

## Новый вариант p.Cys3024Tyr и частые мутации в гене *PKHD1*, выявленные в семьях с аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек в Российской Федерации

Вассерман Н.Н., Поляков А.В.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»;  
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь почек (АРПП) – форма поликистозной болезни почек с ранним началом. Она является важной причиной заболеваемости и смертности детей, связанных с изменениями почек и печени. Ген *PKHD1*, мутации в котором приводят к развитию заболевания, локализован на хромосоме 6p21.1-p12. С самого протяженного транскрипта, состоящего из 67 экзонов, синтезируется белок полидуктин. Мутации располагаются во всем гене без признаков кластеризации. Поэтому поиск мутаций является трудоемким, дорогостоящим и требует много времени. В гене *PKHD1* идентифицирован новый вариант c.9071G>A (p.Cys3024Tyr) в 14 семьях на 16 хромосомах, что составляет 12,7% найденных мутаций. Данный вариант не встретился на 1008 хромосомах контрольной выборки. Частыми мутациями в выборке больных с АРПП являются: c.107C>T (p.Thr36Met), встретившаяся у 53% семей с мутациями на 41% хромосом; мутации c.1486C>T (p.Arg496Ter) и c.9524A>G (p.Asn3175Ser) выявлены в 10% семей каждая. Поиск мутаций в гене *PKHD1* важен для подтверждения диагноза молекулярно-генетическими методами, а также для проведения медико-генетического консультирования в семьях с последующей пренатальной диагностикой, особенно в семьях, в которых недоступен материал больного ребенка.

**Ключевые слова:** Аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь почек, ген *PKHD1*, мутация.

**Для цитирования:** Вассерман Н.Н., Поляков А.В. Новый вариант p.Cys3024Tyr и частые мутации в гене *PKHD1*, выявленные в семьях с аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек в Российской Федерации. *Медицинская генетика* 2019; 18(1): 3-7.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.01.3-7

**Автор для корреспонденции:** Вассерман Наталья Наумовна, e-mail: vasserman@dnalab.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

**Конфликт интересов.** Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 11.12.2018

## Novel variant p.Cys3024Tyr and frequent mutations in the *PKHD1* gene in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease from Russian Federation

Vasserman N.N., Polyakov A.V.

Research Centre for Medical Genetics;  
Moskvorechie 1, 115522, Moscow, Russia

Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD, Polycystic kidney disease 4 with or without hepatic disease, MIM 263200) is a severe genetic disorder with variable clinical spectrum. It is an important cause of renal-related and liver-related morbidity and mortality. ARPKD is caused by mutations in the *PKHD1* gene which was mapped to chromosome 6p21-p12. A 67-exon transcript encodes one of the longest continuous open reading frame. Protein polyductin is synthesized from this transcript. Mutations were found to be scattered throughout the gene without evidence of clustering. Searching for mutations is time-consuming and costly. We identified new variant c.9071G>A (p.Cys3024Tyr) in 14 families on 16 chromosomes which makes 12.7% mutations. This variant did not found on 1008 control chromosomes. Mutation c.107C>T (p.Thr36Met) occurs in 53% families with mutation on 41% chromosomes. Mutations c.1486C>T (p.Arg496Ter) and c.9524A>G (p.Asn3175Ser) occur in 10% families each. Mutation analysis in *PKHD1* gene is very important for confirming the ARPKD diagnosis and genetic counseling with following prenatal diagnosis.

**Keywords:** Autosomal recessive polycystic kidney disease, *PKHD1* gene, mutation.

**For citation:** Vasserman N.N., Polyakov A.V. Novel variant p.Cys3024Tyr and frequent mutations in the *PKHD1* gene in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease from Russian Federation. *Medical genetics* 2019; 18(1): 3-7 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2019.01.3-7

**Corresponding author:** Vasserman Natalya Naumovna, e-mail: vasserman@dnalab.ru

**Funding.** The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation.

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 11.12.2018

## Введение

Аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь почек (АРПП, autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD, Polycystic kidney disease 4 with or without hepatic disease, MIM 263200) – тяжелая форма поликистозной болезни почек с ранним началом, ренально-гепато-панкреатическая дисплазия. Это наследственное заболевание с вариабельной клинической картиной встречается с частотой 1:20 000 новорожденных [1]. У большинства больных АРПП выявляется при ультразвуковом исследовании на поздних сроках беременности или при рождении. Однако описаны случаи, когда признаки болезни появляются в детском или взрослом возрасте. Порок возникает в результате гиперплазии собирательных протоков и дистальных трубочек. Почки значительно увеличены в размерах, микроскопически выявляются множественные мелкие кисты. В большинстве случаев выявляются кисты печени, иногда – кисты легких, селезенки и поджелудочной железы. Заболевание сопровождается изменениями лица (лицо Поттера) и гипоплазией легких. В печени и поджелудочной железе наблюдаются фиброз и/или кистозные изменения. В течение первых месяцев жизни у 80% детей развивается артериальная гипертензия. При раннем проявлении АРПП в основном поражаются почки. У больных с поздним началом заболевания преобладает повреждение печени с последующей портальной гипертензией, почки вовлечены в меньшей степени [2].

Диагностическими критериями АРПП являются клиническая манифестация с характерными изменениями почек, видными при ультразвуковом обследовании, фиброз печени и отсутствие почечных кист у родителей [3]. Необходимо проводить дифференциальную диагностику с похожими клиническими состояниями для последующей ДНК-диагностики. Наиболее важно отличать АРПП от аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек с ранним началом (АДПП). Поликистозная болезнь почек с ранним началом и тяжелыми клиническими проявлениями может встречаться у 2% больных с АДПП [4]. При поликистозной болезни почек у ребенка надо проводить ультразвуковое исследование почек родителей. Однако некоторые аллели являются гипоморфными, а 2–5% мутаций при АДПП появляются *de novo*. Кроме того, мутации в обоих генах, приводящих к АДПП (*PKD1*, *PKD2*) также могут наследоваться по рецессивному типу [5].

30–50% новорожденных с АРПП умирают вскоре после рождения от респираторной недостаточности в результате легочной гипоплазии. Для больных, переживших неонатальный период, прогноз более благо-

приятный [6]. Вероятность 10- и 20-летнего периода выживания оценивается в 71% и 42%, соответственно [2]. В связи с большой смертностью больных встает вопрос о пренатальной диагностике.

В 2002 году двумя независимыми группами был открыт ген polycystic kidney and hepatic disease 1 (*PKHD1*, MIM 606702) [8, 9]. Ген включает, по крайней мере, 86 экзонов и имеет протяженность 643 т.п.н. геномной ДНК. Экзоны гена участвуют в образовании различных транскриптов длиной 8,5–13 т.н., синтезирующихся в результате альтернативного сплайсинга. С самого длинного транскрипта, содержащего 67 экзонов, синтезируется белок полидуктин (фиброцистин), состоящий из 4074 аминокислотных остатков и имеющий молекулярную массу 447 kDa. Он представляет собой интегральный мембранный белок с высоко гликозилированным N-концевым внеклеточным районом, включающим 3858 аминокислотных остатков, трансмембранным доменом (аминокислотные остатки 3859–3879) и коротким цитоплазматическим хвостом (аминокислотные остатки 3880–4074) [9, 10]. Предполагают, что белок может участвовать в регуляции пролиферации и адгезии клеток [11].

Мутации в гене *PKHD1* выявлены в различных экзонах без признаков кластеризации. Хотя бы одну мутацию находят более чем в 95% семей [12]. При обнаружении одной мутации диагноз АРПП становится более вероятным. Однако за мутацию может быть принят функционально не значимый вариант, особенно если это единственное найденное изменение. Около 45% мутаций приводят к образованию преждевременного стоп-кодона и синтезу укороченного белка [13]. Все больные с двумя такими мутациями имеют тяжелые клинические проявления и умирают вскоре после рождения. При наличии миссенс-мутаций в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии больные имеют мягкие клинические проявления и переживают неонатальный период. Таким образом, корреляция генотип-фенотип прослеживается для типа мутации, а не для места изменения в ДНК. Кроме точковых мутаций методом количественной полимеразной цепной реакции были выявлены крупные делеции в гене *PKHD1*, затрагивающие один или несколько экзонов [12]. Всего описано 748 вариантов в гене *PKHD1* ([www.humgen.gwth-aachen.de](http://www.humgen.gwth-aachen.de)). Большинство мутаций являются уникальными, однако одна миссенс-мутация с.107С>Т (р. Thr36Met) в экзоне 3 составляет примерно 20% мутантных аллелей. Данная мутация встречается у неродственных больных различного этнического происхождения. Анализ полиморфных маркеров выявил, по крайней мере, 16 различных гаплотипов, сцепленных с этой мутацией в Германии и Финляндии [13]. Таким

образом, мутация р.Thr36Met представляет собой «горячую» точку, а не распространилась в результате эффекта основателя. Мутация р.Thr36Met в сочетании с некоторыми миссенс-мутациями или с мутациями, приводящими к синтезу укороченного белка, часто приводит к тяжелым клиническим проявлениям [2, 3]. Она представляет собой потенциальный альтернативный иницирующий кодон, предположительно более сильный, чем исконный иницирующий кодон, приводя к образованию укороченного белка без участка, требуемого для его сворачивания. То есть эта миссенс-мутация может приводить к полной потере функции белка. Bergmann с соавт. [13] идентифицировали две мутации с.1486C>T (р.Arg496Ter) и с.10412T>G (р.Val3471Gly), составляющие 60% мутаций у больных в Финляндии, распространившиеся в результате эффекта основателя. Остальные мутации в основном являются уникальными.

У больных без мутаций или с одной мутацией в гене *PKHD1* необходимо проводить поиск мутаций в других генах. Благодаря массовому параллельному секвенированию (NGS) у некоторых больных с предварительным диагнозом АРПП были найдены мутации в других генах. Учитывая размер гена *PKHD1*, а также необходимость поиска мутаций в других генах, приводящих к поликистозу почек, использование NGS представляется наиболее адекватной стратегией молеку-

лярно-генетического тестирования, так как этот метод позволяет одновременно анализировать несколько генов в одном образце.

Выявление мутаций в гене *PKHD1* позволяет подтвердить диагноз АРПП у больных, а в случае обнаружения мутаций у родителей становится возможным проведение пренатальной диагностики даже при отсутствии биологического материала больного ребенка.

## Материалы и методы

Поиск мутаций был проведен в 280 семьях со случаями поликистоза почек. В 179 семьях был доступен материал от больных детей, в 101 семье исследовалась ДНК обоих родителей. От родителей больных детей получено информированное согласие на проведение исследования и обработку результатов.

Был проведен поиск мутаций в 7 экзонах (3, 16, 32, 36, 57, 58 и 61) гена *PKHD1* (табл. 1). Эти экзоны были выбраны после анализа баз данных о мутациях, выявленных в гене *PKHD1* ([www.humgen.rwth-aachen.de](http://www.humgen.rwth-aachen.de) и <http://www.hgmd.cf.ac.uk>), а также литературных данных [14]. В указанных экзонах находили несколько мутаций в различных популяциях. Полимеразную цепную реакцию проводили на программируемом термодиспетчере МС2 производства фирмы «ДНК-технология» (Россия) в 25 мкл однократного буфера для ПЦР сле-

**Таблица 1. Экзоны, праймеры и условия проведения ПЦР участков гена *PKHD1*, в которых проводился поиск мутаций.**

Экзон	Количество описанных мутаций	Последовательность праймеров	Длина амплифицируемого фрагмента, bp	Концентрация MgCl <sub>2</sub> , mM	t <sup>0</sup> отжига, °C	Количество циклов
3	3	F: GGTAGTGGTTGAATCTGACCTC R: GGGTCAATACATAAGAAATGTGCAC	178	4	62	32
16	13	F:GAAAGAGATGCCTGGAAGCTGC R: CTTATTCCTTCCAGAGTCCAGCTC	386	4	65	32
32	11	F1:GTTCAAGAAATATCAGCTATAATATTTTGC R1: AGCAAATCCCATCTGCTTCTGAC	548	6	60	34
	15	F2: CGTGAGCCTGTCTGGATGCTC R2: GGAACATTACCAGAACAAGCATACC	661	3	62	32
	15	F3: CGTTGTGTGCCAGACAAGAGAC R3: CAATTCATTTACATAAAGAAAGTGTGC	680	3	62	32
36	7	F:CAGCGAACCAACCAACGAAGC R: CCAGAAAGTTTCCCTCCTCCATC	314	4	65	32
57	8	F:GTCCCCAGCTAGTGATTTTGAAC R: GTCCAGATGAATAGGCTCCAAC	277	4	65	32
58	9	F1:CTTTTGTGGGGAAGAGGAAAGTACC R1: GGTACAGTTGTCAAGTCCACTTTCC	524	3	62	32
	20	F2:CAAGTGCTCCTCTTGGAAGTGC R2:CATGGATGTATGAAATGGCACTGC	550	4	65	32
61	17	F1:CATTGACAGATTATAATTATATATCAC R1: CCTCTCCTTGTAGGACAACATAC	548	6	58	32
	13	F2:GGTTCAGTCAGCTTCTTATTGC R2: GACATTTGCAACATATGTCAATATGGAC	692	3	62	32

дующего состава: 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16.6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% Twin-20, 0.1-1 мкг геномной ДНК, 0,25 мкМ каждого олигопраймера, 250 мкМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, с использованием 1 единицы термостойкой ДНК-полимеразы Biotaq («Биомастер»). Концентрация  $\text{MgCl}_2$  варьировала от 2 до 6 mM для разных пар праймеров. ПЦР проводили при следующих условиях: первоначальная денатурация 95 °C – 5 мин, 32-34 цикла амплификации: 94 °C – 45 сек, 58-65 °C – 45 сек, 72 °C – 45 сек. Заключительная элонгация 72 °C – 7 мин.

Определение нуклеотидной последовательности проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems согласно протоколу производителя.

## Результаты и обсуждение

Поиск мутаций во всех экзонах гена *PKHD1* является трудоемким, долговременным и дорогостоящим в связи с большой протяженностью гена и наличием различных мутаций практически во всех экзонах во всех популяциях, кроме финской. Bergmann C. с соавт. после анализа описанных в литературе мутаций в гене *PKHD1* в различных популяциях выработали алгоритм поиска мутаций [14]. На первом этапе ими предлагалось проводить поиск мутаций в экзонах 3, 9, 32, 36, 57, 58, 61. Мутации в этих экзонах вносят наибольший вклад в развитие заболевания (более 50%). Нами также были проанализированы базы данных о мутациях [www.humgen.rwth-aachen.de](http://www.humgen.rwth-aachen.de) и <http://www.hgmd.cf.ac.uk>. В результате было выбрано 7 экзонов (3, 16, 32, 36, 57, 58 и 61), в которых встретилось более одной мутации или были описаны частые мутации в разных популяциях (табл.1), и проведен поиск мутаций в этих экзонах гена *PKHD1* в семьях российских больных.

Проведен анализ ДНК 179 пробандов и родителей 101 пробанда, материал которых был не доступен. В 42 семьях были выявлены две мутации в указанных экзонах, в 42 семьях идентифицирована одна мутация. Всего патогенные варианты выявлены на 126 хромосомах. Самой частой, как и в других популяциях, оказалась замена с.107C>T (p.Thr36Met) в экзоне 3. Она встретилась в 45 семьях на 51 хромосоме. Таким образом, мутация p.Thr36Met выявлена в 53% семей с выявленными мутациями на 41% хромосом. Мутация с.1486C>T (p.Arg496Ter), характерная для финской популяции, также встретилась в выборке больных. Она выявлена в 8 семьях в гетерозиготном состоянии, что составляет 6,4% среди хромосом с мутациями у 10% семей. Кроме того в 8 семьях (10%) в гетерозиготном состоянии встретилась мутация с.9524A>G (p.Asn3175Ser), локализованная в экзоне 58, что составило 6,4%.

В экзоне 58 идентифицирована замена нуклеотида G на A в положении 9071, приводящая к аминокислотной замене p.Cys3024Tyr, встретившаяся в 14 неродственных семьях. Данная замена не описана в базе мутаций *PKHD1* ([www.humgen.rwth-aachen.de](http://www.humgen.rwth-aachen.de)), базе SNP ресурса NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), базе мутаций HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) и базе GenomeAggregationDatabase (gnomAD). В 12 семьях замена выявлена в гетерозиготном состоянии. В одной семье ребенок оказался носителем данной замены в гомозиготном состоянии, т.к. родители были гетерозиготными носителями. Еще в одной семье материал родителей не был доступен, из-за чего нельзя определить, в гомозиготном или в гетерозиготном состоянии замена p.Cys3024Tyr присутствует у ребенка. Однако делеции в гене *PKHD1* встречаются нечасто, и наиболее вероятно наличие данной мутации у ребенка в гомозиготном состоянии. Всего замена p.Cys3024Tyr встретилась на 16 хромосомах. Ее частота

Таблица 2. Количество выявленных мутаций в «горячих» участках гена *PKHD1*.

Экзон	Мутации	Число хромосом с мутациями (данное исследование)	Число хромосом с мутациями по данным литературы		
			[10]	[15]	[3]
3	всего	53	21	8	6
	p.Thr36Met	51	21	7	6
16	всего	9	8	5	-
	p.Arg496Ter	8	2	1	-
32	всего (частых нет)	16	12	26	3
36	всего (частых нет)	5	4	17	3
57	всего (частых нет)	3	6	6	-
58	всего	28	10	16	-
	p.Cys3024Tyr	16	-	-	-
	p.Asn3175Ser	8	-	-	-
61	всего (частых нет)	12	6	9	1
Всего хромосом		126	67	87	13

составила 12,7% среди хромосом с мутациями у 16,7% семей. Согласно программам предсказания патогенности (Mutation Taster, PolyPhen2, PROVEAN) замена p.Cys3024Tyr оценивается как патогенная. Программа SIFT описывает ее как нейтральную. В контрольной выборке (1008 хромосом) нуклеотидная замена с. 9071G>A не встретилась.

В исследовании, проведенном в выборке чешских пациентов из 24 семей, обе мутации выявлены в 54% семей (13 семей), а одна в 13% (3 семьи) [3]. В экзонах, выбранных нами для исследования (3, 16, 32, 36, 57, 58 и 61), мутации встретились на 45% хромосом (табл. 2). Melchionda S с соавт. в 110 семьях из Италии выявили две мутации в 75 семьях, что составило 68%, одна мутация встретилась в 23 семьях (21%) [15]. В выбранных экзонах мутации присутствуют на 50% хромосом. Среди 68 семей, обследованных Gunay-Aygun M с соавт. [10] 65% (44 семьи) имели две мутации, а 30% (20 семей) — одну. В 62% семей мутации обнаруживались в экзонах 3, 16, 32, 36, 57, 58 и 61. В этих исследованиях проводился поиск мутаций во всех экзонах гена *PKHD1*.

В выбранных нами для исследования экзонах мутации были выявлены всего в 30% обследованных семей: две мутации идентифицированы в 15% семей (42 семьи), одна — также в 15% (42 семьи). Мутации p.Thr36Met, p.Arg496Ter, p.Asn3175Ser и p.Cys3024Tyr встретились на 67% хромосом с мутациями в семьях больных АРПП. Поиск данных мутаций простыми методами, например MLPA, имеет смысл проводить в качестве первого этапа поиска мутаций. В остальных семьях мутации могут быть в других экзонах гена *PKHD1*. Также в ряде семей мутации могут находиться в других генах, приводящих к развитию поликистоза почек. В этих семьях метод NGS позволит одновременно провести поиск во всех экзонах гена *PKHD1* и в других генах, таких как *PKD1*, *PKD2*, *HNF1B*, *GANAB*, *DZIP1L* и выявить в них мутации, обусловившие развитие заболевания.

### Список литературы/References

- Zerres K, Rudnic-Schoneborn S, Steinkamm C et al. Autosomal recessive polycystic kidney disease. *J.Mol.Med.* 1998; 76(5):303-309.
- Bergmann C, Senderek J, Windelen E et al. Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int.* 2005;67(3):829-848. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00148.
- Obeidova L, Seeman T, Elisakova V et al. Molecular genetic analysis of PKHD1 by next-generation sequencing in Czech families with autosomal recessive polycystic kidney disease. *BMC MedicalGenetics.* 2015;16:116. DOI: 10.1186/s12881-015-0261-3.
- Bergmann C, von Bothmer J, Bruchle NO et al. Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2011;22(11):2047-2056. DOI: 10.1681/ASN.2010101080.
- Bergmann C. ARPKD and early manifestation of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies. *Pediatr.Nephrol.* 2015;30(1):15-30. DOI: 10.1007/s00467-013-2706-2.
- Roy S, Dillon MJ, Trompeter RS, Barratt TM. Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term outcome of neonatal survivors. *Pediatr.Nephrol.* 1997;11(3):302-306.
- Zerres K, Mucher G, Bachner L et al. Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat.Genet.* 1994;7(3):429-432. DOI: 10.1038/ng0794-429.
- Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat.Genet.* 2002;30(3):259-269. DOI: 10.1038/ng833.
- Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y et al. PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am.J.Hum.Genet.* 2002; 70(5):1305-1317. DOI: 10.1086/340448.
- Gunay-Aygun M, Tuchman M, Font-Montgomery E et al. PKHD1 sequence variations in 78 children and adults with autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis. *Mol.Genet. Metab.* 2010;99(2):160-173. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.10.010.
- Bergmann C. Genetics of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease and Its Differential Diagnoses. *Front.Pediatr.* 2018;5:221. DOI: 10.3389/fped.2017.00221.
- Bergmann C, Kupper F, Schmitt CP et al. Multi-exon deletions of the PKHD1 gene cause autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *J.Med.Genet.* 2005;42(10):e63. DOI: 10.1136/jmg.2005.032318.
- Bergmann C, Senderek J, Sedlacek B et al. Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1). *J.Am.Soc.Nephrol.* 2003;14(1):76-89.
- Bergmann C, Kupper F, Dornia C et al. Algorithm for efficient PKHD1 mutation screening in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum.Mutation.* 2005;25(3):225-231. DOI: 10.1002/humu.20145.
- Melchionda S, Palladino T, Castellana S et al. Expanding the mutation spectrum in 130 probands with ARPKD: identification of 62 novel PKHD1 mutations by sanger sequencing and MLPA analysis. *J.Hum.Genet.* 2016;61(9):811-821. DOI: 10.1038/jhg.2016.58.