

17.Novembre

Biomarcatori individuali per una medicina personalizzata molecolare

*La cosa più difficile nella vita? Essere sé stessi.
E avere carattere a sufficienza per restarlo.*

Georges Brassens

Non esiste una soluzione valida per tutti: questo può valere anche per la terapia medica, compresa la terapia farmacologica.

L'efficacia degli *antidepressivi* è limitata a meno del **40% dei pazienti**. Simili bassi tassi di efficacia si applicano ai farmaci per il trattamento dell'asma e del diabete. Anche con i *farmaci antitumorali*, il tasso di controllo del tumore potrebbe non essere superiore al **75% circa**, contribuendo all'inefficacia combinata con la *tossicità nel 25% dei pazienti*.

Questi fatti hanno aperto la strada alla **medicina molecolare personalizzata** che cerca di generare **marcatori predittivi individuali** per l'efficacia e la tossicità di un trattamento.

La base molecolare della previsione ad alta precisione desiderata sono **le moderne tecnologie "omex"** che forniscono metodi bioanalitici ad alto rendimento. Questi includono *genomica ed epigenomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica, microbiomica, imaging e analisi funzionali*. Nella maggior parte dei casi, la produzione di big data richiede anche una complessa **analisi biomatematica**. Il controllo dei risultati dei biomarcatori da parte del medico convenzionale non è più sufficiente: il medico deve collaborare con il biomatematico per ottenere la previsione desiderata sulla base dei big data individuali tipicamente prodotti dalle tecnologie omex.

L'obiettivo di sequenziare l'intero genoma umano per 1.000 dollari è quasi a portata di mano. Tuttavia, è improbabile che i costi totali, compresi il sequenziamento del DNA, la gestione dei dati e l'analisi per ottenere una chiara interpretazione dei dati, vengano ridotti in modo significativo in tempi brevi per rendere fattibili studi su scala di popolazione e usi clinici quotidiani. In alternativa, l'arricchimento mirato di gruppi specifici di malattie e geni focalizzati sul percorso biologico e la cattura fino a un intero esoma umano (~ 1% del genoma) consentendo un'indagine imparziale delle regioni complete codificanti le proteine nel genoma sono ora disponibili routine.

La **cattura genica mirata seguita dal sequenziamento con sequenziamento di prossima generazione (NGS)** massivamente parallelo presenta i vantaggi di significativo risparmio sui costi, maggiore precisione di sequenziamento grazie alla copertura più profonda ottenibile, tempi di consegna significativamente più brevi e maggiore set di dati fattibile per un risultato di analisi bioinformatica che sia funzionalmente interpretabile.

La cattura genica combinata con l'NGS consente di esaminare un numero molto maggiore di campioni rispetto a quanto sia attualmente possibile con il sequenziamento dell'intero genoma. Un simile approccio promette di portare un cambiamento di paradigma nella ricerca biomedica sui disturbi mendeliani e sulle loro diagnosi cliniche, consentendo in definitiva una medicina personalizzata basata sul proprio profilo genetico.

Il *Department of Otolaryngology, Emory University School of Medicine di Atlanta*, nel report

Lin X et .

Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities.

Hear Res. 2012 Jun;288(1-2):67-76.

Descrive le principali metodologie attualmente utilizzate per la cattura genica e il rilevamento delle variazioni genetiche mediante NGS mettendo in evidenza le applicazioni di questa tecnologia negli studi sui disturbi genetici. Inoltre discute le questioni relative alle applicazioni di questa potente tecnologia nello screening genetico e nella scoperta di geni implicati nella perdita dell'udito sindromica e non sindromica.

La percezione del suono nei vertebrati terrestri si basa su una struttura nell'orecchio interno costituita da utricolo, sacculo e lagena. Nei mammiferi, la lagena si è sviluppata nella coclea dove la meccanotrasduzione nelle cellule ciliate porta all'afflusso di ioni attraverso canali ionici regolati. Per mantenere una corretta concentrazione di Ca²⁺ molti sistemi cellulari utilizzano una varietà di proteine funzionali; i sistemi neurosensoriali utilizzano sensori di calcio come ***l'ippocalcina, la visinina o la recuperoina.***

Nelle cellule ciliate cocleari è stato suggerito che la ***proteina otoferlina da 230 kDa svolga questo ruolo.*** Sebbene diverse osservazioni supportino questa ipotesi, ulteriori dati sostengono un profilo funzionale più ampio dell'otoferlina.

Magdalena Zak della *Divisione di genetica molecolare, Istituto di genetica umana, Università di Tubinga*, ha dimostrato, il ruolo centrale della **otoferlina** e dei partner molecolari con cui interagisce rilevando l'esistenza di un complesso proteico come unità funzionale ("interattoma") nella coclea e in altri tessuti.

Zak M et al

The otoferlin interactome in neurosensory hair cells: significance for synaptic vesicle release and trans-Golgi network (Review).

Int J Mol Med. 2011 Sep;28(3):311-4.

La tecnologia della cattura genica e del relativo sequenziamento Potrebbero supportare l'indicazione per impianti cocleari pediatrici molto precoci. Nei casi di neuropatia uditiva pediatrica, il gene OTOF può essere determinante perché OTOF codifica per la proteina otoferlina delle cellule ciliate. Inoltre l'analisi del gene OTOF consente la separazione della neuropatia uditiva presinaptica da quella postsinaptica. L'assenza di espressione di OTOF suggerisce un problema presinaptico e quindi il funzionamento delle fibre nervose uditive che consentono un desiderato impianto di CI precoce durante i primi mesi di vita dei bambini

L' impianto cocleare pediatrico (PCI) richiede una valutazione e una consulenza complessa del caso, un intervento chirurgico e un'abilitazione. I risultati variano e molti casi hanno risultati non ottimali a causa di un ampio spettro di influenze avverse.

Il team del School of Health and Rehabilitation Sciences, University of Queensland, St Lucia, Brisbane, (Australia) .
Nel report

Black J et al .

**Prognostic indicators in paediatric cochlear implant surgery:
a systematic literature review.**

Cochlear Implants Int. 2011 May;12(2):67-93.

Ha effettuato una revisione sistematica della letteratura per identificare documenti di ricerca che indicano un risultato dimostrato o un fattore prognostico nell'IC pediatrico, con l'obiettivo generale di sviluppare un indice prognostico per uso clinico.

Sono stati valutati sei principali ambiti della letteratura:

medico/chirurgico; audiologia; psicologia; discorso/linguaggio; formazione scolastica; e famiglia. Le strategie di ricerca sono state applicate a database e riviste appropriati. È stato utilizzato un criterio di inclusione rigoroso. È stato utilizzato uno strumento di valutazione critica per valutare le citazioni finali idonee. la revisione ha identificato 92 citazioni, di cui 38 ammissibili. L'eterogeneità nel disegno dello studio ha impedito una meta-analisi quantitativa dei dati.

Sebbene esista un'ampia gamma di fattori che influiscono sugli esiti della PCI, gli studi caso-controllo ben strutturati sono limitati nel numero e nella portata e relativamente pochi hanno dimostrato fattori prognostici significativi. Sono stati identificati solo quattro fattori che influenzano costantemente gli esiti del PCI: età all'impianto, Connexin 26, malformazioni dell'orecchio interno e meningite.

Le mutazioni nei geni Gjb2 e Gjb6, che codificano rispettivamente per le proteine connexina26 (Cx26) e Cx30, sono collegate a circa la metà di tutti i casi di sordità prelinguale autosomica non sindromica umana. I meccanismi molecolari dei disturbi uditivi, tuttavia, non sono chiari. La maggior parte delle giunzioni del gap cocleare (GJ) sono co-assemblate da Cx26 e Cx30 e la cancellazione di una di esse causa la sordità.

Il team del **Department of Ear Nose & Throat, Third Hospital and Bethune International Peace Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang (China.)** ha dimostrato che l'udito normale è possibile in assenza del gene Cx30 quando Cx26 è sovraespresso.

Per testare ulteriormente i requisiti funzionali unici per vari tipi di connessine nell'udito, abbiamo studiato se l'udito nei topi null Cx26 condizionali (cCx26) potesse essere salvato sovraesprimendo geneticamente Cx30. Sono state utilizzate più linee di controllo e modelli murini sperimentali. Le misurazioni della risposta uditiva del tronco cerebrale (ABR) hanno mostrato un udito normale nei topi con delezione del gene mirato quando il Cx26 o Cx30 cancellato era espresso transgenicamente dal cromosoma artificiale batterico integrato (BAC), dimostrando l'efficacia dell'approccio di salvataggio del BAC. Al contrario, è stata riscontrata una grave perdita dell'udito nei topi null cCx26 in cui Cx30 era sovraespresso. Le osservazioni morfologiche erano coerenti con i dati ABR. Le coclee di topi null cCx26 con e senza la sovraespressione transgenica di Cx30 hanno mostrato entrambe la caratteristica immatura tipica dello sviluppo cocleare postnatale: il tunnel chiuso di Corti.

I dati di immunoetichettatura e la quantificazione Western blot hanno indicato che l'espressione della proteina Cx26 ha preceduto quella di Cx30 durante il primo periodo postnatale nella coclea. L'espressione nulla di Cx26 può quindi risultare in un periodo transitorio in cui è possibile l'eliminazione totale dei GJ nelle regioni funzionalmente importanti della coclea in via di sviluppo. Concludiamo che Cx26 svolge un ruolo essenziale nello sviluppo dell'epitelio sensoriale uditivo e che le sue funzioni di sviluppo uniche richieste per l'udito normale non sono sostituibili da Cx30.

Qu Y et al

Early developmental expression of connexin26 in the cochlea contributes to its dominate functional role in the cochlear gap junctions.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 6;417(1):245-50.

Le giunzioni del gap cocleare svolgono un ruolo nel divieto di una perdita dell'udito neurosensoriale che induce un'intossicazione da potassio di parti dell'orecchio interno.

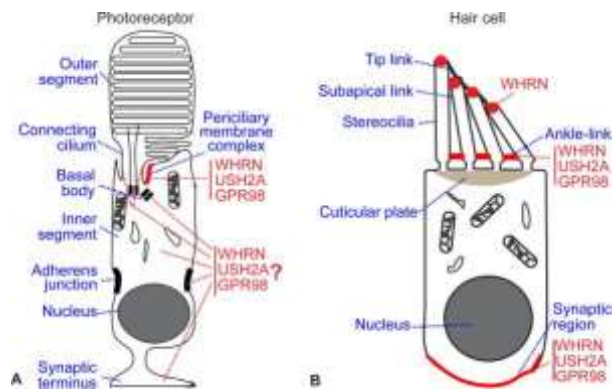
In fase di sviluppo è l'analisi del gene DFNA3, che codifica per il canale ionico KCNQ4 nelle cellule ciliate. KCNQ4 è un canale cruciale richiesto alla fine del ciclo di trasduzione meccanoelettrica
Gitter AH et al. Membrane potential and ion channels in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1986;48(2):68-75.

L'assenza di KCNQ4 può provocare sordità e quindi l'analisi del gene DFNA3 può contribuire a un'indicazione precoce dell'impianto cocleare pediatrico

Smith RJH et al. Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNA3; in: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K (eds): GeneReviews® [Internet]. Seattle, University of Washington, 1993.

Lo stesso vale per le analisi del **gene Usher** che consentono un'indicazione precoce dell'applicazione dell'IC per preparare le capacità comunicative in caso di prevista sordità cieca
La sindrome di Usher è la sordità-cecità più comune causata da mutazioni genetiche. Ad oggi sono stati identificati tre geni alla base della forma più diffusa della sindrome di Usher, la forma di tipo II (USH2). È stato dimostrato che le proteine codificate da questi geni formano un complesso in vivo. Questo complesso è localizzato principalmente nel complesso della membrana periciliare nei fotorecettori e nel collegamento della caviglia delle stereocilia nelle cellule ciliate. È stato scoperto che molte proteine interagiscono con le proteine USH2 in vitro, suggerendo che sono potenziali componenti aggiuntivi di questo complesso USH2 e che i geni che codificano queste proteine potrebbero essere i geni candidati USH2. Tuttavia, ulteriori indagini sono fondamentali per stabilire la loro esistenza nel complesso USH2 in vivo. Sulla base dei domini funzionali previsti nelle proteine USH2, delle loro localizzazioni cellulari nei fotorecettori e nelle cellule ciliate, dei fenotipi osservati nei topi mutanti USH2 e della conoscenza nota di malattie simili a USH2, sono state proposte presunte funzioni biologiche del complesso USH2. Infine, gli approcci terapeutici per questo gruppo di malattie vengono ora esplorati attivamente.

Yang J et al. Current understanding of usher syndrome type II. Front Biosci (Landmark Ed). 2012 Jan 1;17(3):1165-83.



Localizzazione cellulare delle proteine USH2. (A) Nei fotorecettori, le proteine USH2 erano precedentemente localizzate nel ciglio di collegamento, nei corpi basali, nel segmento interno, nella giunzione aderente e nel terminale sinaptico (punto interrogativo). Recentemente è stato dimostrato che sono arricchiti nel complesso della membrana periciliare (rosso) tra il segmento esterno e quello interno Qui viene presentato un fotorecettore a bastoncello. La localizzazione delle proteine USH2 nei fotorecettori dei coni è presumibilmente simile a quella dei fotorecettori dei bastoncelli. (B) Nelle cellule ciliate, USH2A, GPR98 e whirlin (rosso) sono localizzati al collegamento della caviglia delle stereocilia durante lo sviluppo. Sono presenti anche nella regione sinaptica delle cellule ciliate, tranne per il fatto che il vortice è assente nella regione sinaptica delle cellule ciliate interne. Durante lo sviluppo e nell'età adulta, il vortice è presente anche sulla punta delle stereociglia.

Allegato 1 : Effetti indesiderati dei farmaci.

Un esempio può essere **vemurafenib**, un inibitore di BRAF per il trattamento dei melanomi maligni che possono produrre spinaliomi. In alcuni casi, le mutazioni RAS sono in grado di predire un rischio individuale esistente di carcinomi cutanei [2].

Un altro esempio è la previsione della risposta terapeutica. Le varianti genetiche possono portare ad alterazioni del metabolismo o dell'escrezione di un farmaco. Il riconoscimento di queste varianti dovrebbe consentire un adattamento del dosaggio di un farmaco. Ciò include **la prescrizione di statine** per abbassare la concentrazione di colesterolo nel siero. La diagnostica delle varianti genetiche delle proteine di trasporto delle statine consente di riconoscere una ridotta ammissione epatica che influenza l'efficacia del farmaco [3].

Il **tamoxifene** è un farmaco per il trattamento postoperatorio dei carcinomi mammari positivi al recettore degli estrogeni, la cui efficacia richiede una conversione enzimatica del farmaco. Il 10% delle donne caucasiche possiede un difetto del gene CYP2D6, che determina una ridotta efficacia del farmaco [4]. Questo risultato può essere fortemente influenzato dalla fonte genetica. Per la genotipizzazione del CYP2D6, le cellule germinali piuttosto che le cellule tumorali sembrano essere appropriate come fonte di DNA [5].

Questi esempi possono caratterizzare la filosofia della medicina individualizzata, vale a dire l'ampia applicazione dei principi di previsione basati su omex utilizzando (a) la diagnostica omex, seguita da (b) un processo decisionale basato sulla matematica per (c) un uso preciso di una terapia mirata, selezionando lo strumento terapeutico di successo da (d) un insieme di strumenti preesistenti (farmaci, prodotti medici), ed evitando (e) il trattamento sia dei non-responder che (f) dei rispondenti che producono effetti farmacologici indesiderati intollerabili.

Allegato 2 : Chemioterapia.

Obiettivi importanti in oncologia sono le **tirosin chinasi** [6]. In parte, i geni della tirosina chinasi sono anche chiamati proto-oncogeni. Regolano la divisione cellulare coordinata e la durata della vita cellulare. Le alterazioni genetiche possono indurre deformazioni della tirosina chinasi essendo un meccanismo molecolare chiave nella trasformazione delle cellule normali in cellule maligne [6]. Pertanto, gli **inibitori della tirosina chinasi (TKI)** possono essere strumenti utili per una terapia tumorale mirata.

Ad esempio, l'**anticorpo trastuzumab (Herceptin)** può essere utile per il trattamento dei tumori al seno portatori di errori di espressione del gene HER2 [7].

Imatinib inibisce una diversa tirosina chinasi, ovvero una chinasi ABL con effetti inibitori per le proteine c-KIT e PDGFRA. Sono utilizzati per il trattamento di casi specifici di leucemia cronica con un tasso di controllo del tumore del 90% fino a 5 anni [8].

I rari **tumori stromali gastrointestinali** possono produrre un biomarcatore costituito da mutazioni di 2 geni associati. Contrariamente alla chemioterapia convenzionale con un tasso di risposta clinica del 5% nei tumori stromali gastrointestinali positivi ai biomarcatori, imatinib può aumentare il tasso di risposta fino al 50% [9,10].

Nei **melanomi maligni della mucosa**, il sequenziamento multiplo di geni (ad esempio KIT, BRAF e NRAS) può essere determinante per identificare singoli biomarcatori per l'applicazione di imatinib e relativi TKI per il trattamento delle metastasi c-KIT-mutate [11,12].

Vemurafenib è un altro TKI che può essere applicato nei melanomi maligni con mutazione BRAF-V600E e BRAF-V600K [[13](#)].

Erlotinib e gefitinib possono essere utilizzati nei carcinomi bronchiali positivi alla mutazione specifica del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) [[14](#)], poiché la parte tirosina chinasi dell'EGFR può essere mutata nel 10% della popolazione caucasica e nel 30% della popolazione asiatica [[15](#)]. In presenza di questi marcatori tumorali, il tasso di controllo del tumore può aumentare fino al 90%, accompagnato da un aumento del tempo di sopravvivenza fino a 27 mesi [[16,17,18,19](#)].

È interessante notare che l'efficacia può essere migliorata da un ulteriore FGFR (recettore del fattore di crescita dei fibroblasti) influenzando il tasso di apoptosi. Un altro obiettivo importante è l'EGFR.

Un **anticorpo monoclonale (cetuximab)** diretto contro l'EGFR può essere utilizzato per il trattamento dei carcinomi del colon, dei carcinomi della testa e del collo, nonché dei carcinomi spinocellulari. Il prerequisito di base, tuttavia, è la presenza del recettore non troncato e della proteina EGFR/K-Ras wild-type (una proteina G, che comunica con l'EGFR), cosa che abbastanza spesso non avviene [[20](#) , [21,22,23](#)].

Pertanto, la sfida consiste nell'identificazione di pazienti con proteine EGFR troncato e EGFR/K-Ras mutate come biomarcatori per escludere questi pazienti da un trattamento anticorpale inappropriato [[24](#)].

Di conseguenza, i costi del trattamento possono essere ridotti perché il trattamento costoso può essere limitato ai pazienti selezionati dal biomarcatore. Le proteine della via del riccio potrebbero essere un ulteriore bersaglio. Sporadicamente, i carcinomi basocellulari possono produrre varie mutazioni della via del riccio. Ciò include la **specifica proteina hedgehog** (codificata dal gene TCTH1 come biomarcatore) e la proteina lisciata (il gene biomarcatore rilevante è il gene SMO) [[25](#)]. In presenza di mutazioni può essere indicata un'inibizione della proteina hedgehog mediante piccole molecole [[26,27,28,29](#)].

Nonostante i metodi di previsione altamente complessi basati su biomarcatori omex-dipendenti, le terapie mirate contro il tumore potrebbero fallire. Ciò potrebbe essere dovuto agli elevati tassi di mutazione tumorale noti che determinano una tipica eterogeneità genetica. Questa eterogeneità può contribuire, ad esempio, alla formazione di resistenza durante il trattamento con TKI. In secondo luogo, le mutazioni dei geni BCR-ABL nei pazienti affetti da leucemia vengono utilizzate per spiegare la resistenza a imatinib osservata diversi anni dopo il successo delle terapie continue con imatinib.

Recentemente, un farmaco a base di proteine di trasporto transmembrana è stato approvato per la terapia della fibrosi cistica (che è ereditata in modo recessivo) [[33,34](#)]. Sono stati identificati due geni M. Osler (HHT1 e HHT2) che codificano per le proteine endoglina e chinasi simile al recettore dell'attivina [[35](#)]. Come biomarcatori, possono essere utilizzati per seguire problemi di shunt nel cervello, nei polmoni e nel fegato

Allegato 3 : **Oftalmologia.**

Le mutazioni genetiche di **CYP1B1 e LTBP2** sono associate a glaucomi congeniti [[45](#)]; mutazioni di **MYOC, OPTN e WDR36** sono associate a glaucomi primari, consentendo alle analisi genetiche di prevedere meglio la probabilità della malattia [[45,46](#)].

La genomica delle *malattie neovascolari della retina*, compresi i geni **HTRA1** e **ARMS2**, può contribuire a una diagnosi precoce. Astenendosi contemporaneamente dal fumo e dall'alcol, la diagnosi precoce può ritardare o addirittura evitare la degenerazione maculare dipendente dall'età [[47,48,49](#)]. Inoltre, nei casi con una variante CFH, i primi piccoli studi hanno rivelato un aumento dell'odds ratio dopo l'applicazione dell'anticorpo ranibizumab [[50](#)]. La medicina personalizzata gioca un ruolo importante **nell'amaurosi congenita di Leber**. L'identificazione di RPE56 determina la diagnosi. Inoltre, gli esperimenti sugli animali che hanno introdotto la normale sequenza genetica nelle cellule gangliari della retina e gli studi clinici hanno fornito prove convincenti dell'efficacia della terapia genica [[51](#)]. Inoltre, per i casi di **degenerazione retinica pediatrica** con mutazione del gene RPE65, è stata sviluppata una terapia genica basata sulla genomica. Il risultato è stato un miglioramento della qualità della vita del bambino [[52,53](#)]. Utilizzando la correzione genetica, si prevede un progresso simile nella terapia genica basata sulla genomica per la **distrofia muscolare di Duchenne** [[54,55,56](#)]. Attualmente, i metodi di analisi del genoma per l'applicazione in oftalmologia sono in fase di ulteriore sviluppo [[57,58](#)].

Riferimenti

1.

Friedrich B, Heitz U, Kroemer K, Bieber T, Dietel M, Ertl G, Gethmann CF, Hallek M, Hecker M, Joerden JC, Koller K, Lengauer T, Löffler M, Lohse MJ, Oberender P, Propping P, Pühler A, Stingl G, Taupitz J, Zenner HP: Individualized medicine. *Natl Acad Sci Leopoldina* 2014;1:4-100.

2.

Su F, Viros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, Reis-Filho JS, Kong X, Koya RC, Flaherty KT, Chapman PB, Kim MJ, Hayward R, Martin M, Yang H, Wang Q, Hilton H, Hang JS, Noe J, Lambros M, Geyer F, Dhomen N, Niculescu-Duvaz I, Zambon A, Niculescu-Duvaz D, Preece N, Robert L, Otte NJ, Mok S, Kee D, Ma Y, Zhang C, Habets G, Burton EA, Wong B, Nguyen H, Kockx M, Andries L, Lestini B, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Troy JL, Gonzalez R, Hutson TE, Puzanov I, Chmielowski B, Springer CJ, McArthur GA, Sosman JA, Lo RS, Ribas A, Marais R: RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* 2012;366:207-215.

3.

Canestaro WJ, Brooks DG, Chaplin D, Choudhry NK, Lawler E, Martell L, Brennan T, Wassman ER: Statin pharmacogenomics: opportunities to improve patient outcomes and healthcare costs with genetic testing. *J Pers Med* 2012;2:158-174.

4.

Goetz MP, Kamal A, Ames MM: Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:160-166.

5.

Brauch H, Schwab M: Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in post-menopausal women with early breast cancer. *Br J Clin Pharmacol* 2014;77:695-703.

6.

Kolch W, Pitt A: Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:618-629.

7.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.

8.

Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA: Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355:2408-2417.

9.

Cohen MH, Farrell A, Justice R, Pazdur R: Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2009;14:174-180.

10.

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA: PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708-710.

11.

Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, Fletcher JA, Zhu M, Marino-Enriquez A, Friedlander P, Gonzalez R, Weber JS, Gajewski TF, O'Day SJ, Kim KB, Lawrence D, Flaherty KT, Luke JJ, Collichio FA, Ernstoff MS, Heinrich MC, Beadling C, Zukotynski KA, Yap JT, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Fisher DE: Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* 2013;31:3182-3190.

12.

Lutzky J, Bauer J, Bastian BC: Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:492-493.

13.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierio P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA: Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507-2516.

14.

Shepherd FA, Rodrigues PJ, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van KM, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-132.

15.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-181.

16.

Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-2388.

17.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-957.

18.

Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sanchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Sanchez JJ, Taron M: Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958-967.

19.

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha SG, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA: Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005;353:133-144.

20.

Yarbrough WG, Slebos RJ, Liebler D: Proteomics: clinical applications for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28:549-558.

21.

Fung C, Grandis JR: Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. *Expert Opin Emerg Drugs* 2010;15:355-373.

22.

Mauerer A, Herschberger E, Dietmaier W, Landthaler M, Hafner C: Low incidence of EGFR and HRAS mutations in cutaneous squamous cell carcinomas of a German cohort. *Exp Dermatol* 2011;20:848-850.

23.

Sabattini S, Marconato L, Zoff A, Morini M, Scarpa F, Capitani O, Bettini G: Epidermal growth factor receptor expression is predictive of poor prognosis in feline cutaneous squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg* 2010;12:760-768.

24.

Zander T, Hallek M: Tyrosine kinase inhibitors in oncology. *Internist (Berl)* 2011;52:595-600.

25.

Stacey SN, Sulem P, Jonasdottir A, Masson G, et al: A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat Genet* 2011;43:1098-1103.

26.

Weiss GJ, Korn RL: Metastatic basal cell carcinoma in the era of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Cancer* 2012;118:5310-5319.

27.

Kudchadkar R, Lewis K, Gonzalez R: Advances in the treatment of basal cell carcinoma: Hedgehog inhibitors. *Semin Oncol* 2012;39:139-144.

28.

Raju GP, Pham D: Hedgehog inhibition as an anti-cancer strategy. *Vitam Horm* 2012;88:507-522.

29.

Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC Jr, de Sauvage FJ, Low JA: Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:1164-1172.

30.

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352:786-792.

31.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA: MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-1043.

32.

Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, Seeger JM, Weiss J, Fischer F, Frommolt P, Michel K, Peifer M, Mermel C, Girard L, Peyton M, Gazdar AF, Minna JD, Garraway LA, Kashkar H, Pao W, Meyerson M, Thomas RK: PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* 2009;69:3256-3261.

33.

Antunovic SS, Lukac M, Vujovic D: Longitudinal cystic fibrosis care. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93:86-97.

34.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho

- JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-954.
- 35.**
Bossler AD, Richards J, George C, Godmilow L, Ganguly A: Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. *Hum Mutat* 2006;27:667-675.
- 36.**
Lin X, Tang W, Ahmad S, Lu J, Colby CC, Zhu J, Yu Q: Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hear Res* 2012;288:67-76.
- 37.**
Zak M, Pfister M, Blin N: The otoferlin interactome in neurosensory hair cells: significance for synaptic vesicle release and trans-Golgi network (review). *Int J Mol Med* 2011;28:311-314.
- 38.**
Brown KK, Rehm HL: Molecular diagnosis of hearing loss. *Curr Protoc Hum Genet* 2012;(chapter 9):Unit 9.16.
- 39.**
Black J, Hickson L, Black B, Perry C: Prognostic indicators in paediatric cochlear implant surgery: a systematic literature review. *Cochlear Implants Int* 2011;12:67-93.
- 40.**
Qu Y, Tang W, Zhou B, Ahmad S, Chang Q, Li X, Lin X: Early developmental expression of connexin26 in the cochlea contributes to its dominate functional role in the cochlear gap junctions. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:245-250.
- 41.**
Gitter AH, Zenner HP, Fromter E: Membrane potential and ion channels in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1986;48:68-75.
- 42.**
Smith RJH, Ranum PT: Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, DFNA3; in: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K (eds): *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle, University of Washington, 1993.
- 43.**
Yang J, Wang L, Song H, Sokolov M: Current understanding of Usher syndrome type II. *Front Biosci (Landmark ed)* 2012;17:1165-1183.
- 44.**
Loundon N, Marlin S, Busquet D, Denoyelle F, Roger G, Renaud F, Garabedian EN: Usher syndrome and cochlear implantation. *Otol Neurotol* 2003;24:216-221.
- 45.**
Khan AO: Genetics of primary glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2011;22:347-355.
- 46.**
Ramdas WD, van Koolwijk LM, Cree AJ, Janssens AC, Amin N, de Jong PT, Wolfs RC, Gibson J, Kirwan JF, Hofman A, Rivadeneira F, Oostra BA, Uitterlinden AG, Ennis S, Lotery AJ, Lemij HG, Klaver CC, Vingerling JR, Jansoni NM, van Duijn CM: Clinical implications of old and new genes for open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 2011;118:2389-2397.
- 47.**
Lima LH, Schubert C, Ferrara DC, Merriam JE, Imamura Y, Freund KB, Spaide RF, Yannuzzi LA, Allikmets R: Three major loci involved in age-related macular degeneration are also associated with polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology* 2010;117:1567-1570.
- 48.**
Kortvely E, Hauck SM, Duetsch G, Gloeckner CJ, Kremmer E, Alge-Priglinger CS, Deeg CA, Ueffing M: ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:79-88.
- 49.**
Chan CC, Shen D, Zhou M, Ross RJ, Ding X, Zhang K, Green WR, Tuo J: Human HtrA1 in the archived eyes with age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2007;105:92-97.
- 50.**
Shastri BS: Common polymorphisms of the CFH, LOC 387715/ARMS2 and HTRA1 genes may not influence the intra-familial variability of X-linked juvenile retinoschisis. *Mol Med Rep* 2010;3:469-471.
- 51.**
Koilkonda RD, Guy J: Leber's hereditary optic neuropathy-gene therapy: from benchtop to bedside. *J Ophthalmol* 2011;2011:179412.
- 52.**
Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bencicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zelenia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J: Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2009;374:1597-1605.
- 53.**
Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon TJ, Calcedo R, Pang JJ, Erger KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ, Hauswirth WW: Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012;130:9-24.
- 54.**
Barbash IM, Cecchini S, Faranesh AZ, Virag T, Li L, Yang Y, Hoyt RF, Kornegay JN, Bogan JR, Garcia L, Lederman RJ, Kotin RM: MRI roadmap-guided transcatheter delivery of exon-skipping recombinant adeno-associated virus restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* 2013;20:274-282.
- 55.**
Seto JT, Ramos JN, Muir L, Chamberlain JS, Odom GL: Gene replacement therapies for Duchenne muscular dystrophy using adeno-associated viral vectors. *Curr Gene Ther* 2012;12:139-151.
- 56.**

El Andaloussi SA, Hammond SM, Mager I, Wood MJ: Use of cell-penetrating-peptides in oligonucleotide splice switching therapy. *Curr Gene Ther* 2012;12:161-178.

57.

Zernant J, Schubert C, Im KM, Burke T, Brown CM, Fishman GA, Tsang SH, Gouras P, Dean M, Allikmets R: Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8479-8487.

58.

Song J, Smaoui N, Ayyagari R, Stiles D, Benhamed S, MacDonald IM, Daiger SP, Tumminia SJ, Hejtmancik F, Wang X: High-throughput retina-array for screening 93 genes involved in inherited retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:9053-9060.