность образца.

Сравнительная геномная гибридизация на микрочипе

Сравнительная (компаративная) геномная гибридизация на микрочипе (arrayCGH) является относительно новым молекулярно-цитогенетическим методом, позволяющим детектировать увеличение или уменьшение копийности хромосомных локусов в масштабе всего генома [2]. По сути, CGH является методом прецизионного кариотипирования. В качестве инструмента используется мембрана («микрочип»), на которой расположены тысячи локус-специфических ДНК-фрагментов. Анализируемая ДНК гибридизуется с подобным микрочипом; каждый сигнал соответствует определённому локусу генома, а изменение интенсивности сигнала свидетельствует об изменении копийности того или иного участка хромосом.

В то время как пределом чувствительности «классического» кариотипирования является приблизительно 5-10 миллионов пар оснований, arrayCGH способна достигать разрешения менее 100 тысяч нуклеотидов [3]. Этот метод крайне полезен для установления диагноза у детей с признаками дисморфогенеза, имеющих нормальный кариотип. В отличие от других методов, направленных на детекцию увеличения или уменьшения копийности тех или иных участков генома (например, FISH), arrayCGH не требует наличия предварительных знаний о конкретном регионе, позволяя

быстро оценить комплексную картину повреждений на всех хромосомах. К тому же, для CGH не требуется, чтобы клетки находились в состоянии деления. Вместе с тем, необходимо отметить, что arrayCGH неспособна детектировать сбалансированные хромосомные перестройки. Широкое применение данной технологии ограничивается высокой стоимостью микрочипов. Кроме того, наличие в человеческом геноме полиморфных участков с вариабельной копийностью (CNV, copy number variation), медицинская значимость которых часто неизвестна, влечет за собой сложности при интерпретации результатов. В молекулярной онкологии использование компаративной геномной гибридизации позволило выявить опухолеспецифические повреждения (делеции, дупликации, амплификации). Опухолевая ДНК метится одним флуоресцентным красителем (Cy5), нормальная ДНК – другим (Cy3). Меченая ДНК смешивается в равной пропорции и гибридизуется с пробами, нанесенными на микрочип. Соотношение интенсивности флуоресцентного сигнала опухолевой и нормальной ДНК дает информацию о копийности ДНК опухоли: зеленый цвет свидетельствует о делеции, красный цвет – об увеличении копийности (амплификации); желтый цвет говорит о том, что копийность участка не изменена (Рис.2).

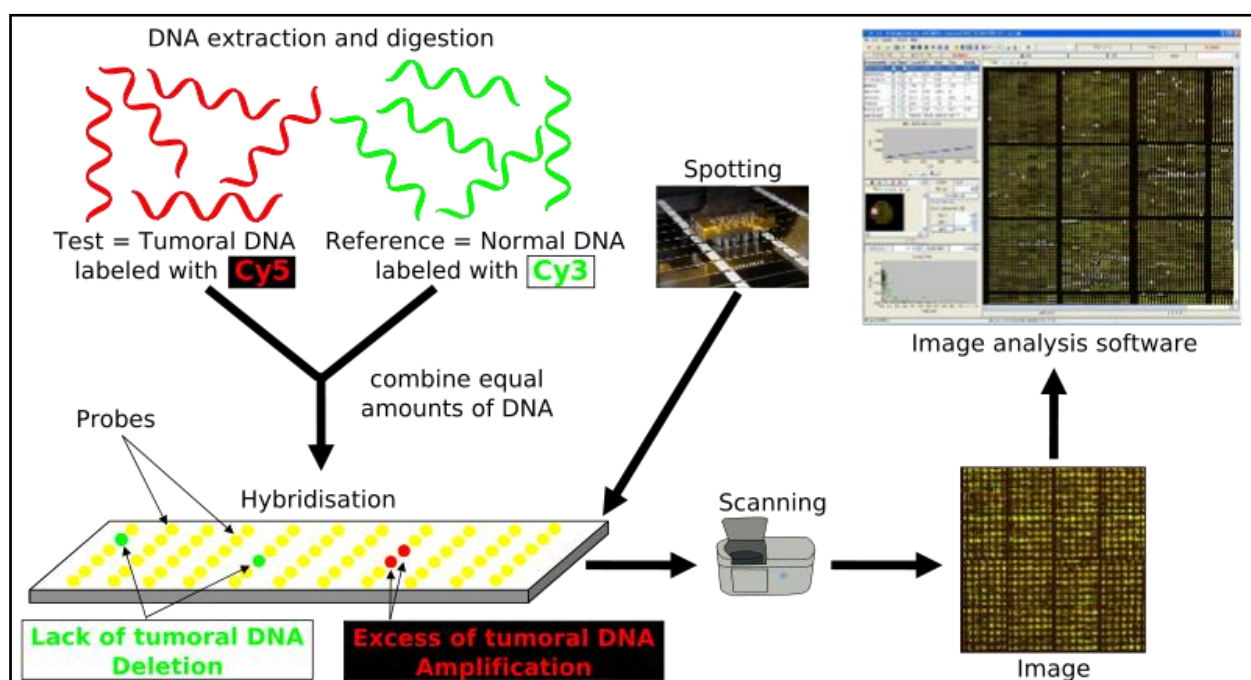


Рис. 2. Использование компаративной геномной гибридизации на микрочипе (arrayCGH) для детекции хромосомных повреждений, специфичных для опухоли. [5]. Объяснение – в тексте.

В медицинской генетике наиболее перспективной областью применения arrayCGH является исследование пациентов с умственной отсталостью и различными врожденными пороками развития. В частности, показано, что arrayCGH позволяет выявить причину нарушений в 10-20% подобных случаев, тогда как другие методы дают результат лишь в 3-5% [4].

SNP-array

Микрочипы, позволяющие одновременно проанализировать сотни тысяч SNP, нашли важное применение в различных областях медицинской генетики – молекулярной эпидемиологии, онкогенетике, фармакогенетике и т.д. В настоящее время количество нуклеотидных позиций, по которым можно одномоментно проводить генотипирование, достигает миллиона. Исторически подобные платформы использовались именно для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, что способствовало быстрому прогрессу т.н. полногеномного поиска ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Studies). В рамках этого подхода проводится поиск связи огромного числа полиморфных вариантов с риском развития заболеваний. В дальнейшем SNP-микрочипы (Рис.3) стали применяться для детекции изменений копийности; при этом разрешение метода было более высоким по сравнению с arrayCGH.

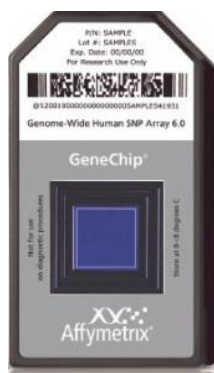


Рис. 3. Внешний вид микрочипа Affymetrix® SNP Array 6.0. Данный чип содержит пробы для детекции 906600 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и более 946000 проб для детекции вариаций копийности (CNV).

Еще одна из точек приложения нуклеотидных микрочипов – анализ потерь гетерозиготности (LOH, Loss Of Heterozygosity) в опухолевой ткани. Данный феномен обычно характерен для областей генома, содержащих гены-супрессоры опухолевого роста («антионкогены»).

Экспрессионные профили (expression arrays)

В конце 1990-х годов появилась техническая возможность создания «экспрессионных портретов» различных тканей и клеток. Известно, что всех клетки организма содержат одинаковый набор генов, однако для разных тканей и органов характерны различные паттерны экспрессии. Возможен анализ экспрессионных профилей на уровне протеинов (protein microarrays), однако наибольшее распространение получили технологии, основанные на изучении мРНК. В частности, экспрессионные микрочипы позволили классифицировать рак молочной железы на несколько основных молекулярных подтипов (базальный, люминальный, HER2-позитивный и т.д.), различающихся по клиническим и биологическим характеристикам (Рис.4.). Коммерческий микрочип, содержащий гибридационные пробы к 70 генам (MammaPrint компании Agendia) позволяет оценить риск метастазирования инвазивных карцином молочной железы.

Экспрессионные профили дают уникальную возможность оценить комплексную картину экспрессии генов в различных тканях и клетках, а также проследить изменение этой экспрессии под действием тех или иных факторов (н., после лечения). Необходимо отметить, что высокая стоимость экспрессионных микрочипов, а также недостаточный уровень

воспроизводимости результатов пока не позволяют данному методу стать рутинным инструментом молекулярной диагностики.

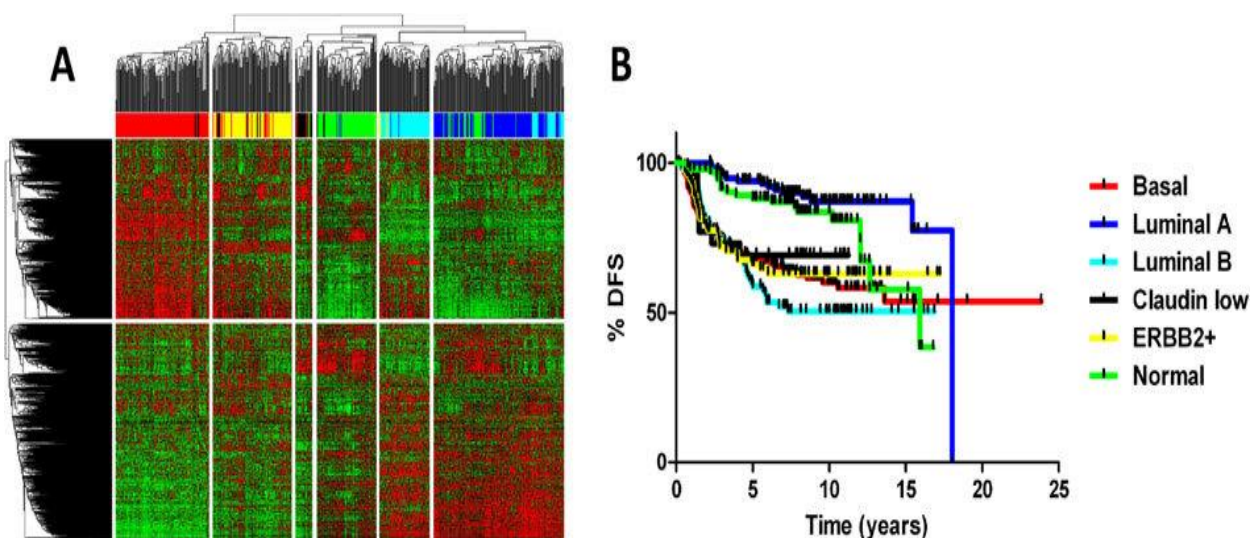


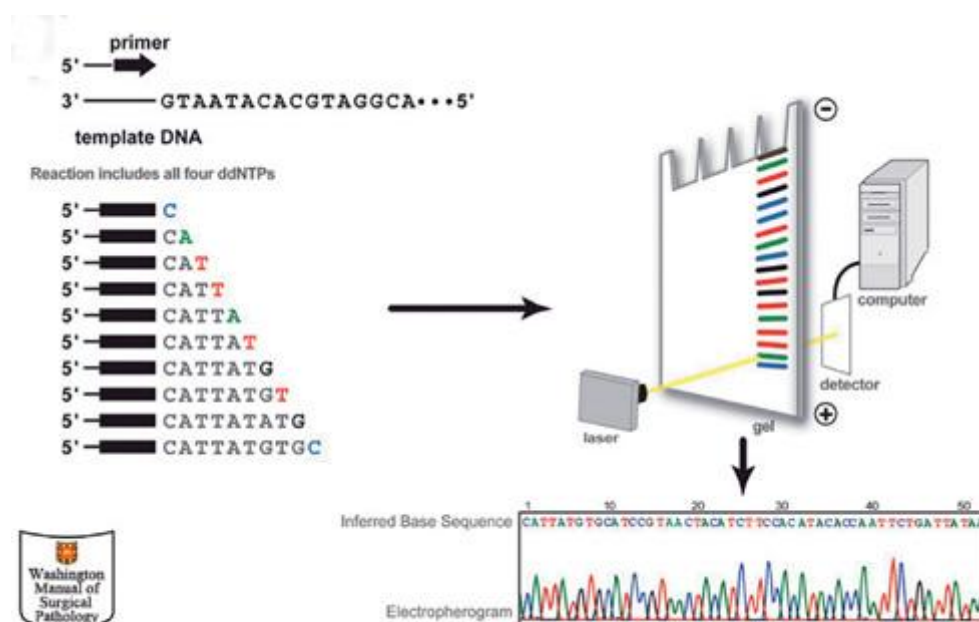
Рис.4. А. 6 различных подтипов рака молочной железы, различающихся экспрессионными «портретами». В. Различия в прогнозе у пациентов с разными молекулярными подтипами опухолей [6].

Секвенирование ДНК

Вплоть до настоящего времени «золотым стандартом» ДНК-диагностики остается традиционное секвенирование. Принцип этого метода был разработан Ф. Сэнгером в конце 1970-х годов и подразумевает использование модифицированных нуклеотидов – дидезоксинуклеотидтрифосфатов (ddNTP) или терминаторов. Наиболее распространенным методом анализа нуклеотидной последовательности является секвенирование с использованием капиллярных генетических анализаторов (Рис.5). Как правило, сначала производится ПЦР-амплификация фрагмента ДНК, содержащего интересующую последовательность. К полученному продукту добавляют прямой или обратный праймер и ДНК-полимеразу. В ходе реакции ДНК-полимераза встраивает в растущую цепь ДНК терминирующий нуклеотид, который прекращает синтез после соответствующей «буквы». В результате образуется большое число фрагментов ДНК, отличающихся по

длине на один нуклеотид. Терминаторы помечены четырьмя различными флуоресцентными красителями. Фрагменты ДНК движутся в тонком капилляре, заполненном полиакриламидным гелем, и разделяются в соответствии с их длиной. Флуоресцентный сигнал от каждого терминирующего нуклеотида детектируется с помощью лазера и преобразуется в хроматограмму – графическое изображение нуклеотидной последовательности, где каждый нуклеотид представлен в виде пика соответствующего цвета (красный, синий, зеленый, черный).

К недостаткам капиллярного секвенирования можно отнести высокую стоимость реагентов, а также невысокую производительность.



Copyright © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

Рис.5. Принцип капиллярного секвенирования по Сэнгеру (объяснение в тексте)

Секвенирование нового поколения

Важнейшим технологическим прорывом в молекулярной медицине стало появление так называемого секвенирования нового поколения (NGS, Next Generation Sequencing; massive parallel sequencing). Данный термин

объединяет группу подходов, предложенных различными фирмами (Roche, Illumina, Life Technologies), и основанных на одновременном параллельном секвенировании миллионов коротких фрагментов ДНК с последующей «сборкой» генома. Сравнение результатов анализа с референсной последовательностью позволяет выявить практически любые виды мутаций в масштабах всего генома или отдельных его частей. Полногеномное секвенирование (WGS, Whole Genome Sequencing) дает возможность одномоментного анализа всех известных на сегодняшний день генов. В ходе экзомного секвенирования (exome capture sequencing) производится «захват» (capture) и обогащение исключительно кодирующих последовательностей генома (Рис.6).

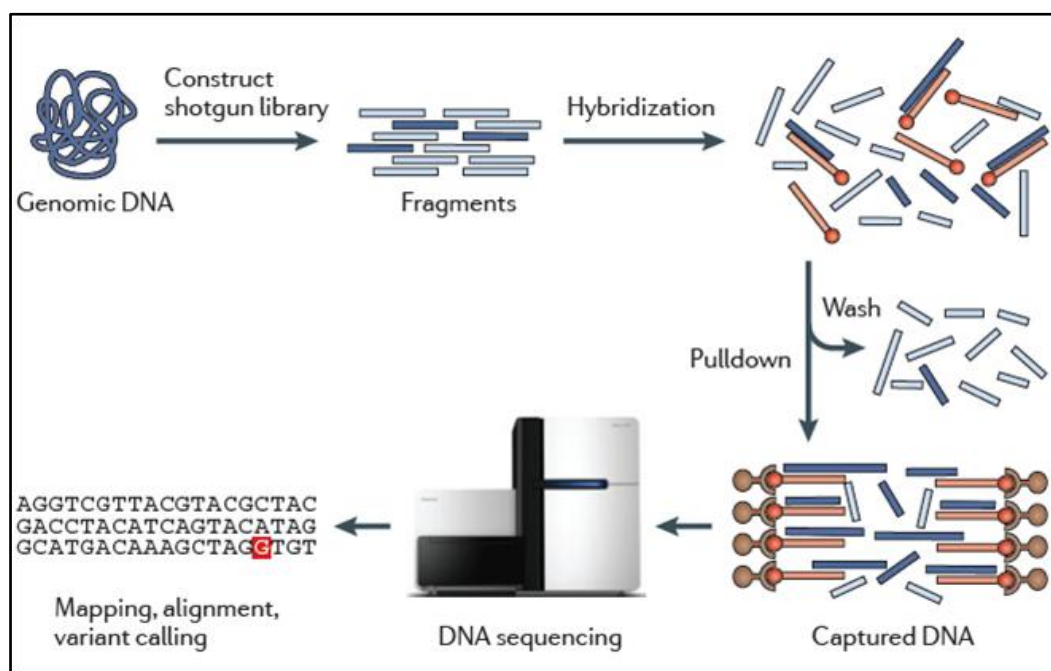
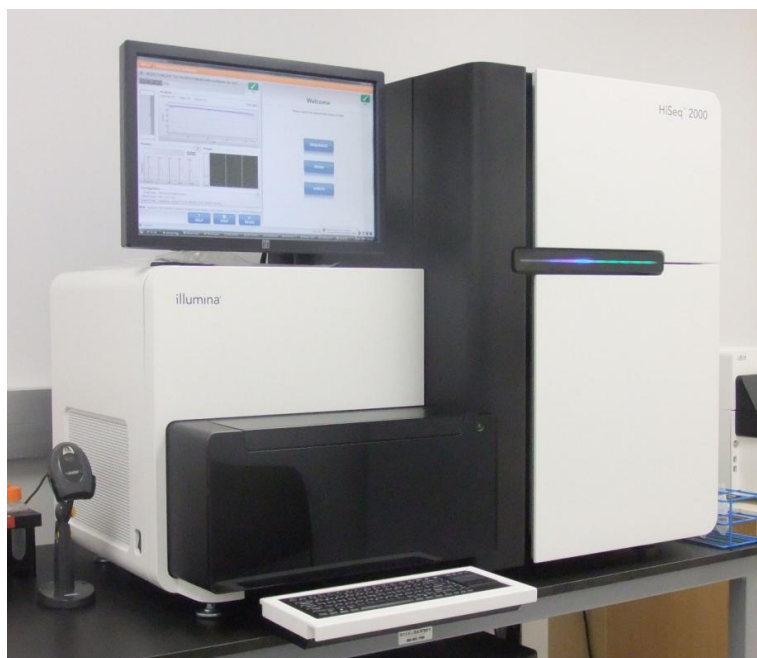


Рис. 6. Принцип экзомного секвенирования [7]. Геномная ДНК фрагментируется; далее производится гибридизация с экзонспецифичными пробами, несвязавшиеся фрагменты отмываются. «Захваченные» кодирующие последовательности подвергаются секвенированию.

Несмотря на свою недолгую историю, секвенирование нового поколения хорошо зарекомендовало себя в качестве мощного инструмента медицинской

генетики, позволив обнаружить гены, причастные к развитию многих редких заболеваний [7-10]. В частности, за последние несколько лет при помощи массивного параллельного секвенирования были открыты генетические причины ряда синдромов (Кабуки, Миллера, Фаулера, Сенсенбреннера и т.д.).

Диагностическое применение полногеномного секвенирования пока ограничивается высокой стоимостью анализа, необходимостью приобретения дорогостоящего оборудования и сложностью биоинформатической обработки огромного массива полученных данных.



*Рис.7. Прибор для полногеномного секвенирования HiSeq2000
фирмы Illumina*

Значительно лучшие перспективы внедрения имеет экзомное (полноэкзомное) секвенирование, подразумевающее анализ лишь небольшой части (около 1%) генома. Известно, что подавляющее большинство генетических заболеваний связано с мутациями в участках ДНК, кодирующих синтез белков, поэтому анализ экзона, по-видимому, достаточен для детекции подавляющего большинства патогенных мутаций [10]. Крайне важно, что использование экзомного секвенирования позволяет

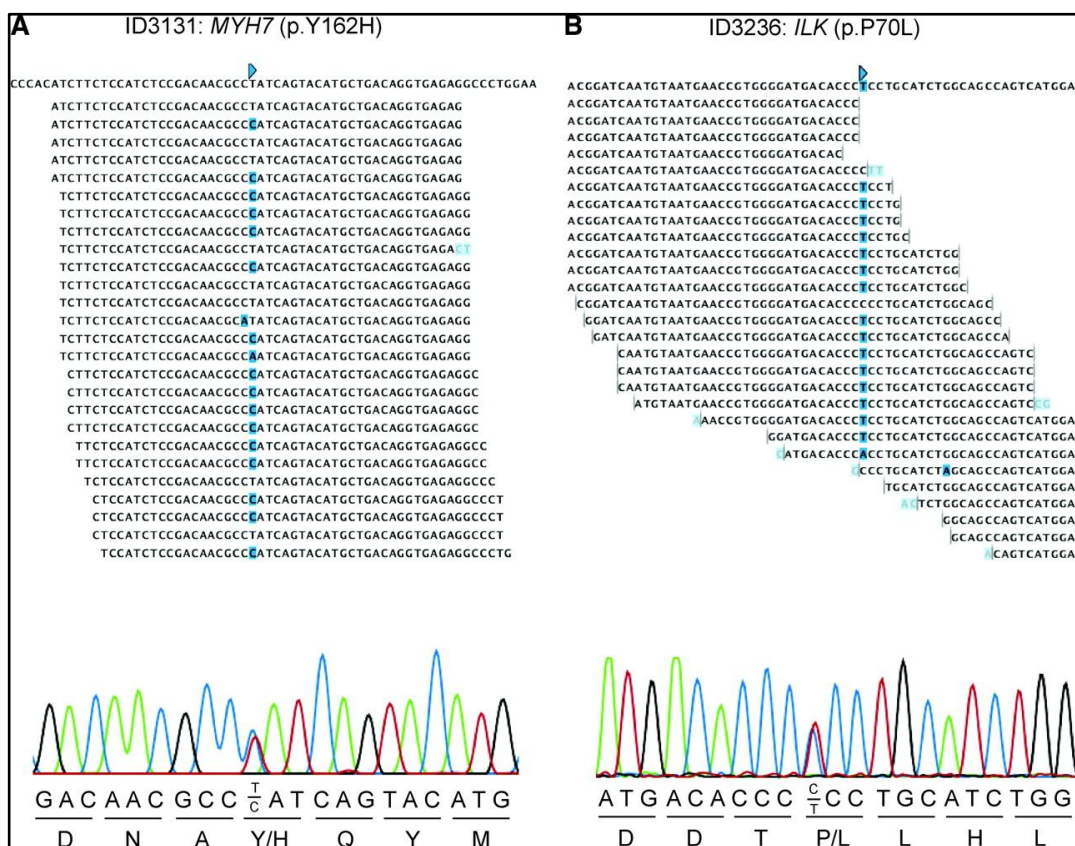


Рис.8. Применение секвенирования нового поколения (в данном случае - таргетный анализ 47 генов) для диагностики кардиомиопатий. Внизу – верификация обнаруженных мутаций секвенированием по Сэнгеру. [12]

Возможно создание диагностических панелей, позволяющих одномоментно анализировать все известные гены, причастные к развитию серьезных генетических заболеваний, а также выявить гетерозиготное носительство рецессивных мутаций у лиц, вступающих в брак. Стоит отметить, что на современном этапе развития технологий полногеномного анализа, полученные результаты должны верифицироваться с помощью других методов (секвенирование по Сэнгеру, количественная ПЦР, FISH, arrayCGH и т.д.).

Вероятно, накопление данных, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования, приведет к тому, что многие заболевания, которые сейчас относят к категории мультифакториальных (аутизм, некоторые психиатрические и неврологические болезни), в недалеком будущем перейдут в группу состояний, вызванных редкими мутациями [11].

Развитие технологии ПЦР

История применения ПЦР насчитывает уже более 25 лет, и за это время метод доказал свою незаменимость в молекулярно-генетических исследованиях. Вначале технология подразумевала детекцию продукта путем гель-электрофореза; затем появилась так называемая ПЦР в реальном времени (real time PCR), основанная на применении флуоресцентных красителей или флуоресцентно-меченных проб. Последний подход обладает рядом преимуществ перед «классической» ПЦР. Во-первых, возможен не только качественный, но и количественный анализ - например, детекция амплификаций или измерение экспрессии генов. Во-вторых, за счет того, что

оценка результатов основана на повышении уровня флуоресценции и проводится на компьютере, время диагностики существенно сокращается, фактически сводясь к времени осуществления самой реакции (2-2,5 часа). В-третьих, анализ проводится в закрытых пробирках, что позволяет минимизировать опасность получения ложноположительных результатов вследствие контаминации (загрязнения) продуктами предыдущих реакций.

Появление технологий real time вдохнуло новую жизнь в методику аллель-специфической ПЦР. Этот подход подразумевает использование в реакции трех праймеров, один из которых распознает мутантный аллель, другой – специфичен для нормальной последовательности, а третий - является общим. Как правило, аллель-специфические праймеры отличаются друг от друга лишь по одной позиции на 5'-конце. Подобные подходы существовали уже давно, однако «традиционная» ПЦР не давала возможность надежной детекции мутаций, поскольку результаты расценивались по окончании реакции, когда изначальные различия в кинетике амплификации аллелей уже стираются. Техническая простота и невысокая стоимость аллель-специфической ПЦР в реальном времени определяют её широкое использование для детекции мутаций (Рис.9).

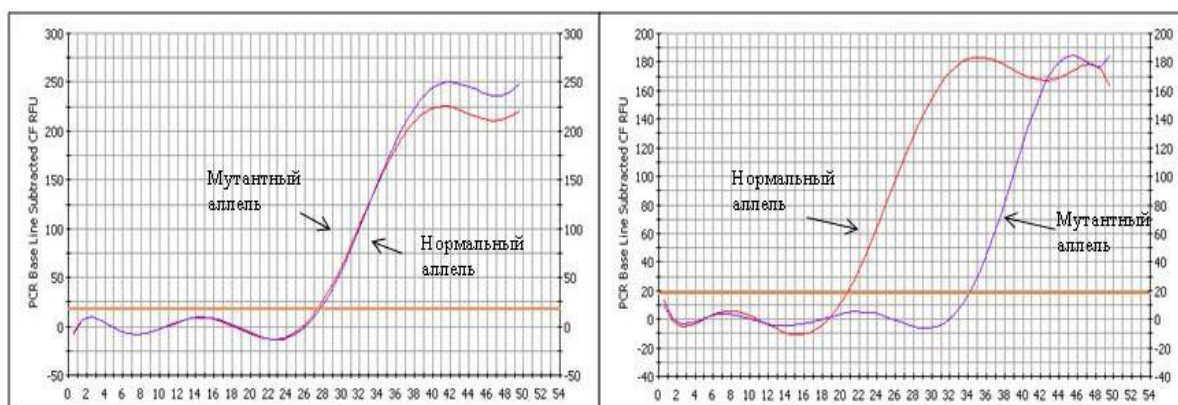


Рис.9. Пример использования аллель-специфической ПЦР-РВ для диагностики мутаций. Слева – гетерозигота (соотношение нормального и мутантного аллеля 1:1); справа – нормальная гомозигота (отмечается поздняя неспецифическая амплификация мутантного аллеля)

Еще одним технологическим достижением последнего десятилетия стало появление высокоразрешающего анализа плавления продуктов ПЦР (High Resolution melting, HRM). В настоящее время возможность осуществления HRM присутствует в некоторых приборах для проведения ПЦР-РВ; кроме того, существуют приборы, единственной функцией которых является высокоточное плавление (Light Scanner фирмы Idaho Technologies). На первом этапе анализа проводится ПЦР-амплификация последовательности ДНК, в которой планируется поиск мутаций. Наиболее оптимальны для анализа фрагменты размером 100-250 п.н. Далее проводится высокоточное нагревание ПЦР-продукта, в ходе которого молекулы ДНК постепенно переходят из двухцепочечного состояния в одноцепочечное – в результате уровень флуоресценции при высвобождении красителя с определенного момента (точка плавления, T_m) резко падает. Температура плавления зависит от нуклеотидного состава, поэтому путем сравнения кривых плавления изучаемых образцов с таковыми в образцах, имеющих известную последовательность, можно выявить кандидаты на дальнейшее секвенирование (Рис.10). Учитывая невысокую стоимость анализа и трудозатраты, высокоточное плавление фрагментов ДНК является крайне перспективным методом скрининга мутаций, превосходя большинство существующих методов (анализ конформации одонитевых фрагментов, гетеродуплексный анализ, градиентный гель-электрофорез и т.д.).

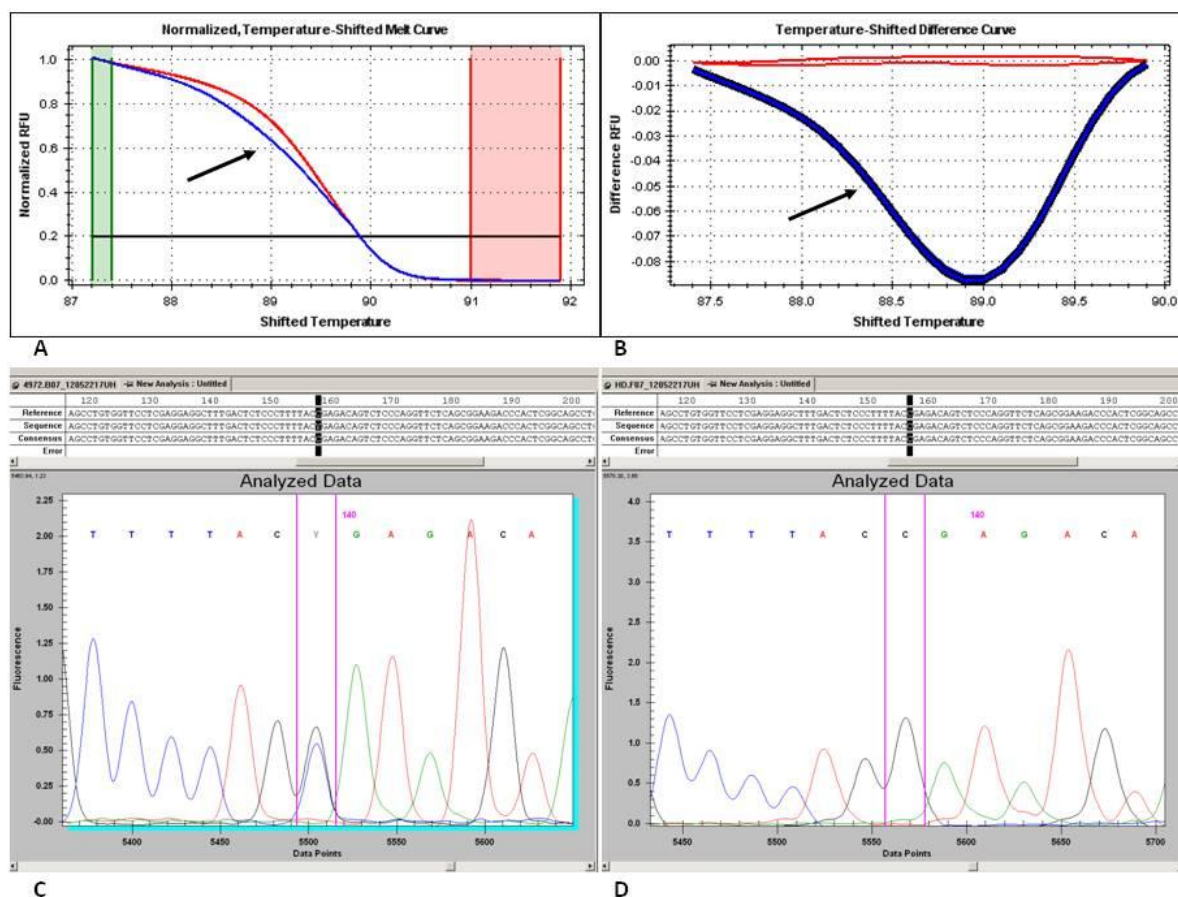


Рис.10. А, В. Высокоразрешающее плавление продуктов ПЦР. Стрелкой показана кривая плавления образца с мутацией; С. Мутация TSC1 с.1525C>T; D. Нормальная нуклеотидная последовательность TSC1[13].

Для детекции небольших делеций и дупликаций, в том числе, повреждений, затрагивающих один или несколько экзонов того или иного гена, которые не обнаруживаются секвенированием, хорошо зарекомендовал себя метод мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (MLPA, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), разработанный голландской компанией MRC Holland [14]. Эта техника получила распространение в диагностике микроделеционных синдромов (синдром 22q11, синдром Вильямса и т.д.) и во многих ситуациях является более доступной альтернативой FISH. На первом этапе анализа (Рис.11) производится денатурация ДНК и её гибридизация со специфичными пробами (зондами).

Зонды расположены очень близко друг от друга, к одному из их концов присоединена последовательность для прикрепления универсального праймера. На следующем этапе происходит специфичное лигирование проб с помощью фермента лигазы. Далее производится мультиплексная ПЦР-амплификация с использованием универсальных праймеров; при этом только многократно увеличивается только количество лигированных фрагментов. Продукты амплификации, имеющие разные размеры, сепарируются посредством капиллярного электрофореза. Наличие пика и его высота на электрофореграмме отражает состояние данного генетического локуса (норма, делеция или дупликация).

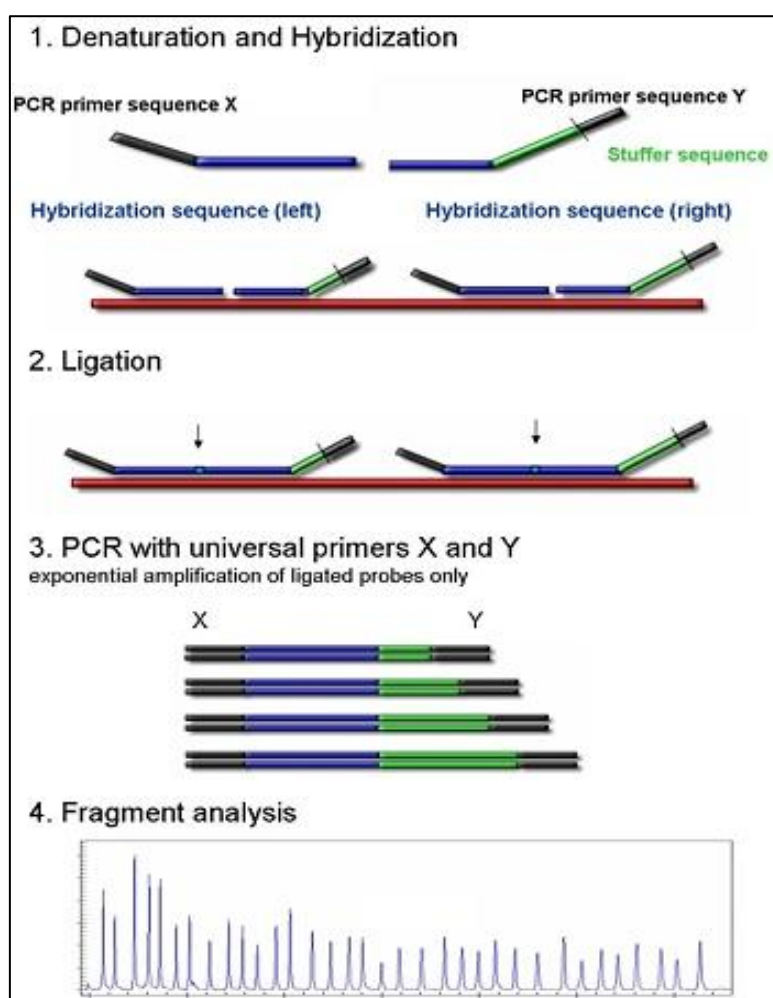
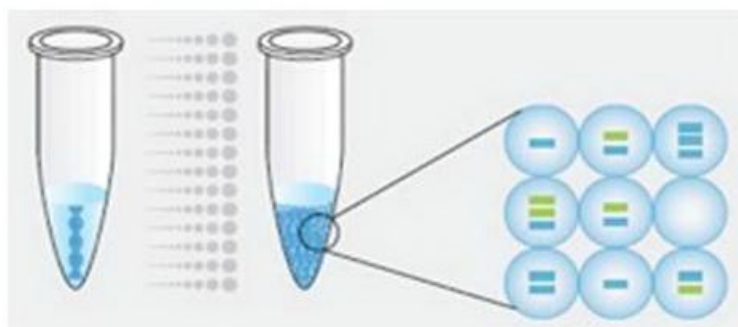
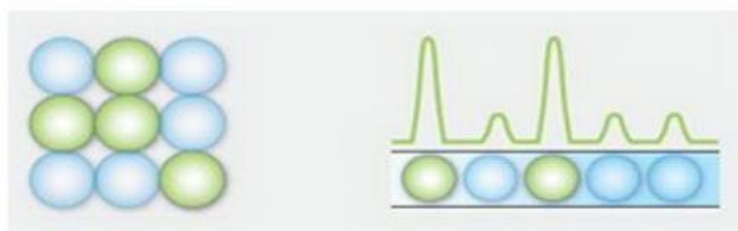


Рис.11. Принцип метода MLPA(объяснение в тексте). www.mlpa.com

Интересным развитием ПЦР в реальном времени стала так называемая «цифровая» ПЦР (Digital PCR)[15]. Если традиционная ПЦР представляет из себя одну реакцию, то при цифровой ПЦР образец дробится на тысячи частей; таким образом, одновременно происходит огромное количество индивидуальных реакций (Рис.12).



Образец дробится на 20000 капель, в которых равномерно распределена ДНК, содержащая искомую последовательность (обозначено зеленым) и остальную ДНК (обозначено синим)



После амплификации в каждой капле независимо измеряется флуоресцентный сигнал; после компьютерной обработки делается вывод о концентрации искомой последовательности (число копий/мл)

[адаптировано с сайта www.bio-rad.com]

Рис.12.Эмульсионная ПЦР(одна из разновидностей «цифровой» ПЦР).

Это позволяет аккуратно проводить количественную оценку экспрессии и копийности различных генов. Особенно востребован этот подход в случаях, если подразумевается работа с малым количеством искомой ДНК матрицы, например, при детекции микрохимеризма, поиске редких (содержащихся в менее чем 1% клеток) соматических мутаций в опухолях или анализе опухолеспецифичных транслокаций при лейкозах.

Список использованной литературы

1. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 2005, Vol. 10, p.782-792.
2. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Education*, 2008, 1(1).
3. Ren H, Francis W, Boys A, Chueh AC, Wong N, La P, Wong LH, Ryan J, Slater HR, Choo KH. BAC-based PCR fragment microarray: high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints. *Hum Mutat*, 2005, Vol.25, p.476-482.
4. Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2007, Vol.145, p.87-98.
5. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Array-CGH_protocol.svg]
6. Hallett RM, Dvorkin-Gheva A, Bane A, Hassell JA. A gene signature for predicting outcome in patients with basal-like breast cancer. *Sci Rep*, 2012, Vol.2, p.227.
7. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, 2011, Vol.12, p.745-755.
8. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol*, 2011, Vol.12, p.228.
9. Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol*, 2012, Vol.71, p.5-14.
10. Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, Huff CD, Shannon PT, Jabs EW, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad MJ. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet*, 2010, Vol.42. p.30-35.
11. Singleton AB. Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol*, 2011, Vol.10, p.942-946.

12. Meder B, Haas J, Keller A, Heid C, Just S, Borries A, Boisguerin V, Scharfenberger-Schmeer M, Stähler P, Beier M, Weichenhan D, Strom TM, Pfeufer A, Korn B, Katus HA, Rottbauer W. Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, Vol.4, p.110-122.
13. Янус Г.А., Суспицын Е.Н, Дорофеева М.Ю., Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика туберозного склероза. *Педиатр*, 2013, 1:3-8.
14. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*, 2012, Vol.13, p.3245-3276.
15. Zhu Y, Fang Q. Analytical detection techniques for droplet microfluidics--a review. *Anal Chim Acta*, 2013, Vol. 787, p.24-35.