

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

OLGA ŽILINA

**SUBMIKROSKOOPILISTE DNA KOOPIAARVU MUUTUSTE
TUVASTAMINE MIKROKIIBIL PÕHINEVAL MAPH MEETODIL**

Magistritöö

Juhendaja: dots. Ants Kurg, Ph.D

TARTU
2007

Sisukord

SISUKORD.....	2
SISSEJUHATUS	3
LÜHENDID JA MÕISTED.....	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 DNA KOOPIAARVU MUUTUSED HAIGETE JA TERVETE INIMESTE GENOOMIS	6
1.2 X-LIITELISE VAIMSE ARENGU MAHAJÄÄMUSE GENEETIKA	8
1.2.1 Vaimse arengu mahajäämuse mõiste ja põhjused	8
1.2.2 X-liiteline vaimse arengu mahajäämus.....	10
1.3 DNA KOOPIAARVU MUUTUSTE DETEKTEERIMISMEETODID	16
1.3.1 Klassikalised tsütogeneetilised meetodid.....	16
1.3.2 Uued tsütogeneetilised meetodid	19
2 TÖÖ EESMÄRK	28
3 MATERJAL JA METOODIKA.....	29
3.1 MK-MAPH ANALÜÜS.....	29
3.1.1 MK-MAPH proovide valimine ja raamatukogu koostamine.....	29
3.1.2 Plasmiidse DNA eraldamine.....	30
3.1.3 Inimese X kromosoomile vastava MAPH amplifitseeritavate proovide kogu valmistamine.....	30
3.1.4 Inimese X kromosoomi spetsiifiliste mikrokiipide valmistamine	32
3.1.5 Katsetes kasutatud genoomsed DNA-d	33
3.1.6 Analüüsitava DNA-ga filtrite valmistamine ja MAPH proovide hübriidisatsioon filtritele.....	34
3.1.7 MAPH proovide puhastamine ja märkimine.....	36
3.1.8 MAPH proovide hübriidisatsioon mikrokiibile.....	37
3.1.9 Mikrokiipide lugemine ja tulemuste analüüs	37
3.2 MK-MAPH ABIL LEITUD ABERRATSIOONIDE KINNITAMINE PCR-IL PÕHINEVATEL MEETODITEL	38
3.2.1 RT-qPCR.....	38
3.2.2 Lookusspetsiifiline PCR.....	39
3.3 KROMOSOOMI ABERRATSIOONIDE TUVASTAMINE JA MK-MAPH TULEMUSTE KINNITAMINE ILLUMINA BEADSTATION PLATVORMI ABIL	40
4 TULEMUSED	42
4.1 XP22.2 DUPLIKATSIOONI POOLT PÕHJUSTATUD S-VAM-GA PEREKONNA ANALÜÜS	42
4.2 KASVU PEETUSE JA TURNER'I SÜNDROOMI TUNNUSTEGA PATSIENDI A-2879 ANALÜÜS	43
4.3 1.5 MB DELETSSIOONI TUVASTAMINE PATSIENDIL 22467	44
4.4 KAHE EESTIST PÄRIT VAM-GA PEREKONNA ANALÜÜS	45
5 ARUTELU	46
5.1 MK-MAPH TULEMUSTE ANALÜÜS NING VÕRDLUS TEISTE MEETODITE ABIL SAADUD TULEMUSTEGA.....	46
5.2 MK-MAPH PLATVORMI KASUTAMINE DNA KOOPIAARVU MUUTUSTE TUVASTAMISEKS	49
5.3 MK-MAPH PROTOKOLLI MODIFITSEERIMINE	52
5.4 ILLUMINA BEADARRAY TEHNOLOOGIA KASUTAMINE DNA UURIMISEL	53
5.5 GENEETILISTEKS UURINGUTEKS KASUTATAVATE TEHNOLOOGIATE KOMBINEERIMINE	54
KOKKUVÕTE	56
SUMMARY.....	57
TÄNUAVALDUSED	58
KASUTATUD KIRJANDUS.....	59
AVALDATUD ARTIKLI ÄRATRÜKK	67
LISAD	

Sissejuhatus

Keerulise struktuuri tõttu on inimese genoom vastuvõtlik ümberkorralduste tekkimisele. Kirjanduse andmetel on hinnatud, et klassikaliste tsütogeneetiliste meetodite abil nähtavaid ümberkorraldusi esineb ~1% vastsündinutest. DNA koopiaarvu muutuste määramiseks kasutatavate tsütogeneetiliste meetodite kiire areng on näidanud submikroskoopiliste muutuste tähtsat rolli geneetiliste haiguste tekkimisel ning inimpopulatsiooni geneetiliselt varieeruvusel. Kromosomaalsed aberratsioonid on kõige olulisemad teadaolevad vaimse arengu mahajäämuse, kongenitaalsete anomaaliate, arengupeatuse, raseduse katkemise ja kasvajat tekke põhjused.

Vaimse arengu mahajäämus on kõige sagedasem raske puude põhjus lastel ja noortel, seda esineb umbes 3% üldpopulatsioonist. Vaimset alaarengut põhjustavad tegurid on väga heterogeensed. Üldiselt on näidatud, et ~15% teadmata etioloogiaga vaimse arengu mahajäämuse juhtudest võivad olla põhjustatud mikroleetsioonidest või -duplikatsioonidest. Siiski täpne põhjus on jäänud tuvastamata umbes 30% raske ja enamuse kerge vaimse arengu mahajäämuse juhtude puhul.

Mutatsioonid inimese X kromosoomil asuvates geenides vastutavad ebaproportsionaalselt suure osa vaimse alaarengu juhtude eest. Nendega seostatakse üle 10% kõigist vaimse arengu mahajäämuse juhtudest, ning seetõttu tunnevad selle vastu suurt huvi nii arstid kui ka geneetikud. See asjaolu tingis vajaduse välja arendada X kromosoomile spetsiifiline platvorm X-liitelise vaimse arengu mahajäämusega seotud DNA koopiaarvu muutuste detekteerimiseks. Sel eesmärgil töötati TÜ MRI Biotehnoloogia õppetoolis välja uus mikrokiibil põhinev *multiplex amplifiable probe hybridisation* meetod (MK-MAPH) kromosoomiaberratsioonide tuvastamiseks X kromosoomil teoreetilise lahutusvõimega ~300 kb.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli anda kirjandusel põhinev ülevaade X-liitelisest vaimse arengu mahajäämusest, samuti DNA koopiaarvu muutuste detekteerimiseks kasutatavatest meetoditest. Töö praktilise osa eesmärgiks oli uurida patsientide DNA proove submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks X kromosoomil, kasutades X kromosoomi spetsiifilist MK-MAPH meetodit. Leitud aberratsioonid kinnitati teiste meetodikate abil ning võimalusel leiti genotüüp-fenotüüp seosed.

Töö on teostatud Eesti Teadusfondi grant nr. 5467 „Uue DNA diagnostika tehnoloogia väljatöötamine inimese kromosoomide struktuursete aberratsioonide tuvastamiseks vaimse alaarengu korral“ (2003-2006) raames ja toel.

Lühendid ja mõisted

aa-dUTP	5-(3-aminoallüül)-2'-desoksüüridiin 5'-trifosfaat
bp	aluspaar (<i>basepair</i>)
BAC	bakteri kunstlik kromosoom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
cDNA	mRNA suhtes komplementaarne DNA
CI	usaldusvahemik (<i>confidence interval</i>)
CL	usaldusnivoo (<i>confidence level</i>)
CNV	koopiarvu variatsioon (<i>copy number variation</i>)
COT-1 DNA	konkurent DNA-na kasutatav DNA korduvjärjestuste fraktsioon
Cy3™	tsüaniinvärv 3 (GE Healthcare; Little Chalfont Buckinghamshire, UK)
Cy5™	tsüaniinvärv 5
ddH ₂ O	kahekordselt destilleeritud vesi
DMSO	dimetüülsulfoksiid
FISH	fluorestsents <i>in situ</i> hübridisatsioon
IQ	intelligentsuskvoot (<i>intelligence quotient</i>)
kb	tuhat aluspaari (<i>kilobase</i>)
KNGI	Küprose Neuroloogia ja Geneetika Instituut
LCR	madala koopiarvuga kordusjärjestus (<i>low copy repeat</i>)
MAPH	<i>multiplex amplifiable probe hybridisation</i>
Mb	miljon aluspaari (<i>megabase</i>)
MK-MAPH	mikrokiibil põhinev <i>multiplex amplifiable probe hybridisation</i>
MK-VGH	mikrokiibil põhinev võrdlev genoomne hübridisatsioon
MS-VAM	mittesündroomne X-liiteline vaimse arengu mahajäämus
S-VAM	sündroomne X-liiteline vaimse arengu mahajäämus
mRNA	matriits- ehk informatsiooniline RNA
Märklaud	käesolevas töös nimetatakse märklauaks mikrokiibi pinnale immobiliseeritud DNA fragmente
NAHR	mittealleelne homoloogne rekombinatsioon
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	kromosoomi lühike õlg

PAC	P1 vektoril baseeruv kunstlik kromosoom (<i>P1 artificial chromosome</i>)
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Proov	käesolevas töös nimetatakse prooviks genoomsele DNA-le või mikrokiibile hübridiseeritavaid DNA fragmente
q	kromosoomi pikk õlg
rpm	rootoripööret minutis
RT-qPCR	reaalaja kvantitatiivne PCR (<i>real time quantitative PCR</i>)
Spot	mikrokiibile prinditud märklaudjärjestus
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-boraat
U	ühik (<i>unit</i>)
VAM	vaimse arengu mahajäämus
VGH	võrdlev genoomne hübridisatsioon
XL-VAM	X-liiteline vaimse arengu mahajäämus

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 DNA koopiaarvu muutused haigete ja tervete inimeste genoomis

Tänu keerulisele struktuurile on inimese genoom vastuvõtlik ümberkorralduste tekkimisele (Lupski, 1998), mis omakorda võivad põhjustada mendeliaalsete haiguste või sündroomide teket, tõsta või vähendada vastuvõtlikkust kindlatele haigustele ning vastutada keeruliste tunnuste (nt. käitumise) välja kujunemise eest. Samal ajal sõltub nende fenotüübiline efekt sellest, kas nad mõjutavad doositundlikke geene või mitte (Lupski and Stankiewicz, 2005).

Teatud genoomsete regioonide ümberkorralduste aluseks on genoomis hajusalt ja tandeemselt paiknevate madala koopiaarvuga kordusjärjestuste (*LCR – low copy repeat*) vahel toimuv mittealleelne homoloogne rekombinatsioon (*nonallelic homologous recombination, NAHR*). Arvatakse, et *NAHR* on kõige levinum mehhanism inimese haiguste tekkeks (Stankiewicz and Lupski, 2002). *NAHR* „substraadid“ – *LCR*-id – võivad paikneda nii ühel ja samal kromosoomil kui ka erinevatel kromosoomidel. Sõltuvalt *LCR*-de asukohast ning orientatsioonist võivad *NAHR* protsessi tulemusena tekkida duplikatsioonid, deletsioonid või inversioonid (Lupski, 1998).

Kirjanduse andmetel on hinnatud, et klassikaliste tsütogeneetiliste meetodite abil nähtavad ümberkorraldused esinevad ~1% vastsündinutest (Kriek et al., 2004). Ümberkorraldused hõlmavad duplikatsioone, deletsioone, unikaalsete genoomsete segmentide inversioone, translokatsioone, marker kromosoome, isokromosoome ning teisi kompleksseid ümberkorraldusi (Lee and Lupski, 2006; Lupski, 1998).

Suur osa taolistest ümberkorraldustest toimub alades, kus muutused geneetilises doosis ei mõjuta inimese tervist. Samas leidub genoomis mitmeid doositundlikke lookusi, mille puhul korrektne koopiaarv on kriitiline indiviidi normaalseks arenguks. Nende poolt põhjustatud haiguste kliiniline fenotüüp tekib ümberkorraldatud regioonis leiduvate geenide ebanormaalse doosi tagajärjel (Lupski, 1998).

Kromosomaalsed aberratsioonid on peamised teadaolevad vaimse arengu mahajäämuse, kongenitaalsete anomaaliatega, arengupeetuse ja raseduse katkemise põhjused, lisaks on nad äärmiselt olulised tuumorogeneesis (McFadden and Friedman, 1997; Shaffer and Lupski, 2000).

Suurte deletsioonide ja duplikatsioonide esinemine inimese genoomis oli näidatud juba 1960-ndatel aastatel, kuid arvati et iga eraldi võetud aberratsiooni esinemissagedus üldpopulatsioonis on madal ning seetõttu seostati neid geneetiliste haigustega (Freeman et al., 2006). 1990-ndate aastate lõpus ilmusid esimesed andmed selle kohta, et spetsiifiliste

deletsioonide/duplikatsioonide esinemine genoomis ei ole tingimata seotud haiguse tekkega. Näiteks selgus, et kromosoomil 22q13 paiknev 276 bp-pikkune deletsioon, mida algselt seostati munasarja vähiga, esines ka tervetel indiviididel (Lin et al., 2000).

Tehnoloogiate areng võimaldas läbi viia mitte ainult lookusspetsiifilisi vaid ka kogu genoomi uuringuid ning 2004. a. kaks sõltumatut gruppi kirjeldasid DNA koopiaarvu variatsioonide (*copy number variations, CNVs*) esinemist fenotüübiliselt normaalsetel inimestel (Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004). *CNV* defineeritakse kui ≥ 1 kb DNA järjestusi, mille koopiaarv on muutunud võrreldes üldpopulatsiooniga (Redon et al., 2006). Kasutades mikrokiibil põhineva võrdleva genoomse hübriidsatsiooni (MK-VGH) analüüsi leiti keskmiselt 11 *CNV* (Sebat et al., 2004) või 12,4 *CNV* (Iafrate et al., 2004) indiviidi kohta. Uuritavate indiviidide väikse arvu ja kasutatud MK-VGH platvormide madala lahutusvõime tõttu ilmselt alahinnati *CNV*-de tõelist arvu inimesel (Buckley et al., 2005).

2006. a. novembris avaldati esimene inimese genoomi *CNV*-de kaart. Analüüsid 270 indiviidi neljast populatsioonist identifitseeriti 1447 erinevat kogu genoomist ~12% katvat *CNV* regiooni, mis sisaldavad gene, funktsionaalseid elemente ning haigustega seotud lookusi. 43% *CNV*-dest esinesid rohkem kui ühel indiviidil (Redon et al., 2006).

CNV-de paiknemine *LCR*-ide lähedal annab alust arvata, et nende tekke mehhanismiks on geneetiliste haigustega seotud ümberkorralduste eest vastutav *NAHR* (Redon et al., 2006; Sharp et al., 2005). *LCR*-dega mitteseotud *CNV*-d võiksid olla tekkinud homoloogial mittepõhineva mehhanismi tõttu. Näiteks osa *CNV*-dest on assotsieerunud DNA ümberkorralduste teket soodustavate mitte- β DNA struktuuridega (Freeman et al., 2006).

CNV-de fenotüübiline efekt võib avalduda geenidoosi või geeni ekspressiooni muutmise kaudu (Feuk et al., 2006). Üldiselt on näidatud, et enamasti paiknevad *CNV*-d väljaspool gene ja konserveerunud elemente, mis eeldab tugeva selektsiooni esinemist (Redon et al., 2006). Samas võivad tänaseks kirjeldatud *CNV*-d mõjutada väliskeskkonnaga interaktsioonide eest vastutavaid gene ning seega võivad inimeste vastused samale keskkonna signaalile erineda. (Feuk et al., 2006; Sebat et al., 2004). Mõnede *CNV*-de fenotüüpiline efekt võib avalduda ainult kindlas koes või kindlas arengustaadiumis (Freeman et al., 2006). Kokkuvõtteks võib öelda, et *CNV*-d on üheks geneetilise varieeruvuse vormiks, mis võib vastutada fenotüübi erinevuste eest tervetel inimestel.

1.2 X-liitelise vaimse arengu mahajäämuse geneetika

1.2.1 Vaimse arengu mahajäämuse mõiste ja põhjused

Vaimse arengu mahajäämus (VAM) on kõige sagedasemaks raske puude põhjuseks lastel ja noortel (Chelly and Mandel, 2001). Samuti on see üks sagedamini esinevaid põhjusi pediatriline, laste-neuroloogi ja kliinilise geneetiku konsultatsioonile pöördumiseks. Samas jääb tänapäeval enamikul juhtudel VAM põhjus välja selgitamata.

VAM-st defineeritakse kui keskmisest madalamat intellektuaalset võimekust (A kriteerium), millele lisanduvad kohanemishäired vähemalt kahe järgmise oskuse puhul: kommunikatsioon, hügieen, praktilised kodused toimetused, nõrgenenud sotsiaalne kohanemisvõime, akadeemilised oskused, töö tegemine, vaba aja veetmine, tervise ja turvalisuse tagamine (B kriteerium). Arengu mahajäämus peab avalduma enne 18-ndat eluaastat (C kriteerium) (Castellvi-Bel and Mila, 2001; Chelly and Mandel, 2001; Kleefstra and Hamel, 2005; Raymond, 2006).

Intellektuaalne võimekus on defineeritud intelligentsuskvoodi (*IQ*) kaudu, mida määratakse standartiseeritud vanusest-sõltuvate testide abil. Keskmise *IQ* väärtus populatsioonis on 100 ning *IQ* alla 70 on klassifitseeritud vaimse arengu mahajäämuseks (Chelly and Mandel, 2001; Kleefstra and Hamel, 2005). Vastavalt *IQ* väärtusele jagatakse VAM-st kergeks (*IQ* 50-69), mõõdukaks (*IQ* 35-49), raskeks (*IQ* 20-34) ja sügavaks (<20) (Gecz and Mulley, 2000; Raymond, 2006).

Keskmiselt esineb industriaalriikides VAM sagedusega 2-3% üldpopulatsioonist. (Frints et al., 2002). Erinevates töödes esinemissagedus varieerub 1-st 10%-ni, vastavalt uuringus kasutatud VAM definitsioonile, diagnostika meetodikale ja uuritavale populatsioonile (Greydanus and Pratt, 2005; Rauch et al., 2006; Ropers and Hamel, 2005). Leidub vähe selliseid kliinilisi seisundeid, mis mõjutavad nii suurt hulka lapsi ja noori inimesi ning mille vastu efektiivset ravimit veel ei ole. Üheks oluliseks põhjuseks, miks praegu ravi puudub, on piiratud arusaamine VAM-e molekulaarsetest alustest (Inlow and Restifo, 2004).

VAM mõjutab ka terveid inimesi, kes peavad hoolitsema oma haigete perekonnaliikmete eest ning seetõttu võivad tihti tunda puudust isiklikust vabadusest. Lisaks kardavad paljud perekonnad, kuhu on eelnevalt sündinud haige laps, edaspidi lapsi planeerida, kuni selle ajani kui madal kordusrisk on kindlaks tehtud või on võimalik täpne prenataalne testimine (Rauch et al., 2006). Sõltumata põhjustavatest teguritest on hinnatud isoleeritud VAM-e kordusriski ~8,4%. Kui perekonnas on esimene laps kerge VAM-ga, siis kordusrisk kerge ja raske VAM puhul on

vastavalt 7,1% ja 4,7% (Raymond, 2006). Siin on oluline lisada, et VAM avaldab mõju mitte ainult patsiendile ja tema perele, vaid ka ühiskonnale. Näiteks kulutatakse Kesk-Euroopas ~8% kogu tervishoiu rahast VAM-iga inimeste ülalpidamiseks (Ropers and Hamel, 2005).

Täpse diagnoosi panemine VAM-e puhul on raskendatud, kuna arengu mahajäämust põhjustavate tegurite spekter on väga lai. Täpset põhjust on võimalik detekteerida kuni 65% raske VAM-e juhtudest, samal ajal jäävad kuni 80% kerge VAM-ga patsiendid diagnoosita (Inlow and Restifo, 2004; Rauch et al., 2006). Kuigi vaimse arengu mahajäämuse etioloogia tundmine ei võimalda tavaliselt patsienti ravida, aitab see siiski haigusega leppida. Lisaks on see kasulik teiste perekondadega ja toetusgruppidega sidemete loomiseks. Tavaliselt annab diagnoosi panek ka olulist pikaajalist emotsionaalset kergendust haige lapse vanematele (Rauch et al., 2006).

Kahes viimasel ajal ilmunud töös väidetakse, et mõned õppimise ja mälu häired võivad siiski alluda terapeutilistele ainetele. Esimese töö autorid näitasid, et Fragiilse X sündroomi *Drosophila* mudeli lühiajalist mälu ja kesknärvisüsteemi normaalset tööd võib taastada rakendades ravi liitiumi või metabotroopse glutamaadi retseptori antagonistiga (McBride et al., 2005). Teises töös on kirjeldatud Neurofibromatoosi tüüp 1 hiiremudeli ravi HMG-CoA reduktaasi (*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*) inhibiitoriga, mille tagajärjel paranes looma õppimisoskus ja mälu (Li et al., 2005). Need tulemused annavad lootust, et vähemalt osa VAM-e juhtumitest muutub kunagi ravitavaks (Ropers, 2006).

Nagu oli juba mainitud VAM-e põhjused on väga heterogeensed. On teada mitu mitte-geneetilist faktorit, mis põhjustavad ajukahjustust prenataalses või varases imikueas. Nende seas on infektsioonhaigused (nagu tsütomegaloviirus, rasedusaegne infektsioonhaigus ja postnataalne meningiit), sügav enneaegsus, prenataalne hapniku puudus ja fetaalne alkoholisündroom, mis on tingitud ema rasedusaegsest alkoholi tarvitamisest (Chelly and Mandel, 2001).

VAM geneetilisteks põhjusteks võivad olla ühelt poolt kromosomaalsed anomaaliad (aneuploidiad, genoomsed ümberkorraldused) ning teiselt poolt monogeensed haigused (Chelly and Mandel, 2001; Mandel and Chelly, 2004). Geneetilised põhjused vastutavad 20-25% raske ning 5-10% kerge VAM-e eest (Frints et al., 2002).

Tänaseks on identifitseeritud 1407 väga varieeruva kliinilise pildiga monogeenset haigust (*OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>, mai 2007, märksõna „*mental retardation*”), mille puhul VAM on ainsaks või üheks peamiseks kliiniliseks tunnuseks. Nende seas on näiteks metaboolsed häired (nt. fenüülketonuuria), närvisüsteemi arenguhäired (nt. Dandy-Walker-i sündroom) ja neuromuskulaarsed häired (nt. Duchenne'i lihasdüstroofia).

Osa VAM juhtudest on tingitud autosoomide või gonosoomide aneuploidias. Näiteks trisoomia 21 ehk Down'i sündroom, mis esineb umbes ühel 700-st vastsündinul, on kõige sagedasemaks vaimse arengu peetuse geneetiliseks põhjuseks, moodustades 9,2% VAM juhtudest (Greydanus and Pratt, 2005; Rauch et al., 2006).

Kromosomaalsed ümberkorraldused vastutavad üsna suure osa VAM juhtude eest (Rauch et al., 2006). Uuringud näitavad, et ümberkorraldused autosoomide telomeersetes regioonides, mis ei ole detekteeritavad tavapärase tsütogeneetiliste meetoditega, võivad põhjustada arenguhäireid ~7% mõõduka kuni raske VAM puhul (Knight et al., 1999). Üldiselt on näidatud, et ~10% VAM-ga patsientidest on deletsioonide või duplikatsioonide kandjad (Raymond and Tarpey, 2006).

On tõestatud, et keskkonna ja geneetilised tegurid mõjutavad indiviidi IQ-d. Üldiselt arvatakse, et kerge VAM on enamasti seotud sotsiaalsete ja keskkonna teguritega, vastupidi raske VAM põhjusteks on enamasti geneetilised faktorid. Kuigi Croen'i jt. poolt läbiviidud populatsiooniuringu põhjal võib öelda, et sotsiaalmajanduslikud tegurid võivad mängida rolli ka mõnedel raske VAM juhtudel (Croen et al., 2001). Selle uuringu käigus selgus, et nii kerge kui ka raske VAM riskifaktoriteks on meessugu, madal sünnikaal (<2500 g), lisaks suureneb risk vastavalt ema haridustaseme vähenemise ja ema vanuse suurenemisega. Kerge VAM riskifaktoriteks on ka mitmiksünd ja korduvrasedus, mis ei mängi rolli raske VAM puhul (Rauch et al., 2006).

Viimastel aastatel välja töötatud ja kasutusele võetud FISH-il, PCR-il ja mikrokiipidel põhinevad meetodid aitavad detekteerida VAM-ga seotud kromosomaalseid anomaaliaid geeni-rikastes subtelomeersetes regioonides (Flint and Knight, 2003; Rooms et al., 2005), üle kogu genoomi (Shaw-Smith et al., 2004; Vissers et al., 2003) ning ka X kromosoomil X-liitelise vaimse arengu mahajäämuse puhul (Bauters et al., 2005).

1.2.2 X-liiteline vaimse arengu mahajäämus

X-liiteliseks (XL-VAM) nimetatakse vaimse arengu mahajäämust, mis allub X-liitelise pärandumise reeglitele, mille põhiprintsiibid on järgmised: 1) X-liitelised geenid ei pärandu isalt pojale; 2) mehed on hemisügootsed X-liiteliste geenide suhtes ning neil avalduvad muteerunud geenid. X-liitelise dominantse pärandumise korral on kõik haige mehe ja terve naise tütreid haiged ning pojad terved; haige naise ja terve mehe järglastest 50% on haiged ja 50% terved olenemata soost; haigustunnused esinevad meestel tavaliselt raskemal kujul kui naistel; naised on 2 korda sagedamini mõjutatud kui mehed. X-liitelise retsessiivse pärandumise korral on haigete hulgas

rohkem mehi kui naisi; haige mees saab geeni oma emalt ja tema tütreid on kõik kandjad; heterosügootse naise poegadest 50% on haiged; haigus pärandub haigelt vanaisalt 50%-le tütrepoegadest.

XL-VAM esineb sagedusega 2,6 juhtumit 1000 vastsündinute kohta, mis moodustub üle 10% kõikidest VAM juhtudest (Stevenson and Schwartz, 2002). Lähtudes antud sagedusest ning analüüsides *OMIM* andmebaasis olevaid vaimse arengu mahajäämusega seotud kirjeid pakub osa autoreid, et võrreldes autosoomsete kromosoomidega esineb X kromosoomil ebaproportsionaalselt palju intelligentsuse kujunemise eest vastutavaid geene, mis muteerununa põhjustavad vaimse arengu peetust (Zechner et al., 2001). Samal ajal väidavad oponendid, et seletuseks on XL-VAM suguvõsade sagedasem esinemine ja kergem identifitseerimine (Inlow and Restifo, 2004; Stevenson and Schwartz, 2002).

1.2.2.1 Ajalugu

Vaimselt alaarenenud meeste ülekaalu naiste üle, ligilähedase suhtega 1.3:1 meeste ja naiste vahel VAM populatsioonis, märgati juba 19. saj. lõpus. Seda ülekaalu ei seostatud esialgu X-liiteliste geenidega. Esimeseks seletuseks pakuti sellele meeste suuremat pea suurust, mis võib viia poistel sagedamini esinevatele traumadele mängu ja töö ajal (Partington et al., 2000). Hiljem seostati seda sotsiaalsete eelarvamustega, mille tõttu haigeid tüdrukuid hoiti hoolekandeesutuste asemel kodus ning seetõttu nende esinemissagedust ei olnud võimalik hinnata.

1960-1970-ndate aastate lõpus hakkas suurenema selgelt XL-VAM-ga perekondi kirjeldavate aruannete arv, millest tol ajal järeldati, et ~25-50% kogu VAM-st on põhjustatud X-liitelistest geenidest (Neri and Opitz, 2000). Fragiilse X sündroomi identifitseerimine eraldi kliinilise seisundina oli väga oluline. Huvi selle vastu aitas kirjeldada teisi sündroomseid X-liitelisi vaimse arengu mahajäämuse (S-VAM) juhtumeid ning ka suuri suguvõsasisid, kus vaimse arengu peetusega ei kaasnenud spetsiifilisi kliinilisi tunnuseid.

Võib öelda, et 1970-ndate aastate lõpuks oli XL-VAM juba eraldi uurimisvaldkonnaks meditsiinilises geneetikas. Selle esinemissagedus oli ümber hinnatud: ~20-25% VAM-st meestel arvatakse olevat põhjustatud defektidest X-liitelistes geenides (Frints et al., 2002). Kuid uuemad uuringud näitavad, et see arv võib tegelikult olla veelgi väiksem (~10%). Seega võivad autosoomsed faktorid mängida suuremat rolli VAM tekkimisel kui seni arvati (Mandel and Chelly, 2004; Ropers, 2006). Hinnatud protsent on siiski palju väiksem kui võiks oletada toetudes kirjanduses dokumenteeritud VAM-ga meeste ülekaalule. Ligikaudne suhe meeste ja naiste vahel VAM populatsioonis on vastavalt 1.4:1 raske ja 1.9:1 kerge vaimse arengu peetuse puhul. Siit

tulenevalt võib öelda, et VAM-ga meeste ülekaal ei ole tõenäoliselt täielikult seotud X-liiteliste geenide mutatsioonidega (Ropers and Hamel, 2005).

Praegu pakutakse ka rida teisi tegureid, mis võiksid põhjustada VAM-ga meeste ülekaalu lisaks defektidele X-liitelistes geenides. Nende hulgas nimetatakse soolisi erinevusi loote aju arengus, mis põhjustavad meessoost vastsündinute aju suuremat vastuvõtlikkust kahjustustele. Lisaks oletatakse polümorfismide esinemist X kromosoomil, mis võivad soodustada kuid otseselt ei põhjusta VAM-st. Need alleelid võivad olla VAM põhjuseks ainult juhul kui nad on assotsieerunud soodsate geneetiliste kombinatsioonidega või keskkonna faktoritega (Mandel and Chelly, 2004). Seda tüüpi alleelsed variandid, mis mõjutavad intellektuaalset võimekust kaudselt või suurendavad VAM riski võivad leiduda nii XL-VAM-ga seotud kui ka mitteseotud geenides (Ropers and Hamel, 2005).

Peale *OPHNI (Oligophrenin 1)* geeni kloonimist 1998. a. (Billuart et al., 1998) hakkati tegema jõupingutusi XL-VAM-e molekulaarsete põhjuste välja selgitamiseks. Suured XL-VAM perekonnad on olnud võtmeks püstitatud ülesande lahendamisel ning on tänaseks aidanud identifitseerida üle 60 XL-VAM-ga seotud geeni. XL-VAM geenide identifitseerimist ja funktsioonide kirjeldamist soodustab rahvusvahelise konsortsiumi tegevus. 1995. a. asutatud Euroopa XL-VAM konsortsium on tänaseks kogunud 350 kindlaks määratud või võimalikku XL-VAM perekonda, kirjeldanud üle 200 XL-VAM seisundi ja klooninud üle 60 geeni. Informatsiooni konsortsiumi tegevuse ja tulemuste kohta võib leida nende kodulehekülgedelt: <http://www.euomrx.com/> ja <http://xlmr.interfree.it/home.htm>.

1.2.2.2 XL-VAM alamklassifikatsioon

XL-VAM-st jaotatakse sündroomseks (S-VAM) ja mitte-sündroomseks ehk mittespetsiifiliseks (MS-VAM), vastavalt sellele kas VAM-le lisandub kliinilises pildis ka muid muutusi (mikroanomaaliad ja/või väärarengud). Umbes kaks kolmandikku XL-VAM juhtudest on mitte-sündroomsed (Ropers and Hamel, 2005).

Väga üllatavaks avastuseks teadlastele oli, et mutatsioonid ühes ja samas geenis võivad põhjustada nii S-VAM-st kui ka MS-VAM-st (Nokelainen and Flint, 2002). Seega tegelikult puudub molekulaarne alus nende kahe vormi rangeks lahutamiseks. Näiteks mutatsioonid *ARX (aristaless related homeobox)* geenis on seotud väga laia kliiniliste tunnuste spektriga, mis varieerub mittesündroomsest VAM-st erinevate sündroomsete vormideni. Sellel juhul on tegemist näitega XL-VAM puhul esinevast nn. sündroomide kokkupanekust (*syndrome lumping*), mille korral erinevate sündroomidena kirjeldatud haigused on põhjustatud sama geeni

mutatsioonide poolt. Samuti on leitud vastupidine olukord – *syndrome splitting* – mille puhul üheks haiguseks peetud juhtude eest vastutavad erinevate geenide mutatsioonid (Chelly and Mandel, 2001). Kuidas see on võimalik pole päris selge, kuid arvatakse, et defekti fenotüübilist avaldumist võivad mõjutada erinevused geneetilises taustas.

1.2.2.3 XL-VAM-ga seotud geenid

Ligikaudu 4% kõigist ENSEMBL-isse (<http://www.ensembl.org>) kantud valke kodeerivatest geenidest paiknevad X kromosoomil. Nendest ~40% ekspresseerub ajus. Seega arvatakse, et mitusada geeni võivad olla seotud XL-VAM-ga, kuigi tänaseks on õnnestunud identifitseerida vaid 61 (Ropers, 2006). Samas viimase 1.5 aasta jooksul ei ole kasvanud enam tuvastatavate VAM-ga seotud X-liiteliste geenide arv eksponentsiaalselt vaatamata tehnoloogiate arengule. Sellele võib olla kaks seletust: esiteks on võimalik, et enamus geene on juba leitud, teiseks ja rohkem tõenäoliseks on see, et mutatsioonid seni detekteerimata jäänud geenides on niivõrd harvaesinevad, et neid geene on raske identifitseerida (Raymond and Tarpey, 2006).

FMRI (*fragile X mental retardation 1*) (Xq27.3) geeni defektid on kõige sagedamini esinevad mutatsioonid XL-VAM populatsioonis (Ropers, 2006). *FMRI* inaktivatsioon, mis on tingitud *FMRI* geenis paiknevate trinukleotiidsete (CGG) korduste arvu suurenemisest, põhjustab fragiilse X sündroomi (*MIM* 309550), mis on kõige sagedasem pärilikku vaimse arengu peetuse põhjus, esinedes ~2-3% VAM-ga meestest ning ~1% naistest (Chelly and Mandel, 2001).

Mutatsioonid *ARX* geenis on sageduselt teisel kohal. Defektid *ARX* geenis leiti 10% suurtes MS-VAM suguvõsades (<http://xlmr.interfree.it/home.htm>), kuigi teistes enamasti väikestest perekondadest koosnevatest kohortides detekteeritud *ARX* geeni mutatsiooni esinemissagedused olid oluliselt väiksemad (Ropers, 2006).

Suhteliselt sagedased XL-VAM tekke eest vastutavad mutatsioonid on leitud ka geenides *JARIDIC*, *SLC6A8*, *MECP2*, *ILIRAPL* ja *PQBPI* (Ropers, 2006).

On oluline märkida, et Euroopa XL-VAM konsortsiumi poolt kogutud perekondades on 10% mutatsioonidest üsna suured, BAC kloonide põhineval MK-VGH katseplatvormi abil detekteeritavad, deletsioonid ja duplikatsioonid. Oletatakse, et tsütogeneetiliste meetodite poolt nähtavad genoomsed ümberkorraldused esinevad sagedamini S-VAM patsientidel (Ropers, 2006).

1.2.2.3.1 S-VAM-ga seotud geenid

XL-VAM sündroomse vormi puhul kaasneb VAM-ga vastavale sündroomile iseloomulik kliiniliselt äratuntav füüsiliste ja/või neuroloogiliste tunnuste muster (Frints et al., 2002).

Arvatakse, et geenid, mille mutatsioonid põhjustavad S-VAM-e teket, ei ole otseselt seotud inimese intellektuaalse võimekuse arenguga ning õppimisoskusega (Chelly, 1999). Täna on kirjeldatud üle 140 XL-VAM-e sündroomset vormi ning nendega seotud genee on identifitseeritud 46, millest 10 võivad olla muteerunud ka MS-VAM-e puhul (Ropers, 2006; Ropers and Hamel, 2005). Paljud nendest geenidest omavad kriitilist rolli varajastes arenguprotsessides või reguleerivad teiste geenide funktsiooni. Seega mutatsioonid S-VAM-ga seotud geenides võivad viia mitmete teiste geenide funktsiooni rikkumisele, mis omakorda seletab sündroomide keerulist fenotüüpi (Chelly, 1999).

1.2.2.3.2 MS-VAM-ga seotud geenid

MS-VAM-st defineeritakse kui mitteprogresseeruvat geneetiliselt heterogeenset seisundit mis mõjutab kognitiivset võimekust ilma iseloomulike düsmorfoloogiliste, metaboolsete või neuroloogiliste tunnusteta. MS-VAM esineb meestel sagedusega ~0.9-1.4/1000 kohta (Gecz and Mulley, 2000). MS-VAM on olnud tähelepanu keskpunktiks, kuna arvati, et puhtalt käitumist mõjutavad geenid võivad anda olulist teavet kognitsiooni molekulaarsetest alustest arusaamiseks (Toniolo, 2000).

Geneetilise heterogeensuse tõttu on MS-VAM-e molekulaarsete põhjuste otsing olnud keeruline. Oluline progress MS-VAM geenide tuvastamises on toimunud viimastel aastatel tänu genoomi analüüsi edenemisele ning intensiivsele rahvusvahelisele koostööle. MS-VAM perekondade aheldusanalüüsil leitud MS-VAM geenid on muteerunud tavaliselt vähestes perekondades ja erinevate MS-VAM geenide arvuks on hinnatud 30-50 kuni 100 (Mandel and Chelly, 2004; Ropers et al., 2003). Kuigi MS-VAM-e üldsagedus populatsioonis on kõrgem kui kõige sagedasema päriliku VAM-e vormi – fragiilse X sündroomi – sagedus, on iga eraldi tuntud MS-VAM geeni esinemissagedus väga väike - $\leq 1\%$ kogu VAM populatsioonist (Frints et al., 2002).

Praeguseks on identifitseeritud 25 MS-VAM geeni, millest 10 on seotud ka XL-VAM-e sündroomsete vormidega (Ropers, 2006). Tänapäeval ei ole veel teada, miks mutatsioonid ühes ja samas geenis võivad ühel juhul põhjustada MS-VAM-e teket ning teisel viia sündroomi kujunemisele. Ilmselt siinkohal mängib rolli mutatsiooni tüüp ja ka näiteks patsiendi üldgeneetiline taust (Renieri et al., 2005).

Tabel 1. MS-VAM geenid. Tabel põhineb Ropers' i poolt avaldatud artiklil (Ropers, 2006), Euroopa XL-VAM konsortsiumi ning NCBI andmebaasi andmetel seisuga aprill 2007.

Geeni nimi	Geeni sümbol	Lookus	Kirjeldus	Viited
Aktiin tsütoskeleti dünaamika regulatsioonis ning neuronaaelses morfogeneesis osalevaid valke kodeerivad MS-VAM geenid				
<i>Oligophrenin 1</i>	OPHN1*	Xq12	Aktiin tsütoskeleti dünaamika regulatsioonis ja neuronaaelses morfogeneesis osalev <i>RhoGAP</i>	(Billuart et al., 1998)
<i>P21 (CDKN1A)-activated kinase</i>	PAK3	Xq23	Aktiin tsütoskeleti dünaamika regulatsioonis ja neuronaaelses morfogeneesis osalev <i>Rac/Cdc42</i> efektor	(Allen et al., 1998)
<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 6</i>	ARHGEF6	Xq26.3	Integriinvahendatud signaalrajad, Rho GTPaaside <i>Rac1/Cdc41</i> regulatsioon	(Kutsche et al., 2000)
<i>Facio-genital dysplasia 1</i>	FGD1*	Xp11.2	Cdc42 guaniin-nukleotiidi vahetusfaktor, Aktiin tsütoskeleti dünaamika regulatsioonis osalev efektor	(Lebel et al., 2002)
<i>Transmembrane 4 superfamily member 2</i>	TM4SF2	Xp11.4	Integriinidega interakteeruv tetraspaniin, võimalik osalemine sünapsite moodustumises ja plastilisuses	(Zemni et al., 2000)
<i>Angiotensin II receptor, type 2</i>	AGTR2	Xq23	Närvirakkude diferentseerimine, ioonide sisse- ja väljavool, aksonite regenereerimine, apoptoos	(Allen et al., 1998; Vervoort et al., 2002)
<i>Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9</i>	ARHGEF9	Xq11.1	Glütsiini ja GABA(A) retseptorite klastrite formeerumine	(Ropers, 2006)
Sünapsite moodustumise ja plastilisuse eest vastutavaid valke kodeerivad MS-VAM geenid				
<i>Neurologin 4</i>	NLGN4*	Xp22.3	Neuronite rakupinnavalk, sünapsite areng	(Laumonnier et al., 2004)
<i>Disc, large homolog 3</i>	DLG3	Xq13.1	Sünaptiline plastilisus	(Tarpey et al., 2004)
<i>GDP-dissociation inhibitor 1</i>	GDI1	Xq28	Sünaptiliste vesiikulite fusioonis ning neuronaaelses morfogeneesis osalev <i>Rab GDP</i> -dissotsiatsiooni inhibiitor	(D'Adamo et al., 1998)
<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3</i>	GRIA3	X	Kiire sünaptiline signaali ülekande keskne süsteem	(Ropers, 2006)
<i>Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1</i>	ILIRAPL1	Xp21.2	Võimalik neurotransmitterite vabastamise modulaator	(Carrie et al., 1999)
Kromatiini remodelleerumisel ja/või geenide ekspressiooni kontrollis osalevaid valke kodeerivad MS-VAM geenid				
<i>Aristaless related homeobox</i>	ARX*	Xp22.1	Transkriptsiooni faktor	(Bienvenu et al., 2002; Stromme et al., 2002)
<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>	RSK2*	Xp22.1	Seriin/treoniin kinaas, kromatiini remodelleerumine	(Merienne et al., 1999)
<i>Methyl CpG-binding protein 2</i>	MECP2*	Xq28	Kromatiini remodelleerumine ja geenide vaigistamine	(Meloni et al., 2000)
<i>α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>	ATRX/XNP*	Xq13.3	Kromatiini remodelleerumine, ATPaas/helikaas	(Yntema et al., 2002)
<i>Jumonji AT-rich interactive domain 1C</i>	JARID1C/SMCX*	Xp11.22	Kromatiini remodelleerumine ja transkriptsiooni reguleerimine	(Jensen et al., 2005)
<i>Fragile X mental retardation 2</i>	FMR2	Xq28	Võimalik transkriptsiooni faktor	(Gez et al., 1996; Gu et al., 1996)
<i>Zinc finger protein 41</i>	ZNF41	Xp11.3	Transkriptsioonifaktor, kromatiini remodelleerumine	(Shoichet et al., 2003)
<i>Zinc finger protein 81</i>	ZNF81	Xp11.23	Transkriptsioonifaktor	(Kleefstra et al., 2004)
<i>Zinc finger protein 674</i>	ZNF674	X	Pole täpselt teada	(Lugtenberg et al., 2006)
Teised MS-VAM geenid				
<i>Polyglutamine binding protein 1</i>	PQBPI*	Xp11.23	mRNA splaising	(Kalscheuer et al., 2003)
<i>FtsJ homolog 1</i>	FTSJI	Xp11.23	rRNA protsessing ja modifikatsioon, translatsiooni regulatsioon	(Freude et al., 2004)
<i>Solute carrier family 6, member 8</i>	SLC6A8*	Xq28	Kreatiini transporter	(Hahn et al., 2002)
<i>Fatty acid coenzyme A ligase 4</i>	FACLA	Xq23	Vesiikulite transport, membraanifusioon, geeniekspressioon	(Meloni et al., 2002)

* - geenid, mis on seotud nii sündroomse kui ka mitesündroomse XL-VAM-ga

Ropers kaasautoritega jõudsid järeldusele, et geenid mille mutatsioonid põhjustavad MS-VAM-st ei ole jaotunud ühtlaselt üle X kromosoomi. Nad leidsid, et MS-VAM-e eest vastutavate geenide arv on kõrgem X kromosoomil kolmes regioonis (Ropers et al., 2003). Esiteks telomeerse ala lähedale jäävas piirkonnas Xq28 on leitud geenid *FMR2*, *GDII*, *MECP2* ja *SLC6A8*. Teiseks regiooniks on Xp22.1-p21.3.1, kuhu jäävad geenid *ARX* ja *ILIRAPLI*. Kolmandaks on Xq23-Xq26. Sinna lokaliseeruvad geenid *PAK3*, *ARHGEF6*, *FACLA* ja *AGTR2*.

Arvatakse, et MS-VAM geenid kodeerivad üldiselt spetsiifilisema funktsiooniga valke, võrreldes S-VAM geenide produktidega (Chiurazzi et al., 2004). Tänaseks identifitseeritud MS-VAM gene võib jaotada mitmeks alagrupiks nende produktide funktsioonide alusel (Renieri et al., 2005).

Ülevaade praeguseks identifitseeritud MS-VAM geenidest ja nende kuuluvus erinevatesse alagrupidesse on toodud tabelis 1.

1.3 DNA koopiaarvu muutuste detekteerimismeetodid

Arvulised või struktuursed kromosoomanomaaliad on detekteeritavad ~1% vastsündinutest. Nendest pooltel põhjustavad genoomsed ümberkorraldused ebanormaalsel fenotüüpi (Sharkey et al., 2005). Nagu juba eelnevalt sai mainitud on kromosomaalsed aberratsioonid olulised vaimse arengu mahajäämuse, kaassündinud anomaaliate, arengupeetuse ja spontaansete abortide põhjused (McFadden and Friedman, 1997; Sharkey et al., 2005). Kiire ja täpne aberratsioonide tuvastamine on vajalik geneetiliseks nõustamiseks ning õige diagnoosi püstitamiseks. Viimastel aastatel toimunud tehnoloogiate areng ning nimese genoomi sekveneerimise lõpetamine võimaldas detekteerida muutused mitte ainult kromosoomide arvus vaid ka nende struktuuris suure lahutusvõimega.

1.3.1 Klassikalised tsütogeneetilised meetodid

Kliinilises praktikas kasutatakse rutiinselt muutuste detekteerimiseks erinevaid kromosoomide värvimise meetodeid. 1970-ndatel aastatel välja töödatud ning kasutusele võetud diferentsiaalvärvimise tehnikad (*banding*) võimaldasid näha valgusmikroskoobis igale metafaasi kromosoomile iseloomulikku heledatest ja tumedatest vöötidest mustrit (Caspersson et al., 1970), identifitseerida terveid kromosome ning lisaks muutustele kromosoomide arvus tuvastada ka suuremaid muutusi nende struktuuris - deletsioone, amplifikatsioone, inversioone ning translokatsioone (McNeil and Ried, 2000; Salman et al., 2004).

Kromosoomide diferentsiaalvärvimist võib kasutada mitte ainult patsientide, vaid ka fenotüübilt normaalsete indiviidide, kes võivad tegelikult kanda tasakaalustatud aberratsioone,

uurimiseks. Seega on terved indiviidid perekondadest, kus on teada kromosoomi anomaalia kandjad, ning paarid, kellel on esinenud korduvaid spontaanaborte, nüüd tsütogeneetiliste uuringute objektideks (Smeets, 2004).

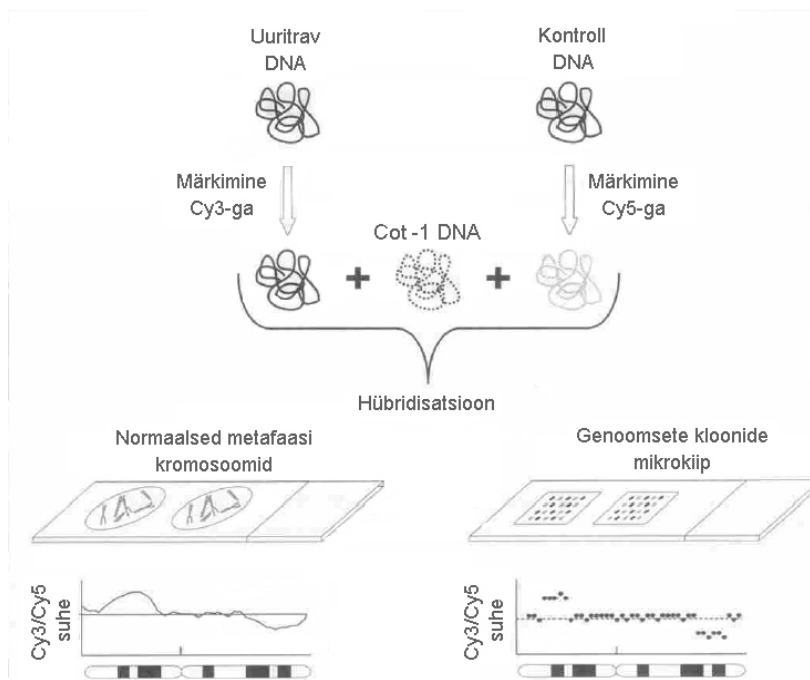
Nende tehnikate puhul on piiravaks teguriks aktiivselt jagunevate rakkude kasutamine, mis teeb analüüsi töömahukaks ning aeganõudvaks protsessiks. Lisaks on puuduseks meetoodika üsna madal lahutusvõime (tavaline metafaasi kromosoomide vöödistus lubab näha 400-600 vööti, prometafaasi vöödistus – 800-1000 vööti, mis vastab ca 2-10 Mb-le). Vaatamata esinevatele puudustele jääb kromosoomide vöödistus siiski üheks enim kasutatavaks meetodiks rutiinses kliinilises praktikas kromosoomianomaaliade detekteerimiseks ning esmase diagnoosi püstitamiseks (Salman et al., 2004).

Sageli kasutatakse nimetatud tehnikat koos molekulaarse tsütogeneetilise analüüsiga, näiteks fluorestsents *in situ* hübriidisatsiooniga (FISH) (Langer-Safer et al., 1982), diagnoosi kinnitamiseks või mikromuutuste tuvastamiseks (McNeil and Ried, 2000). FISH-i puhul hübriidiseeritakse metafaasi või interfaasi kromosoomidele spetsiifilisi fluoresteeruvalt märgistatud proove ning sellele järgneb analüüs mikroskoobi all. FISH proovid on väga spetsiifilised ning sõltuvalt märklaudjärjestusest võib neid jagada unikaalse DNA, korduvjärjestuste ja kromosoomi-spetsiifilisteks proovideks. Meetodi lahutusvõime sõltub kasutatavate proovide pikkusest ning preparaadi valmistamise meetodist. FISH-i kasutamine teadustöös ja diagnostikas võimaldab detekteerida keerulisi aberratsioone väga suure lahutusvõimega (kuni 30 kb) Meetodi lahutusvõimet võib tõsta ~1 kb-ni kui hübriidiseerida proove kunstlikult venitatud kromatiinkiududele (fiiber FISH) (Florijn et al., 1995).

Puuduseks on asjaolu, et FISH võimaldab uurida ainult neid alasid, mille jaoks on olemas spetsiifilised proovid. Lisaks korraga analüüsitava lookuste arv on piiratud ning seetõttu on tegemist pigem abimeetodiga, mis sobib varem leitud muutuste kinnitamiseks ning aberratsioonide piiride detekteerimiseks (McNeil and Ried, 2000). Samas kasutasid Knight jt. FISH-i vaimse arengu mahajäämusega patsientide kromosoomide otste skriinimiseks, mille käigus selgus, et ümberkorraldused autosoomide telomeersetes alades võivad olla vastutavad ca 7% mõõduka kuni raske VAM juhtude eest (Knight et al., 1999).

1992. aastal kirjeldati Kallioniemi jt. poolt uut kromosoomide analüüsitehnikat, võrdlevat genoomset hübriidisiooni (VGH; *CGH-comparative genomic hybridisation*), mida võib vaadelda fluorestsents *in situ* hübriidisiooni modifikatsioonina. Meetodi põhimõte on järgmine: immobiliseeritud metafaasi kromosoomidele hübriidiseeritakse samaaegselt erinevate fluorofooridega märgistatud uuritavalt ja kontrollindiviidilt pärinev genoomne DNA

kordusjärjestusi blokeeriva inimese *Cot-1* DNA juuresolekul (joonis 1). Mõõdetud fluorestsentssignaalide suhe näitab DNA koopiaarvu uuritavas ja kontroll DNA-s (deletsioonide puhul on suhe < 1 , amplifikatsioonide puhul > 1) (Kallioniemi et al., 1992).



Joonis 1. Klassikaline ja mikrokiibil põhinev võrdlev genoomne hübridisatsioon (Snijders et al., 2003).

Uuritav genoomne DNA märgistatakse ühe fluorofooriga (nt. Cy3-ga) ja kontrollindiviidilt pärinevat DNA-d teise fluorofooriga (nt. Cy5-ga). DNA-d segatakse kokku kordusjärjestusi blokeeriva DNA-ga. Saadud segu denatureeritakse ning hübridiseeritakse normaalsetele metafasi kromosoomidele klassikalise VGH-i puhul või genoomsete kloonide mikrokiibile MK-VGH puhul. Fluorofooride fluorestsentssignaalide suhe mõõdetakse piki iga kromosoomi või iga mikrokiibile spotitud klooni jaoks eraldi.

Kuna VGH tehnika võimaldab analüüsida kogu genoomi ühe eksperimendi jooksul ning samal ajal ei vaja jagunevate rakkude kasutamist, sai sellest üks populaarsemaid genoomi skriiningu meetodikaid. Kõige rohkem kasutatakse VGH analüüsi vähi uuringutes deleteerunud või amplifitseerunud kromosoomi regioonide leidmiseks tuumorites (Trask, 2002). Põhiliseks eeliseks on asjaolu, et tehnika võimaldab vältida uuritava tuumori metafasi kromosoompreparaadi valmistamist, mis on iseenesest keeruline protseduur, samuti on valmis preparaat tihti väga madala lahutusvõimega (McNeil and Ried, 2000). Lisaks võib VGH-d

kasutada prenataalseks diagnostikaks või vastsündinute skriiningul kromosomaalsete aberratsioonide tuvastamiseks (Oostlander et al., 2004).

Kuigi klassikaline VGH on olnud kasulik vähi ja geneetiliste haiguste diagnostikas, on selle kasutamine piiratud ainult suurte muutuste detekteerimisega genoomis, võimaldades analüüsi maksimaalse lahutusvõimega 2–10 Mb (Xu and Chen, 2003). Metoodika teiseks oluliseks puuduseks on selle suutmatus detekteerida mosaiiksust, tasakaalustatud translokatsioone, inversioone ning kogu genoomi ploidsuse muutusi (Oostlander et al., 2004). Nende muutuste tuvastamiseks sobivad näiteks *SKY* (*spectral karyotyping*) (Schrock et al., 1996) või M-FISH (*multiplex fluorescence in situ hybridization*) (Speicher et al., 1996). Lisaks analüüsi tehnilistele probleemidele ei ole kromosoomi VGH tulemuste analüüs täielikult automatiseeritud ning nõuab tsütogeneetikute osalemist saadud slaidide kvaliteedi hindamisel.

1.3.2 Uued tsütogeneetilised meetodid

1.3.2.1 Mikrokiibil põhinev võrdlev genoomne hübriidatsioon

1997. a. kirjeldasid Solinas-Toldo jt. klassikalise VGH modifikatsiooni, mille puhul asendati metafaasi kromosoomidele hübriidiseerimine tahkele kandjale kinnitatud kaardistatud genoomsetele kloonidele hübriidiseerimisega (joonis 2), mis annab võimaluse kaardistada tuvastatud aberratsioonid otse genoomses järjestuses (Solinas-Toldo et al., 1997). Maatriks e. mikrokiibil põhineva võrdleva genoomse hübriidatsiooni (MK-VGH; *matrix-CGH*; *array-CGH*) nime saanud tehnoloogia ühendab endas FISH-i lahutusvõimet ja klassikalise VGH omaduse analüüsida kogu genoomi ühe eksperimendi käigus. MK-VGH ei eelda varasemaid teadmisi otsitava kromosoomaberratsiooni kohta. Seega on sellel meetodil potentsiaali saada kliinilise geneetika võimsaks vahendiks, mis sobib nii teadaolevate kui ka uute muutuste tuvastamiseks.

MK-VGH tehnoloogia kasutamine aitab saada üle klassikalise VGH peamisest puudusest - madalast lahutusvõimest. MK-VGH puhul on analüüsi lahutusvõime vastavuses kasutatavate fragmentide pikkusega ning geenikaardil kõrvuti asetsevate proovide omavahelise kaugusega. Seega teoreetiliselt võib konstrueerida soovitud resolutsiooniga mikrokiipe igasse huvipakkuvasse regiooni. Peab märkima, et MK-VGH eelised ja puudused sõltuvad suurel määral valitud platvormist. Märklaufragmentide kogus mikrokiibil, samuti nende amplifikatsiooni viis mõjuvad oluliselt analüüsi tundlikkust ja kvaliteeti (Oostlander et al., 2004).

Esimestes MK-VGH meetodit tutvustavates töodes oli tegemist genoomsetel kloonidel (*BAC*, *PAC*, kosmiidid) põhinevate mikrokiipidega (Pinkel et al., 1998; Solinas-Toldo et al., 1997). Selliseid ~150 kb pikkuseid genoomse DNA inserte sisaldavate kloonide kasutamine

annab piisava tugevusega signaali ning võimaldab detekteerida nii kõrge koopiaarvuga amplifikatsioone kui ka ühe koopia muutusi (Snijders et al., 2003), mis teeb kloonpõhiseid süsteeme väga populaarseteks ning pakub võimaluse rakendada neid erinevatel uurimisaladel.

Samal ajal on genoomsete kloonide kasutamisel ka puudusi. Esiteks mikrokiipide valmistamine on väga töömahukas, kuna *PAC*-id ja *BAC*-id on ühekoopialised vektorid ning DNA saagis on seetõttu väike. Nimetatud raskustest üle saamiseks on välja töötatud mitu strateegiat: k.a. ligatsioon vahendatud *PCR* (*ligation-mediated PCR*) universaalsete praimerite abil (Snijders et al., 2001), *DOP-PCR* (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*) kasutades inimese DNA-d prokarüoodi omale eelistavalt paljundavaid primereid (Fiegler et al., 2003) või nn. veereva ratta amplifikatsioon (*rolling circle amplification*) (Buckley et al., 2002). Teiseks tõstab kloonide kõrge molekulaarmass printimislahuse viskoossust, mis teeb piisavates kogustes *BAC* DNA spottimise mikrokiibile üsna raskeks (Snijders et al., 2003). Kolmandaks on analüüsi lahutusvõime piiratud mikrokiibi printimisel kasutatavate genoomsete kloonide insertide pikkusega (~40 kb kosmiidide ja ~100 kb *BAC*-ide puhul) ning nendevahelise kaugusega geenikaardil. Neljandaks ei ole võimalik genoomsete kloonide kasutamise puhul eelnevalt selekteerida nendes sisalduvat järjestust, mille tulemusena võib mikrokiip sisaldada kordusjärjestusi (*Alu*, *LINEs*, *LCRs*, tsentromeersed ja telomeersed kordusjärjestused) ja uuritava regiooniga sarnaseid järjestusi (pseudogeenid), mis teeb saadud tulemuste analüüsi keeruliseks (Mantripragada et al., 2004).

Veel üheks MK-VGH-I kasutatavaks platvormiks on cDNA mikrokiibid, mida rutiinselt rakendatakse geeni ekspressiooni analüüsides. cDNA kloonide komplektide laialdane kättesaadavus võimaldab toota mikrokiipe suurtes kogustes. Antud platvormi eeliseks on võimalus teostada paralleelselt nii DNA koopiaarvu muutuse kui ka geeniekspressiooni taseme analüüsi (Mantripragada et al., 2004). Samas aga on tehnoloogiat võimalik rakendada aberratsioonide tuvastamiseks ainult teadaolevates geenides. Kuigi geenirikkad alad on analüüsitavad väga kõrge lahutusvõimega, siis geenivaesed regioonid, reguloorsed alad ja intronid jäävad analüüsist välja. Lisaks sellele tagab iga eraldi võetud mikrokiibi element üsna madala tundlikkuse ja spetsiifilisuse ühekoopialiste muutuste detekteerimiseks, seetõttu on vajalik antud tehnoloogia edasi arendamine (Pollack et al., 1999).

Üks uuematest lähenemistest põhineb *in silico* disainitud *PCR*-il amplifitseeritud kordusjärjestustevabade proovide kasutusel mikrokiibi märklaudfragmentidena. Genoomi bioinformaatilise analüüsi rakendamine võimaldab vältida genoomsete või cDNA kloonidega kaasnevaid piiranguid analüüsi lahutusvõimes, kuna sel juhul määravad resolutsiooni ainult

mikrokiibile valitud fragmentide pikkus ning nendevaheline kaugus. Vajadusel on võimalik süsteemi lahutusvõimet tõsta, lisades täiendavaid proove huvipakkuvatest regioonidest. Teiseks bioinformaatilise analüüsi eeliseks on see, et märklaudfragmentidena võib valida proove igast huvipakkuvast genoomi regioonist, k. a. kordusrikastest ja segmentaalseid duplikatsioone sisaldavatest aladest, mis võivad olla koopiaarvu muutuste seisukohalt olulised (Mantripragada et al., 2004). Esimeseks seda tüüpi mikrokiibiks oli 23 kb lahutusvõimega *NF2 (neurofibromin 2)* geeni spetsiifiline kiip intrageensete deletsioonide detekteerimiseks (Mantripragada et al., 2003). Bioinformaatilise analüüsi puuduseks on asjaolu, et seda võib rakendada ainult sekveneeritud genoomsete järjestuste puhul. Lisaks sellele kordusjärjestuste vabadel proovidel baseeruvate mikrokiipide kasutamist võivad piirata ka praimerite kõrge hind ning tuhandete *PCR*-fragmentide valmistamine, mida võib tegelikult automatiseerida (Mantripragada et al., 2004).

Kõige suurem lahutusvõime MK-VGH puhul on tänapäeval saadud oligonukleotiidsete mikrokiipide kasutamisega. Nende mikrokiipide valmistamiseks on kaks võimalust: kas printida eelnevalt sünteesitud oligonukleotiide klaasile (Barrett et al., 2004) või sünteesida oligonukleotiidid otse kandjale (Lucito et al., 2003). Antud platvormi suureks eeliseks on asjaolu, et mikrokiipide disainimine ja tootmine on väga lihtne ning paindlik: näiteks võib huvipakkuvaid lookusi analüüsi kergesti lisada /eemaldada ning seetõttu võib iga mikrokiip vastavalt uurija vajadusele sisaldada erinevaid fragmente. Märklaudjärjestuste väike suurus (~25-85 nukleotiidi) tagab analüüsi parema lahutusvõime. Samal ajal võib kiibile kantud proovide pikkust vaadelda puudusena, kuna lühikesed DNA fragmendid teevad hübridisatsiooni muutlikuks (*variable*) ja järjestusest sõltuvaks (Ylstra et al., 2006). Hübridisatsiooni täpsusega seotud puudusi võib vähendada võttes tulemuste analüüsil arvesse mitme lähestikku paikneva proovi signaalide keskmist (Fan et al., 2006a; Peiffer et al., 2006), kuid nende sammude tagajärjel väheneb analüüsi efektiivne lahutusvõime.

Erinevate firmade poolt pakutavad oligonukleotiid-mikrokiibid on ühendatud erinevate märgistamis- ja hübridiseerimistehnikatega. Mõned neist võimaldavad analüüsida ühe eksperimendi käigus nii genotüüpi kui ka muutusi DNA koopiaarvus (Lockwood et al., 2006). Näiteks Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/>) ja Illumina (<http://www.illumina.com>) kiipide abil, mis sisaldavad vastavalt 25- ja 50-meerseid oligonukleotiide, on võimalik tuvastada selliseid koopiaarvu neutraalseid sündmusi nagu uniparentaalne disoomia, mis on oluline arenguhäirete ja tuumorogeneesi seisukohalt (Peiffer et al., 2006). Aberratsioone võib detekteerida kasutades kahte parameetrit: normaliseeritud signaaliintensiivsust ning allelide sagedust. Neid kombineerides võib saavutada tundlikkuma ja täpsema andmete analüüsi.

Kokkuvõtteks võib öelda, et igal platvormil esinevad omad eelised ja puudused ning mikrokiibi tüübi valik MK-VGH jaoks oleneb nõutud lahutusvõimest ning uuritavast DNA proovist. Genoomsete kloonide vektoritel põhinevad mikrokiibid võimaldavad läbi viia madala kvaliteediga DNA proovide ülegenoomseid analüüse, kuna annavad intensiivsemaid signaale. Oligonukleotiidsed ja *PCR*-i fragmentidel põhinevad mikrokiibid sobivad kõrge lahutusvõimega regiooni-spetsiifiliseks analüüsiks juhul, kui DNA kvaliteet ja kogus ei ole piiratud (Lockwood et al., 2006). Siin tuleb märkida, et mikrokiibi tehnoloogiad ja protokollid arenevad väga kiiresti ning puudustest püütakse pidevalt üle saada.

MK-VGH peamiseks puuduseks, mis ei sõltu valitud mikrokiibi tüübist, on nagu ka klassikalise VGH puhul suutmatus detekteerida mosaiiksust ning tasakaalustatud aberratsioone, mille puhul DNA koopiaarv ei muutu.

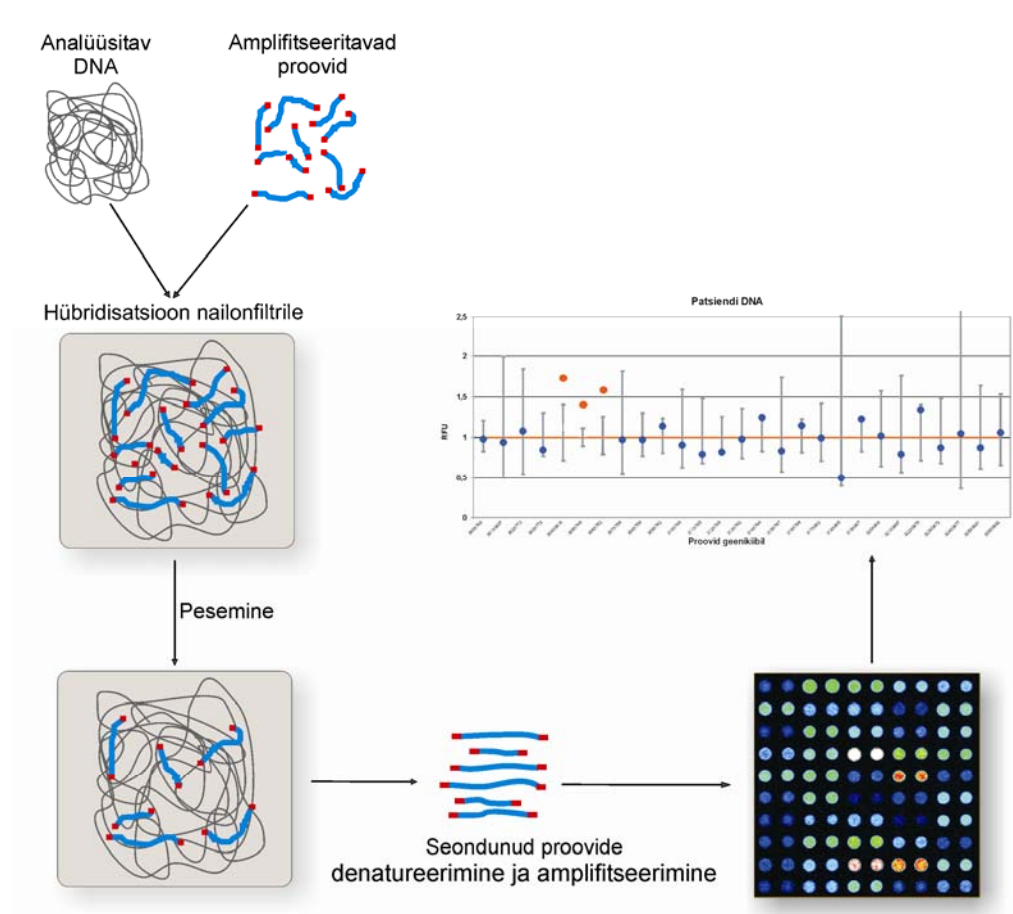
Lisaks sõltub analüüsi tundlikkus oluliselt fluorestsentsignaali ja taustaintensiivsuse vahelisest suhtest, mida mõjutab hübriidisatsiooni spetsiifilisus, ja on seda parem, mida väiksem on analüüsitava materjali kompleksus (Snijders et al., 2003). Inimese genoomse DNA kompleksus on väga suur, millest tingituna kogu genoomse DNA märkimisel ja hübriidisatsioonil mikrokiibile jäävad signaalid nõrgaks.

Seda probleemi on püütud lahendada hübriidiseeritava materjali kompleksuse vähendamise näiteks nn. genoomsete jäljenduste abil (Lucito et al., 2003). *ROMA* (*representational oligonucleotide microarray analysis*) nime saanud analüüsi puhul asendatakse uuritavalt ja kontrollindiviidilt saadud genoomne DNA <1.2 kb pikkuste madala kompleksusega genoomsete jäljendustega, mis hõlmavad ~2.5% inimese genoomist. Selleks lõigatakse DNA-d restriктаasiga, saadud fragmentide otstele ligeeritakse oligonukleotiidsed adapterid ning järgneb *PCR*-ga amplifitseerimine (Lucito et al., 2003; Lucito et al., 2000).

Vaatamata nimetatud raskustele on MK-VGH tänapäeval juba väga laialdaselt kasutust leidnud metoodika koopiaarvu muutuste välja selgitamiseks vähi ja paljude geneetiliste haiguste puhul. Haiguspetsiifilised mikrokiibid on välja töötatud vähi (Massion et al., 2002), kongenitaalsete anomaaliate (Locke et al., 2004; Shaw et al., 2004) ja VAM põhjuste leidmiseks (Harada et al., 2004). MK-VGH on muutnud meie arusaamist vähibioloogiast, näidates et sama tüüpi kasvajatel on sarnane amplifikatsioonide/deletsioonide muster ning kasvaja progresseerumisel suureneb ka aberratsioonide sagedus (Speicher and Carter, 2005). Lisaks leiti MK-VGH-le rakendus *CNV*-de iseloomustamisel ning liikide võrdlusel (Lockwood et al., 2006). Selleks et edaspidi saaks seda meetodit laiemalt kasutada igapäevases diagnostikas, on vajalik tehniline optimeerimine, soodsam hind ning tarkvara tulemuste analüüsimiseks.

1.3.2.2 MAPH – multiplex amplifiable probe hybridisation

Uuritava DNA materjali kompleksust on võimalik vähendada kasutades Armour jt. poolt kirjeldatud *MAPH* meetodikat genoomsete aberratsioonide tuvastamiseks (Armour et al., 2000). Selle meetodika põhimõte on järgmine: uuritav genoomne DNA denatureeritakse ning immobiliseeritakse nailonfiltrile. Seejärel hübridiseeritakse sellele uuritavatele lookustele (geenid, mittekodeerivad regioonid, subtelomeersed ja subtsentromeersed piirkonnad) vastavad *MAPH* amplifitseeritavad proovid, mille otstele on lisatud universaalse praimerpaari järjestus. Hübridisatsioonijärgselt pestakse filtreid seondumata ja mittespetsiifiliselt seondunud proovide eemaldamiseks. Pesule järgneb seondunud proovide denaturatsioon ja kvantitatiivne amplifikatsioon (20-25 tsükli) universaalse praimerpaari abil. Lookusele vastavalt proovilt saadud amplifikatsiooniproducti hulk näitab suhtelist DNA koopiaarvu antud lookuses (joonis 2).



Joonis 2. *MAPH* meetodika põhimõte (Puusepp, 2007).

Analüüsi on võimalik teostada kasutades radioaktiivselt märgistatud (^{33}P) proove, lahutades neid denatureerival PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) geelil ja määrates

proovide kogust (Armour et al., 2000; Sismani et al., 2001), või märgistades produkte fluorestsentsmärkega ning lahutades kapillaarsekvenaatoril (White et al., 2002).

Kuna tegemist on kiire, lihtsa ja suhteliselt odava tehnikaga, mis ei nõua eriaparatuuri olemasolu, leidis *MAPH* kasutamist genoomsete submikroskoopiliste muutuste detekteerimiseks. Lisaks veel rakendatakse seda subtelomeersete regioonide analüüsimiseks. On leitud, et viimasena mainitud alades esinevad muutused DNA koopiaarvus võivad põhjustada VAM-st (Hollox et al., 2002b; Sismani et al., 2001). Kuna uuritavate järjestuste kontsentratsioon *MAPH* meetodi puhul on suur ning lähtematerjalina võib kasutada väikest hulka uuritavat DNA-d (0,5-2 µg), võiks *MAPH* leida rakendust näiteks prenataalses diagnostikas ning muudel juhtudel kus lähtematerjali hulk on piiratud (Hollox et al., 2002a).

Ühes reaktsioonis analüüsitavate lookuste arv oleneb *MAPH* amplifitseeritavate proovide arvust kompleksis. Kasutades analüüsiks geelelektroforeesi, tuleb arvestada, et iga proov peab olema lahutatud geelil rahuldavalt, seetõttu on analüüsitavate proovide kogus piiratud geeli lahutusvõimega. Kasutatud proovide minimaalne pikkus võib olla ~100 bp, kuna alla selle väärtuse langeb hübridisatsiooni efektiivsus. Maksimaalse pikkuse - ~600 bp - määrab vajadus hübridisatsioonijärgselt amplifitseerida kõike DNA-le seondunud proove ühesugustes *PCR*-i tingimustes. Seega maksimaalne analüüsis kasutatav proovide arv võib olla ca 100 (Hollox et al., 2002a). See ei tekita probleemi väikese proovide komplekti korral, nagu näiteks *PMP22* (*peripheral myelin protein 22*) geeni deletsiooni/duplikatsiooni testimiseks välja töötatud 19 proovist koosneva testi puhul (Akrami et al., 2003). Kui analüüs ei piirdu genoomi ühe lookusega ei ole selle suurusjärgu proovide kompleksidest suurt kasu.

Tulemuste analüüsi viimine mikrokiibi formaati aitaks nimetatud puudusest üle saada ning tõsta oluliselt meetodika läbilaskevõimet, pakkudes võimalust analüüsida ühe eksperimendi käigus rohkem lookusi ning tuvastada submikroskoopilisi aberratsioone teadmata asukohas (Armour et al., 2000; Hollox et al., 2002a; Patsalis et al., 2005). *MAPH* proovidele komplementaarseid märklaudjärjestusi sisaldav mikrokiip võimaldaks amplifitseeritud proovide eristamist järjestuse mitte aga enam suuruse põhjal. Samal ajal *MAPH* proovide kasutamise puhul ei ole vaja kogu genoomset DNA-d märkida ja mikrokiibile hübridiseerida, see omakorda parandab hübridisatsiooni kineetikat ja aitab tõsta saadud signaalide intensiivsust (Lucito et al., 2000; Patsalis et al., 2007). Mikrokiibil põhineva *MAPH* (*MK-MAPH*) meetodi esimesed etapid on samad nagu klassikalise *MAPH* puhul. Erinevus seisneb selles, et kvantiseerimiseks ei lahuta proovide segu PAGE geelil või kapillaarsekvenaatoril, vaid hübridiseeritakse seda mikrokiibile (joonis 2).

Kaks sõltumatut uurimisgruppi on rakendanud kirjeldatud võimalust väikeste DNA koopiaarvu muutuste detekteerimiseks. Gibbons et al. ühendasid *MAPH* ja PamGene mikrokiibi platvormi *PMP22* geeni doosi määramiseks ning näitasid, et MK-*MAPH* meetodil saadud tulemused koreleeruvad hästi klassikalise *MAPH*-i tulemustega (Gibbons et al., 2006). Proovide komplekt koosnes kuuest *PMP22* geeni spetsiifilisest proovist ja 11-st autosoomse ja sugukromosoomse esindavast kontrollproovist. Igale proovile vastas kolm erinevat mikrokiibile duplikaatidena spotitud 60-meerset oligonukleotiidi.

Meie grupp töötas välja X kromosoomi spetsiifilise süsteemi, mis koosneb 558-st X kromosoomile vastavast proovist ja 107-st erinevatele autosoomidele vastavast kontrollproovist (Patsalis et al., 2007). *MAPH* amplifitseeritavatele proovidele komplementaarsed järjestused on kinnitatud mikrokiibile duplikaatidena. Kasutades proovide valimiseks sama printsiipi on võimalik disainida süsteeme, mis on suunatud kindlate genoomi lookuste, subtelomeersete regioonide, tervete kromosoomide ja kogu genoomi uurimiseks (Patsalis et al., 2005).

Seega võib öelda, et peale viimistlemist ja optimeerimist võib MK-*MAPH* meetod olla rakendatav teadustöös ning meditsiinilistes uuringutes, leides kasutust DNA koopiaarvu muutuste poolt põhjustatud geneetiliste sündroomide diagnostikas, ebanormaalse fenotüübiga patsientide skriiningus, genotüüp-fenotüüp korrelatsiooni uuringutes, geenide identifitseerimisel ja *CNV*-de tuvastamisel (Patsalis et al., 2007).

1.3.2.3 RT-qPCR – reaalaaja kvantitatiivne PCR

RT-qPCR on geeni ekspressiooni taseme määramiseks laialt kasutatav meetod, mida seniajani ei ole rakendanud rutiinselt koopiaarvu muutuste detekteerimiseks genoomses DNA-s (Weksberg et al., 2005). Samas pakub *RT-qPCR* väärtuslikku alternatiivi FISH-ile ja *Southern blot*-ile, mis on kasutusel kliinilises praktikas geenide deletsiooni/duplikatsiooni diagnoosimiseks.

RT-qPCR-i üldprintsiibiks on võimalus jälgida *PCR* produkti akumulereerumist igas reaktsiooni tsüklis. *PCR* amplikoni kogunemise mõõtmiseks on välja töötatud mitmeid erinevaid võimalusi: näiteks kaheaahelalist DNA-d siduv värv *SYBR Green I* (Wittwer et al., 1997), järjestuspetsiifilised *Taqman* proovid (Livak et al., 1995) jt. Higuchi et al. näitasid esimesena, et esineb seos hetke, mille juures hakkab fluorestseeruv *PCR* signaal kasvama, ning DNA esialgse koguse vahel (Higuchi et al., 1993). Mida kiiremini ületab signaal taustasignaali, seda rohkem DNA-d oli reaktsiooni alguses. Sel moel on keeruline küsimus „kui palju?“ *RT-qPCR* analüüsi puhul muudetud lihtsamaks „millal?“.

RT-qPCR võimaldab mõõta kiiresti DNA koopiaarvu kindlas genoomi piirkonnas ning iseloomustada aberratsiooni murdekohti suure täpsusega (Weksberg et al., 2005). Metoodika nõuab väga väikseid DNA koguseid ning ei vaja *PCR*-i järgset manipuleerimist, mis vähendab kontaminatsiooni riski ning analüüsiks vajalikku aega (De Preter et al., 2002). *RT-qPCR*-i oluliseks eeliseks on samuti tema tundlikkus ja suur paindlikkus, mis võimaldab uurida igat huvipakkuvat genoomset lookust (Hoebeeck et al., 2005).

Samal ajal esineb antud tehnoloogial tähtis puudus, sarnaselt FISH-ile ei saa *RT-qPCR*-i rakendada kui ei ole eelteadmist, kust täpselt tuleks kromosoomanomaaliat otsida. Vaatamata sellele on *RT-qPCR* kasulik teise meetodiga leitud aberratsiooni kinnitamisel (Selzer et al., 2005). Lisaks sellele võib osutada limiteerivaks asjaoluks ka spetsiaalse kalli *RT-qPCR* masina vajalikkus ja analüüsi kõrge hind, mis piirab tänapäeval metoodika laialdast kasutamist kliinilistes uuringutes.

Nagu eespool toodud tänapäeval kasutatavate tehnoloogiate ülevaatest selgub, sobivad mitmesuguste kromosomaalsete aberratsioonide uurimiseks erinevad tsütogeneetilised meetodid. Lisaks sellele tõenäoliselt ei ole tänapäeval mõistlik rakendada üht metoodikat geneetilise haiguse põhjuste välja selgitamiseks. Kombineerides omavahel vastavalt vajadusele ja püstitatud küsimustele traditsioonilisi ning molekulaarse tsütogeneetika tehnoloogiaid võib saavutada parimaid tulemusi geneetiliste ümberkorralduste analüüsil (Smeets, 2004; Speicher and Carter, 2005). Näiteks soovitavad Rauch jt. kõigepealt rakendada VAM patsientide uurimiseks molekulaarse tsütogeneetika meetodeid (s.h. MK-VGH), kuna need võimaldavad võrreldes teiste meetoditega tuvastada haigust põhjustava muutuse suuremal osal patsientidest (Rauch et al., 2006). Samas tasakaalustatud aberratsioonid jäävad sel juhul detekteerimata ning nende uurimiseks võib kasutada tavapärasest kromosoomide diferentsiaalvärvimist, mis on oma olemuselt töömahukam ja nõuab kogunud tsütogeneetiku osalemist. DNA ümberkorralduse murdekohtade täpsemaks analüüsiks sobivad aga lookus-spetsiifilised tehnoloogiad, näiteks käesolevas töös lähemalt vaadeldud *RT-qPCR* ja *MAPH*, mis võimaldavad uurida huvipakkuvat regiooni suure täpsusega.

Vaatamata sellele jäävad klassikalised kromosoomide värvimistehnikad ja FISH kõige laialdasemalt kasutatavateks meetoditeks DNA koopiaarvu määramisel (Salman et al., 2004; Sharkey et al., 2005).

Antud töös kirjeldatud tsütogeneetiliste meetodite võrdlus on toodud tabelis 2.

Tabel 2. DNA koopiaarvu määramiseks kasutatavate meetodite võrdlus. Tabel põhineb Hollox'i jt. ning Salman'i jt. poolt avaldatud artiklidel (Hollox et al., 2002a; Salman et al., 2004) ning on täiendatud MK-MAPH osas.

Meetod	Lahutusvõime	Lahutusvõimet piirav factor	Lookuseid per test	Põhi- /Lisameetod	Analüüsiks vajalik aeg	Vajalik lisaapratuur
Kromosoomide differentsiaalvärvimine	2-10 Mb	Kromosoompreparaat	<1500	Põhi- /Lisameetod	1-10 päeva	Mikroskoop
FISH	>30 kb	Kromosoompreparaat	2-3	Lisameetod	1-7 päeva	Fluorestsentsmikroskoop
VGH	3-10 Mb	Kromosoompreparaat	<300	Põhimeetod	5-7 päeva	Fluorestsentsmikroskoop
MK-VGH	>100 kb	Märklaudjärjestuste pikkused ja vahemaad	~2400	Põhimeetod	1-4 päeva	DNA kiibi skänner
<i>RT-qPCR</i>	>50 bp	Amplikonide suurused ja vahemaad	<6	Lisameetod	1-2 päeva	Reaalaja PCR-i masin
<i>MAPH</i>	>100 bp	Proovide pikkused ja vahemaad	<60	Lisameetod	2 päeva	Fluorestsentsgeel/ kapillaarsekvenaator
MK-MAPH	>300 kb	Proovide pikkused ja vahemaad	~700	Põhimeetod	3-4 päeva	DNA kiibi skänner

2 Töö eesmärk

Käesoleva magistr töö praktilise osa eesmärgiks oli välja töötada ning optimeerida mikrokiibil põhinev *Multiplex Amplifiable Probe Hybridization (MAPH)* meetod ja uurida patsientide DNA proove submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks X kromosoomil. Samuti kinnitada MK-*MAPH* abil leitud aberratsioonide teiste meetoditega ning võimalusel leida genotüüp-fenotüüp seoseid.

Töö on tehtud Eesti Teadusfondi grant nr. 5467 „Uue DNA diagnostika tehnoloogia väljatöötamine inimese kromosoomide struktuursete aberratsioonide tuvastamiseks vaimse alaarengu korral“ (2003-2006) raames ja toel.

3 Materjal ja metoodika

3.1 MK-MAPH analüüs

3.1.1 MK-MAPH proovide valimine ja raamatukogu koostamine

MK-*MAPH* teostamiseks valiti 558 inimese X kromosoomile vastavat unikaalset järjestust ning 107 autosoomidele vastavat kontrollfragmenti, mille leidmiseks vajalik bioinformaatiline analüüs teostati TÜ MRI Bioinformaatika õppetoolis toetudes inimese genoomi versioonile NCBI 35.1 (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Selleks, et valida lookusspetsiifilisi hübridiseeritavaid proove, jagati X kromosoom 1500-ks ühtlase vahega kandidaatregiooniks. Igast regioonist valiti 1000 bp-pikkused järjestused ning kontrolliti nende omavahelist interakteerumist arvutiprogrammi BLAST2 programmi (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) abil. Sobivatele järjestustele disainiti *PCR* praimerid kasutades modifitseeritud Primer3 arvutiprogrammi (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) ning Patsalis jt. poolt kirjeldatud parameetreid (Patsalis et al., 2007). Seejärel kontrolliti leitud praimerjärjestuste unikaalsust inimese genoomis ning eemaldati praimerpaarid, mille puhul mõlemad praimerid seostusid >3 korra, seostumiste summa oli >10, või praimerpaari kasutades saadud produktide arv oli >1. Saadud *PCR* produktide esinemist ainult ühes spetsiifilises genoomi lookuses kontrolliti BLAST2 abil. Kirjeldatud toimingud teostati automaatselt TÜ MRI Bioinformaatika õppetoolis välja töötatud veebipõhise MAPHDesigner'i (<http://bioinfo.ebc.ee/maphdesigner>) abil. Lõpuks valiti leitud kandidaatproovidest 558 unikaalset järjestust, mis katavad inimese X kromosoomi peaaegu ühtlaselt keskmise vahemikuga proovide vahel 150-350 kb.

Kasutades sama printsiipi valiti välja ka 107 autosoomsetele kromosoomidele vastavat kontrollfragmenti.

Andmed antud töös kasutatud proovide, nende amplifikatsiooniks disainitud *PCR* praimerite, proovide pikkuse ning asukoha inimese genoomis kohta (vastavalt NCBI 35.1) võib leida lisatabelis 1 (Patsalis et al., 2007).

Proovide esialgne amplifitseerimine ja kloonimine teostati Küprose Neuroloogia ja Geneetika Instituudis (KNGI; Nicosia, Küpros) dr. Patsalise töörühma poolt. Insertideks kasutatavad fragmendid amplifitseeriti tsütogeneetiliselt kontrollitud 46,XY inimese genoomselt DNA-lt, kasutades lisatabelis 1 (Patsalis et al., 2007) toodud primereid. Amplifitseeritud proovijärjestused klooniti vastavalt tootja protokollile, kasutades firma Invitrogen TOPO TA

kloonimiskitti koos pCR 2.1 vektori ja *E.coli* TOP10 rakkudega (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA).

Kloonid säilitati 96 auguga mikrotiiterplaadides -80°C juures 10% glütseroolis vastavalt TOPO TA kloonimiskiti protokollile. Koostati andmebaas kogu informatsiooniga proovide, nende asukoha, suuruse ning amplifitseerimisprotokollide kohta.

3.1.2 Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati järgmist protokollit. 1,5 ml LB söötmes ampitsilliini juuresolekul (lõppkontsentratsioon 100µg/ml) üleöö kasvatatud kultuuri tsentrifugeeriti lauatsentrifuugil (Biofuge Pico, Heraeus Instruments GmbH; Hanau, Saksamaa) toatemperatuuril 5 min 4000 rpm. Eemaldati supernatant ning sade suspendeeriti 200 µl STET puhvril [0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 5% Triton X-100], millele oli lisatud RNAas (MBI Fermentas; Vilnius, Leedu) lõppkontsentratsiooniga 0,02 µg/µl. Lisati 10 µl lüsootsüümi vesilahust (10mg/ml) ning hoiti 5 min toatemperatuuril. Inkubeeriti 95°C juures 45 s. Lüsaati tsentrifugeeriti 10 min 13000 rpm. Tekkinud sade eemaldati hambatiku abil. Supernatandile lisati 5% CTAB lõppkontsentratsiooniga 0,2% ning segati vortexil sademe väljatulekuni. Tsentrifugeeriti 5 min 13000 rpm, eemaldati supernatant ning lahustati sade 300 µl 1,2 M NaCl-s. Järgnes DNA sadestamine 750 µl külma (-20°C) 96% etanooliga 30 min -20°C juures ja tsentrifugeerimisega 10 min 13000 rpm ning pesemine külma 75% etanooliga. Lahustunud plasmiidne DNA eraldati tsentrifugeerimisel 5 min 13000 rpm ning saadud DNA lahustati 50 µl TE puhvril (pH 8.0).

Saadud produktid visualiseeriti geelelektroforeesil 1% agarosgeelil TBE puhvril (Naxo Ltd; Tartu, Eesti), millele oli lisatud etiidiumbromiid. Produktid kanti geelile koos 1 µl 6× elektroforeesi puhvriga (0,2% broomfenool sinine; 0,2% ksüleen-tsüanoool; 60% glütserool; 60 mM EDTA) (MBI Fermentas).

Plasmiidse DNA kontsentratsioon mõõdeti ND-1000 spektrofotomeetri (NanoDrop Technologies; Wilmington, USA) abil ning viidi 100ng/µl-ni.

Eraldatud plasmiidne DNA kasutati *MAPH* amplifitseeritavate proovide ja mikrokiibi märklauajärjestuste valmistamiseks.

3.1.3 Inimese X kromosoomile vastava *MAPH* amplifitseeritavate proovide kogu valmistamine

MAPH amplifitseeritavate proovidenä kasutati X kromosoomile ja autosoomsetele kromosoomidele spetsiifilised järjestused, mille valik toimus vastavalt punktis 3.1.1. kirjeldatule.

MAPH amplifitseeritavad proovid on identsed mikrokiibil kasutatud märklaudjärjestustega, kuid iga *MAPH* proov sisaldab otstes vektori kloneerimissaidist mõlemal pool asetsevaid PZA/PZB universaalseid praimerjärjestusi.

MAPH amplifitseeritavate proovide valmistamiseks amplifitseeriti neid *PCR*-il vastavalt plasmiidset DNA-lt kasutades PZA/PZB universaalseid primereid. 100 µl reaktsioonisegu sisaldas 1x *PCR* puhvrit [800 mM Tris-HCl (pH 9.4-9.5), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20; Solis BioDyne, Inc; Tartu, Eesti], 1.5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Inc), 0.2 mM dNTP segu (MBI Fermentas), 50 pmooli PZA praimerit (Metabion; Martinsried; Saksamaa); 50 pmooli PZB praimerit (Metabion), 5 U *hot FIREPol* DNA polümeraasi (Solis BioDyne, Inc), 50 ng plasmiidset DNA-d ja ddH₂O-d lõppmahuni. Primerite järjestused on toodud tabelis 3.

Amplifitseerimine viidi läbi termotsükleris PTC-200 (MJ Research Inc; Waltham, MA, USA) kasutades järgmist programmi: denaturatsioon 94°C juures 10 min; 25 tsükli: denaturatsioon 94°C juures 1 min, primerite seondumine 60°C juures 1 min, süntees 70°C juures 1 min.

Tabel 3. *MAPH* proovide amplifitseerimisel kasutatud universaalsed primerid

Primer	Suund	Järjestus
PZA	5' → 3'	AGTAACGGCCCGCCAGTGTGCTG
PZB	3' → 5'	CGAGCGGCCCGCCAGTGTGATG
UNI5	5' → 3'	GAATTCGCCCTT
UNI3	3' → 5'	GATATCTGCAGAATTCGCCCT

Seejärel kontrolliti saadud produktid geelelektroforeesil 1,5% agarosgeelil TBE puhvis (Naxo Ltd), millele oli lisatud etiidiumbromiid. Produktid kanti geelile koos 1 µl 6× elektroforeesi puhvriga (0,2% broomfenool sinine; 0,2% ksüleen-tsüanool; 60% glütserool; 60 mM EDTA) (MBI Fermentas).

Produktid puhastati sadestamisel. Selleks lisati 1/4 produkti mahtu 10 M ammooniumatsetaati ning 2,5 mahtu külma (-20°C) 96% etanooli, segati, jäeti -20°C juurde kaheks tunniks ja tsentrifuugiti 20 min 13000 rpm (Biofuge Pico). Supernatant eemaldati, lisati pesemiseks 500 µl külma 75% etanooli ning tsentrifuugiti 15 min 13000 rpm. Supernatant eemaldati, sade kuivatati termoblokis 37°C juures ja resuspendeeriti ddH₂O-s.

Seejärel määrati saadud produktide kontsentratsioon 1,5% agarosgeelil TBE puhvril (Naxo Ltd), kasutades markerit Low Range DNA Mass Ruler (MBI Fermentas) ning arvutiprogrammi ImagePro Plus (Media Cybernetics; Silver Spring, MD, USA).

Valmistatud X kromosoomile vastavad proovid jagati mitmeks seguks, igaüks ~90 proovi. Iga proovi kontsentratsioon segus oli 1 ng/μl. Samasugune segu valmistati ka 107 autosoomsest kontrollproovist.

3.1.4 Inimese X kromosoomi spetsiifiliste mikrokiipide valmistamine

3.1.4.1 Märklaudjärjestuste ettevalmistamine

Mikrokiibi märklaudjärjestuste valmistamiseks amplifitseeriti neid *PCR*-il vastavalt plasmiidset DNA-lt kasutades igale proovile spetsiifiline praimerpaar. 100 μl reaktsioonisegu sisaldas 1x *PCR* puhvrit [800 mM Tris-HCl (pH 9.4-9.5), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween-20; Solis BioDyne, Inc], 1.5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Inc), 0.2 mM dNTP segu (MBI Fermentas), 100 pmooli 5' + 3' praimereid (Metabion), 5 U *hot FIREPol* DNA polümeraasi (Solis BioDyne, Inc), 50 ng plasmiidset DNA-d ja ddH₂O-d lõppmahuni. Kasutatud praimerite nimekiri on toodud lisatabelis 1 (Patsalis et al., 2007). Amplifitseerimisreaktsioonid viidi läbi sarnaselt punktis 3.1.3. kirjeldatule.

Produktide puhastamine ja kontsentratsioonide mõõtmine teostati vastavalt punktis 3.1.3. toodule.

3.1.4.2 Kontrolljärjestuste ettevalmistamine

Kolmele *Arabidopsis thaliana* geenile - RUBISCO aktivaasi (*RCA*), fotosüsteem I klorofüll a/b-seonduva valgu (*Cab*), ribuloos-1,5-bifosfaat karboksülaas/oksügenaasi suure subühiku (*rbcL*) geenidele - vastavaid järjestusi kasutati mikrokiibil negatiivsete kontrollidena.

Järjestused amplifitseeriti *A. thaliana* genoomset DNA-lt. 50 μl reaktsioonisegu sisaldas 1x *PCR* puhvrit [750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20; MBI Fermentas], 2.5 mM MgCl₂ (MBI Fermentas), 0.2 mM dNTP segu (Amersham Biosciences; Piscataway, NJ, USA); 0.2 mM 5' + 3' praimereid (Metabion), 50 ng genoomset DNA-d, 2.5 U *Taq* DNA polümeraasi (MBI Fermentas) ja ddH₂O-d lõppmahuni. Amplifitseerimisel kasutatud praimerite nimekiri on toodud tabelis 4.

Amplifitseerimisreaktsioonid viidi läbi Eppendorf Mastercycler Gradient aparaadis (Eppendorf GmbH; Hamburg, Saksamaa), kasutades järgnevat DNA amplifitseerimise

programmi: denaturatsioon 94°C juures 5 min, 30 tsükli: denaturatsioon 94°C juures 1 min, praimerite seondumine 60°C juures 1 min, süntees 72°C juures 1 min.

Genoomse DNA vähese koguse tõttu teostati teine amplifikatsioon samadel tingimustel, kuid genoomse DNA asemel kasutati 0,5 µl esimese PCR-i reaktsiooni produkti. Produktid visualiseeriti geelelektroforeesil 1,5% agarosgeelil TBE puhvris (Naxo Ltd).

Tabel 4. *A. thaliana* geenidele vastavate järjestuste amplifitseerimisel kasutatud praimerid

Geen	5'praimer	3'praimer
<i>RCA</i>	TCGCACAGAGCAACAAGAAGAG	AGTAGTACCACCCATACGACCC
<i>Cab</i>	TGACCCACTTGGACTTGGAGAAG	GCACACAGAATCCTACAAACGCC
<i>rbcL</i>	TGGGGAGGCAAAGGTCAAGG	TCACGGATGAGAGGAGCGTATAG

3.1.4.3 Järjestuste kandmine mikrokiibile

Märklaudjärjestuste kandmiseks mikrokiibile koostati maatriks (Patsalis et al., 2007), kuhu iga spot kanti kahes korduses. Nurkadesse kanti 200 nM Cy3- ja Cy5-ga märgitud 25-meersed oligonukleotiidid (MWG-Biotech AG; Ebersberg, Saksamaa). Negatiivse kontrollina kasutati printimispuhvrit – 25% DMSO-d.

Iga märklaudjärjestus lahustati 25% DMSO puhvris lõppkontsentratsioonini 30 ng/µl ja spotiti Genorama™ SAL-1 klaasidele (Asper Biotech; Tartu, Eesti) robotit Virtek ChipWriter™ (Virtek Vision International Inc; Waterloo, Ontario, Kanada) ning robotinõelu SMP-3 (TeleChem International Inc; Sunnyvale, CA, USA) kasutades. Igale kiibile prinditi maatriks kahe identse *subgrid* ina. Seejärel inkubeeriti klaase niiskes kambris 37°C juures üleöö. Blokeerimiseks hoiti 1 tund 1% ammoniaagi aurudes, pesti 3 korda ddH₂O-ga ja kuivatati tsentrifuugides Jouan CR-422-l (Jouan Inc; Winchester, VA, USA) 700 rpm 5 min 20°C juures.

3.1.5 Katsetes kasutatud genoomsed DNA-d

Katsetes kasutatud patsientide genoomsed DNA-d saadi KNGI-st, SA TÜK Ühendlabori Meditsiinigeneetika Keskusest (Tartu, Eesti), Leuveni Ülikooli Inimesegeneetika Keskusest (Leuven, Belgia) ning Dr. Helen Puusepp'a doktoritöö raames kogutud VAM perekondade kollektsioonist (Tabel 5). Kasutatud DNA-de eraldamine, kvaliteedikontroll ning tsütogeneetiline analüüs kromosoomide G-vöödistusel oli teostatud saatjate poolt.

Katsetes kasutatud 10 mees- ja 10 naiskontrollindiviidi vereproovid koguti Dr. Helen Puusepp'a poolt. Kontrollidena kasutatud indiviidideks olid vabatahtlikud TÜ Arstiteaduskonna

tudengid, kellele enne uuringusse kontrollideks võtmist teostati G-vöödistuse analüüs SA TÜK Ühendlabori Meditsiinigeneetika Keskuses. Kõigilt uuringusse kaasatud isikutelt võeti peale selle eesmärkidest ning kasutatud meetoditest teavitamist kirjalik nõusolek uuringus osalemiseks. Genoomne DNA eraldati DNA väljasoolamisel põhinevat standardprotokolli kasutades ~7 ml täisverest ning saadud genoomne DNA lahustati ddH₂O-s. Eraldatud genoomse DNA kontsentratsioonid jäid vahemikku 150-1000 ng/ul. Täiendavalt saadi viie mees- ja viie naiskontrollindiviidi DNA-d SA TÜK Ühendlabori Meditsiinigeneetika Keskusest, kus teostati DNA-de eraldamine, kvaliteedikontroll ning tsütogeneetiline analüüs kromosoomide G-vöödistusel.

Tabel 5. Töös kasutatud patsiendid

Genoomne DNA	Kariotüüp	DNA päritolu
DNA 29743	46, XY	KNGI
DNA 29744	46, XX	KNGI
DNA 29745	46, XX	KNGI
A-2879	46,XX,Xp+ ish der(SHOX-, wcpX+,STS++,DXZ1+,PAR2+)	SA TÜK
22467	46, XY	Leuven
4160	46, XY	VAM perede kogum
4174	46, XX	VAM perede kogum
4175	46, XX	VAM perede kogum
4887	46, XX	VAM perede kogum
4890	46, XY	VAM perede kogum
4891	46, XX	VAM perede kogum

3.1.6 Analüüsitava DNA-ga filtrite valmistamine ja MAPH proovide hübriidsatsioon filtritele

3.1.6.1 Filtrite valmistamine

Kaks µg genoomset DNA-d denatureeriti 1,5 µl 1M NaOH lisamisega ning kanti 1 µl kaupa väikestele (~2×2 mm) nailonmembraani Hybond+ (GE Healthcare; Little Chalfont Buckinghamshire, UK) tükile, lastes membraanil iga kord kuivada. DNA immobiliseeriti,

töödeldes filtreid Stratalinkeris (Stratagene; La Jolla, CA, USA) mõlemalt poolt 55 mJ UV kiirgusega.

Kontrollfiltritele kanti DNA asemel ddH₂O.

3.1.6.2 MAPH proovide hübridisatsioon genoomsele DNA-le

Valmistatud filtreid prehübridiseeriti 65°C juures 2 tundi kuni üleöö 1 ml prehübridisatsioonilahuses [0,5M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.2); 7% SDS; 1mM EDTA; 100 µg/ml heeringa sperma DNA]. Seejärel asendati prehübridisatsioonilahus 200 µl sama koostisega lahusega koos sellele lisatud 2 µg 100°C juures denatureeritud inimese *Cot-1* DNA-ga (Roche, Basel, Switzerland). Inkubeeriti 65°C juures 1 tund.

Hübridisatsioonisegu, mis sisaldas ühe filtri kohta 2 ng igat *MAPH* proovi, 1 µg inimese *Cot-1* DNA-d (Roche), ning 20 pmooli PZA/PZB praimerit (Metabion) ja 20 pmooli UNI3/UNI5 (Metabion) sisaldavat blokeerimissegu, denatureeriti lisades ühe filtri kohta 4,5 µl 1M NaOH ning inkubeerides 37°C juures 1 min. Seejärel asetati hübridisatsioonisegu jääle ja lisati ühe filtri kohta 7 µl 1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.2), segati ning lisati filtritega tuubidesse. Hübridiseeriti 65°C juures üleöö. Kasutatud PZA/PZB ja UNI3/UNI5 järjestused on toodud tabelis 3.

Seejärel asendati hübridisatsioonilahus 1 ml prehübridisatsioonilahusega, eemaldati ning pesti filtreid seondumata ja mittespetsiifiliselt seondunud proovide eemaldamiseks 65°C juures, pesulahust pidevalt vahetades ~1 tunni vältel. Järjest kasutati kahte erinevat lahust: 500 ml 1. pesulahus (1× SSC; 1% SDS) ning 500 ml 2. pesulahus (0,1× SSC; 0,1% SDS). Pestud filtrid asetati Petri tassi servadele kuivama.

3.1.6.3 MAPH proovide amplifikatsioon

Filtril olevale genoomsele DNA-le seondunud *MAPH* proovid amplifitseeriti kahel järjestikusel *PCR*-i reaktsioonil.

Iga filter asetati eraldi *PCR*-i tuubi ning proovid denatureeriti filtritelt termotsükleris PTC-200 (MJ Research Inc) kasutades järgmist programmi: 5 tsüklit: denaturatsioon 94°C juures 1 min, praimerite seondumine ja süntees 70°C juures 1 min. 50 µl reaktsioonisegu sisaldas 1x *PCR* puhvrit [750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20; MBI Fermentas], 1 mM MgCl₂ (MBI Fermentas), 0.2 mM dNTP segu (MBI Fermentas), 7.5 pmooli PZA (Metabion) ja 7.5 pmooli PZB praimerit (Metabion), 2.5 U *Taq* DNA polümeraasi (MBI Fermentas) ja ddH₂O-d lõppmahuni. Kasutatud praimerjärjestused on toodud tabelis 3.

Teiseks amplifikatsiooniks kasutati 2 µl esimese *PCR*-i produkti ning järgmist programmi: denaturatsioon 94°C juures 5 min, 20 tsüklit: denaturatsioon 94°C juures 1 min,

praimerite seandumine ja süntees 70°C juures 1 min, lõppekstensioon 70°C juures 20 min. 20 µl reaktsioonisegu sisaldas 1x *PCR* puhvrit [750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20; MBI Fermentas], 1.8 mM MgCl₂ (MBI Fermentas), 0.2 mM dNTP segu (MBI Fermentas), 70 pmooli PZA (Metabion) ja 70 pmooli PZB praimerit (Metabion), 1 U *Taq* DNA polümeraasi (MBI Fermentas) ja ddH₂O-d lõppmahuni.

Ülejäänud esimese amplifikatsiooni produktid säilitati 4°C juures korduskatseteks.

3.1.7 MAPH proovide puhastamine ja märkimine

3.1.7.1 Kreveti aluseline fosfataas – Eksonukleas I töötlus

SAP-eksonukleas I töötlus tehti proovidele selleks, et *PCR*-il kasutamata jäänud nukleotiidid ja universaalsed praimerid edasiseid reaktsioone ei segaks. 20 µl amplifitseeritud *MAPH* proovidele lisati 1,5 U eksonukleas I (MBI Fermentas) ja 1,35 U *SAP* (*Shrimp alkaline phosphatase*; USB Corporation; Cleveland, OH, USA). Segu inkubeeriti 37°C juures 30 min, reaktsioon peatati, kuumutades 80°C juures 15 min.

Proovid puhastati *PCR*-i puhustuskiti (MoBio Laboratories Inc; Solana Beach, CA, USA) kasutades tootja poolt kaasa antud protokolliga järgi. Proovide maht viidi vaakumkontsentraatoril RVC 2-25 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; Saksamaa) 38,5 µl-ni.

3.1.7.2 5-(3-aminoallüül)- 2'- desoksüüridiin 5'- trifosfaatide (aa-dUTP) inkorporatsioon nick translatsioonil

50 µl nick translatsiooni reaktsiooni sisaldas 38,5 µl punktis 3.1.7.1 saadud proovi, 1x nick translatsiooni puhvrit [500 mM Tris-HCl (7.8), 50 mM MgCl₂, 100 mM 2-merkaptotetanool, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP], 0.02 mM aa-dUTP (MBI Fermentas), 0.05 µg veise seerumi albumiini (*BSA - Bovine Serum Albumine*; Promega; Madison, WI, USA), 2.5 U DNA Pol I ja 2 mU DNaa I (DNA Polümeraas I (0,5 U/µl)/DNaa I (0,4 mU/µl) ensüümisegu; Invitrogen Co). Reaktsioon segati kokku jääl.

Inkubeeriti 15°C juures 90 min termotsükleris PTC-200 (MJ Research Inc). Reaktsioon peatati, kuumutades 80°C juures 15 min ning hoiti toatemperatuuril 20 min.

Proovid puhastati *PCR*-i puhustuskomplekti (MoBio Laboratories Inc) kasutades vastavalt tootja protokollile ja kuivatati vaakumkontsentraatoril RVC 2-25 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH).

3.1.7.3 Fluorestseeruva märgise liitmine DNA ahelasse viidud aminoallüülrühmadele

Proovid lahustati 4,5 µl-s värskelt valmistatud 100 mM Na₂CO₃ lahuses (pH 9.0), mida oli DNA-s I-e inaktiveerimiseks enne 15 min 60°C juures kuumutatud. Lisati 4,5 µl värvilahust [Cy3 monoreaktiivne fluorestsentsmärgis (GE Healthcare; Little Chalfont Buckinghamshire, UK) lahustatud 45 µl-s 100% DMSO-s] ning inkubeeriti toatemperatuuril pimedas 1 tund. Vaba märke kustutamiseks lisati proovile 3,5 µl 4M hüdroksüülamiini (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Saksamaa) ning hoiti toatemperatuuril pimedas 15 min. Lisati 35 µl 100 mM NaOatsetaati (pH 5.2) ning puhastati, kasutades PCR-i puhastuskomplekti (MoBio Laboratories Inc), lisades 47,5 µl proovile protokollis ettenähtud viie mahu sidumispuhvri (*SpinBind buffer*) asemel 500 µl. Seejärel kuivatati proovid vaakumkontsentraatoril RVC 2-25 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH).

3.1.8 MAPH proovide hübridisatsioon mikrokiibile

Valmistati ning degaseeriti 5 min järgmised lahused: eelpesulahus (6x SSC, 0.5% SDS); 1. lahus (2x SSC, 0.03% SDS); 2. lahus (1x SSC); 3. lahus (0.2x SSC).

Iga märgistatud proov lahustati 80 µl-s degaseeritud hübridisatsioonipuhvris (50% formamiid, 6x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt'i lahus). Hübridisatsioon teostati kasutades automatiseeritud hübridiseerimismasinat HS-400 (Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Austria) ning järgmist programmi:

1. Klaaside pesemine eelpesulahusega 85°C juures 1 min, leotus 30 s.
2. Proovide süstimine mikrokiipidele 60°C juures.
3. Denatureerimine 95°C juures 5 min.
4. Hübridiseerimine 42°C juures 8 tundi, keskmine segamissagedus.
5. Pesemine 42°C juures 1.5 min kasutades 1. lahust, leotus 30 s, 3 tsüklit.
6. Pesemine 42°C juures 1.5 min kasutades 2. lahust, leotus 30 s, 3 tsüklit.
7. Pesemine 42°C juures 1.5 min kasutades 3. lahust, leotus 30 s, 3 tsüklit.
8. Klaaside kuivatamine N₂-ga, 30°C juures 1.5 min.

3.1.9 Mikrokiipide lugemine ja tulemuste analüüs

Mikrokiibid eemaldati hübridiseerimismasinaist ning skaneeriti Affymetrix 428 Array Scanner'it kasutades (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA). Ergastamiseks kasutati λ = 532 nm lainepikkusega HeNe laserit. Detekteerimisläve (*gain*) väärtuseks oli signaalide detekteerimisel 40.

Esmane pildianalüüs teostati arvutiprogrammi Genorama Basaller™ (Asper Biotech) kasutades. Fluorestsentsintensiivsused saadi taustintensiivsuse mahaarvutamiseega esialgsest fluorestsentssignaalist. Kuna iga märklaudjärjestus oli mikrokiibile kantud kahe kordusena, võeti lõplikuks fluorestsentsintensiivsuseks nende keskmine.

Järgnevas analüüsiks kasutati arvutiprogrammi OligoStat (Asper Biotech) modifikatsiooni MAPHStat, tulemuste edasiseks töötlemiseks ja visualiseerimiseks arvutiprogrammi Microsoft Excel (Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA).

Erinevatelt kiipidelt pärinevad tulemused normaliseeriti uuritavast piirkonnast väljapoole jäävate autosoomsete kontrollide järgi.

Viieteistkümnelt normaalse karüotüübiga naise DNA-lt ning viieteistkümnelt normaalse karüotüübiga mehe DNA-lt saadud andmete põhjal koostati kontrollpaneelid, mille vastu võrreldi uuritavad DNA-d koopiaarvu muutuste suhtes.

Kontroll DNA-delt saadud normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste põhjal leiti iga proovi kohta keskmine väärtus ning usaldusvahemik (*confidence interval, CI*). *CI* arvutatakse olemasolevast valimist saadud andmete alusel ning see annab hinnangulise vahemiku saadud keskmise väärtuse ümber, mille sisse tundmatu populatsiooniparameeter tõenäoliselt jääb (<http://www.cas.lancs.ac.uk>). Tõenäosuse, et *CI* näitab parameetri tõest väärtust, määrab intervallile valitud usaldusnivoo (*confidence level, CL*). Levinud *CL* väärtused on 0,90; 0,95 ja 0,99. Antud töös kasutati *CI* leidmisel *CL* väärtust 0,90, mis katab 90% normaalsest tihedusjaotusest s.t. tõenäosus, et väärtus jääb väljapoole antud vahemikku, on väiksem kui 0,1 (<http://www.stat.yale.edu>).

Uuritavalt DNA-lt saadud normaliseeritud fluorestsentsintensiivsusi kontrollpaneeliga võrreldes detekteeriti proovid, mille väärtused uuritavas DNA-s jäid väljapoole *CI*-d ning mida vaadeldi kui potentsiaalselt muutunud koopiaarvuga järjestusi.

3.2 MK-MAPH abil leitud aberratsioonide kinnitamine PCR-il põhinevatel meetoditel

3.2.1 RT-qPCR

MAPHDesigner'it (<http://bioinfo.ebc.ee/maphdesigner>) kasutades disainiti unikaalsed praimerjärjestused regioonidesse, mis jäävad MK-MAPH abil leitud aberratsiooni murdekohtadest proksimaalselt ja distaalselt. Samuti leiti inimese 1. kromosoomile spetsiifilised praimerjärjestused, mida kasutati normaliseerimisel. Praimerjärjestused on toodud lisas 1.

96 auguga mikrotiiterplaadil uuriti samaaegselt kolm erinevat lookust, millest üks on sisemine kontroll 1. kromosoomilt. Iga analüüs sisaldas negatiivset kontrolli, segu viielt tsütogeneetiliselt normaalse mehe DNA-lt, segu viielt tsütogeneetiliselt normaalse naise DNA-lt, patsiendi DNA-d ning normaalse naise DNA lahjenduste rida.

20 µl reaktsioonisegu sisaldas 1x ABsolute™ QPCR SYBR® Green ROX (500nM) Mix 'I (ABgene; UK), 20 pmooli 5' + 3' praimereid (Metabion), 5 µl genoomse DNA lahust ning ddH₂O lõppmahuni. Iga amplifitseerimisreaktsiooni teostati kolme kordusena.

Amplifikatsioon viidi läbi ABI 9700 Real Time system (Applied Biosystems, Foster City, USA) masinas, kasutades järgmist programmi: DNA polümeraasi aktiveerimine 95°C juures 10 min; 40 tsüklit: denaturatsioon 95°C juures 15 s, praimerite seondumine ja süntees 60°C juures 1 min. Peale amplifitseerimist leiti iga PCR produkti jaoks sulamiskõver (*melting curve*), et kontrollida PCR reaktsiooni spetsiifilisust. Eksperiment teostati, kasutades absoluutset kvantifitseerimist standardkõvera meetodil (*absolute quantification by standard curves assay method*) (Mason et al., 2002).

Standardkõverad leiti iga uuritava lookuse jaoks eraldi, kasutades tsütogeneetiliselt normaalse naise genoomselt DNA-lt järgmiseid lähtekoguseid: 10ng – 5ng – 2.5ng – 1.25ng – 0.625ng reaktsiooni kohta. Saadud standardkõverat kasutati normaalsete naiste ja meeste ning patsiendi DNA lähtekoguste määramiseks.

Erinevatelt mikrotiiterplaatidelt saadud tulemusi analüüsiti eraldi, kasutades SDS 2.2.2. tarkvara (Applied Biosystems). Tulemuste edasiseks töötlemiseks ja visualiseerimiseks kasutati arvutiprogrammi Microsoft Excel (Microsoft Corporation). Normaliseerimiseks kasutati sisemist kontrolli 1. kromosoomilt.

Selleks et hinnata DNA koopiaarvu igas lookuses, arvutati välja erinevate DNA proovide suhe. Kuna tegemist on X kromosoomiga, siis suhe mehe ja naise proovide vahel peab olema 0.5; deletsiooni puhul suhe normaalse mehe ja naispatsiendi proovide vahel on 1, normaalse naise ja naispatsiendi proovide vahel 2 jne.

3.2.2 Lookusspetsiifiline PCR

MK-*MAPH* analüüsil leitud X kromosoomi deletsioon meespatsiendil 22467 kinnitati lookusspetsiifilise PCR abil kasutades olemasolevaid MK-*MAPH* proovidele spetsiifilisi praimereid huvipakkuvast regioonist (X35, X34, X49, X52, X53, X55, X58, X60). Kasutatud praimerite järjestused on toodud lisatabelis 1 (Patsalis et al., 2007). Amplifitseerimisreaktsioonid viidi läbi samaaegselt, kasutades tsütogeneetiliselt normaalse mehe ja patsiendi DNA-d.

20 µl reaktsioonisegu sisaldas 1x *PCR* puhvrit [750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20; MBI Fermentas], 1.5mM MgCl₂ (MBI Fermentas), 0.3mM dNTP segu (MBI Fermentas), 20 pmooli 5' + 3'praimereid (Metabion), 1.5 U *Taq* DNA polümeraasi (MBI Fermentas) ning ddH₂O lõppmahuni.

Amplifitseerimine viidi läbi termotsükleris PTC-200 (MJ Research Inc), kasutades järgmist programmi: denaturatsioon 94°C juures 10 min; 25 tsükli: denaturatsioon 94°C juures 1 min, praimerite seondumine 67°C juures 1 min, süntees 72°C juures 1 min; lõppekstensioon 72°C juures 10 min.

Saadud produktid visualiseeriti geelelektroforeesil 1% agarosgeelil TBE puhvris (Naxo Ltd), millele oli lisatud etiidumbromiid. Produktid kanti geelile koos 1 µl 6× elektroforeesi puhvriga (0,2% broomfenool sinine; 0,2% ksüleen-tsüanool; 60% glütserool; 60 mM EDTA) (MBI Fermentas). Amplifitseerimisreaktsiooni käigus ei teki *PCR* produkti deletsioonile vastavatesse regioonidesse.

3.3 Kromosoomi aberratsioonide tuvastamine ja MK-MAPH tulemuste kinnitamine Illumina BeadStation platvormi abil

Lisaks MK-*MAPH* meetodile analüüsiti kõik antud töös esitatud patsientide (v.a. patsient nr. 22467) DNA proovid Illumina BeadStation abil (Illumina, Inc; San Diego, USA). Analüüs viidi läbi kasutades HumanHap300-Duo kiipe ja InfiniumTM II Assay katseplatvormi. Eksperimendid teostati vastavalt tootja protokollile (<http://www.illumina.com>). Kogu protseduuri põhietapid on järgmised:

1. Genoomse DNA (algkogus 750 ng) amplifitseerimine.
2. Amplifitseeritud DNA fragmenteerimine.
3. Amplifitseeritud DNA sadestamine.
4. Amplifitseeritud DNA resuspendeerimine.
5. BeadChip mikrokiipide ettevalmistamine.
6. DNA proovide hübridiseerimine BeadChip mikrokiipidele.
7. Proovide ekstensioon ja BeadChip mikrokiipide töötlemine.
8. BeadChip mikrokiipide pesemine ja skaneerimine Illumina BeadArray Reader skanneriga.

Saadud tulemuste analüüs teostati Illumina BeadStudio arvutitarkvara koosseisus olevate CopyNumberEstimate ja ChromoZone.NET programmide (<http://www.illumina.com>) abil. Esimene nendest arvutab välja koopiaarvu iga *SNP* jaoks. Teine leiab automaatselt võimalikud aberratsioonidega alad.

Aberratsioonid detekteeritakse, kasutades kahte parameetrit: logaritmi normaliseeritud signaaliintensiivsusest (*logR ratio*) ning allelisagedus (*AF, B allele frequency*). Mõlemad tulenevad kahe alleeli intensiivsuse andmete transformatsioonist, mille käigus leitakse normaliseeritud intensiivsuse väärtus (*R*) ning alleelide intensiivsuste suhe (θ). *LogR ratio* võrdleb uuritava DNA vastavaid normaliseeritud signaaliintensiivsusi oodatud intensiivsustega, mis on leitud uuritava DNA θ väärtuse ja kolme kanoonilise genotüübiklastri (AA, AB ja BB) põhjal. Kanoonilised genotüübiklastrid on koostatud ~120 normaalselt kontrollindiviidilt pärinevate andmete põhjal, mis on tootja poolt sisse viidud Illumina BeadStudio arvutiprogrammi. Lisaks kasutatakse kanoonilisi klastreid uuritava DNA θ väärtuse konverteerimiseks *AF*-ks. Need kaks parameetrit leitakse kõigi kiibil olevate *SNP*-de kohta ning kasutatakse aberratsioonide analüüsi alusena. DNA koopiaarvu analüüsi statistilise usaldusväärsuse tõstmiseks võetakse arvesse 10 järjestikuse proovi signaalide keskmine. Tulemuste interpreteerimisel arvestatakse mõlemat parameetrit. Näiteks iseloomustab duplikatsiooni *logR ratio* suurenemine (normaalse koopiaarvu puhul 0, duplikatsiooni puhul 0.5) ning heterosügootide jagunemine (*split*) kaheks klastriks (üks paikneb 0.67, teine 0.33 juures). Heterosügootse deletsiooni korral esineb langus *logR ratio* profiilis (-0.5) ning heterosügootide kadumine *AF* profiilis.

4 Tulemused

Antud magistritöö raames uuriti patsientide DNA proove submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks X kromosoomil, kasutades X kromosoomi spetsiifilist MK-*MAPH* platvormi. Samuti kinnitati leitud aberratsioone teiste meetoditega ning võimalusel leiti genotüüp-fenotüüp seoseid.

4.1 Xp22.2 duplikatsiooni poolt põhjustatud S-VAM-ga perekonna analüüs

Antud perekonna uuring teostati koostöös KNGI-ga, kust saadi kolme perekonnaliikme DNA proovid. Tervetel, suguluses mitteolevatel vanematel sündis neli VAM-ga poega, kellest on praeguseks ellu jäänud ainult üks. Lisaks oli neil üks fenotüübilt ja vaimselt arengult normaalne tütar, kes on leitud duplikatsiooni kandjaks. Haigetel poistel esines hüpotoonia, arengupeatus, düsmorfsed näojooned ja kardiovaskulaarsed probleemid. Kõigil esines erinevas astmes VAM, emotsionaalne rahutus ja kõneprobleemid.

Emal (DNA nr. 29744) tsütogeneetiline analüüs näitas potentsiaalse Xp22.2 duplikatsiooni esinemist, mida ta kandis üle oma järglastele. FISH analüüsi abil leidis kinnitust, et duplikatsioon on X kromosomaalse päritoluga. Edasine X kromosoomi iseloomustamine teostati FISH-i abil kasutades mitut Xp22.12-Xp22.3 regiooni katvat *BAC* kloonid.

Analüüs MK-*MAPH* platvormiga kinnitas eelnevalt leitud duplikatsiooni olemasolu regioonil Xp22.2 ning lisaks sellele võimaldas täpsemalt määrata aberratsiooni suuruse (~9 Mb). DNA nr. 29743 (poeg) analüüsil saadud signaalide normaliseeritud fluorestsentsintensiivsusi võrreldi viieteistkümne tsütogeneetiliselt normaalse mehe DNA-de analüüsitulemuste alusel koostatud kontrollpaneeliga ning detekteeriti proovid, mille väärtused jäid väljaspoole usaldusvahemikku (lisa 2). Sama protseduuri teostati DNA-dega nr. 29744 (ema) ja 29745 (tütar), kasutades võrdluseks viieteistkümne tsütogeneetiliselt normaalse naise DNA-de analüüsitulemuste alusel koostatud kontrollpaneeli (lisa 3 ja 4). Analüüsides tulemusel leiti, et väljaspoole *CI*-90% jäävad proovid on vahemikus X77 kuni X155.

Kõigi selle perekonna liikmete DNA proovidega teostati veel lisaks kogu genoomi analüüs Illumina katseplatvormil. FISH-iga ja MK-*MAPH* meetodi abil leitud ja kinnitatud Xp22.2 duplikatsioon oli Illumina'ga hästi detekteeritav (lisa 5, 6 ja 7). Lisaks sellele leiti muutused DNA koopiaarvus ka teistes genoomi piirkondades: 33, 35 ja 52 muutust vastavalt DNA-s nr. 29743, 29744 ja 29745. Sarnased koopiaarvu muutused esinesid kõigil analüüsitud perekonnaliikmetel neljas lookuses (1q24.2-24.3, 10q11.22, 10q22.2 ning 17q21.31). Lisaks

esines emal (DNA nr. 29744) ja tütrele (DNA nr. 29745) viis kattuvat kromosoomimuutust; emal ja pojale (DNA nr. 29743) neli ning tütrele ja pojale vastavalt üks kattuv kromosoomimuutus.

4.2 Kasvu peetuse ja Turner'i sündroomi tunnustega patsiendi A-2879 analüüs

Naispatsient nr. A-2879 DNA proov saadi analüüsimiseks SA TÜK Meditsiinigeneetika Keskusest. Tegemist on tervete veresuguluses mitteolevate vanemate esimese lapsega, kellel varases arengus probleeme ei esinenud. Esimest korda pöördus ta paanikahäire tõttu psühhiaatri juurde 5.-6. eluaastal. 11-aastaselt diagnoositi patsiendil sekundaarselt generaliseerunud fokaalne epilepsia. Fenotüübis esineb patsiendil lühike kasv ja mõned Turner'i sündroomile iseloomulikud tunnused.

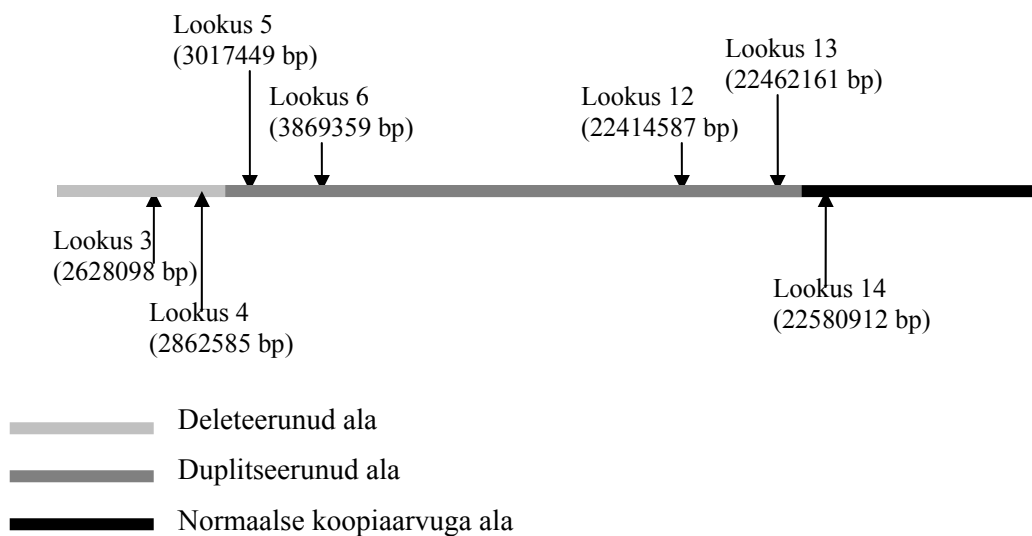
Tsütogeneetiline analüüs kromosoomide G-vöödistusel näitas karüotüüpi 46,XX,Xp+. Täiendava Dresdeni Ülikooli tsütogeneetika ja molekulaartsütogeneetika laboris dr. Bartschi'i poolt tehtud FISH uuringuga leiti, et tegemist on keerulise ümberkorraldusega X kromosoomi lühikese õla distaalses alas. X kromosoomi distaalne osa (Xp22.33) on deleteerunud (k.a. kromosoomi otsa lähedal paiknev *SHOX* geen). Deletsioonist proksimaalselt paikneb *STS* geeni sisaldav Xp22.3 segmendi duplikatsioon.

Rakendades MK-*MAPH* analüüsi leitud duplikatsiooni suuruse määramiseks näidati, et duplitseerunud ala hõlmab suurema regiooni (Xp22.32-p22.11), kui oli eeldatud FISH tulemuste põhjal. Tehtud eksperimentid näitasid, et fluorestsentsintensiivsused ületasid CI-90% X21 – X178 proovide kohal, mis annab duplikatsiooni suuruseks ~18.5 Mb (lisa 8). Täiendav FISH analüüs, mille jaoks kasutati *STS* geenispetsiifilist proovi ning kromosoomvõetidele Xp22.32-p22.11 vastavaid *BAC* ja *PAC* kloone, kinnitas MK-*MAPH* platvormiga määratud duplikatsiooni pikkust.

Meie praeguste MK-*MAPH* proovide puhul on Xp terminaalne ala sisse, kuhu lokaliseerub ka positsioonis ~0.5 Mb paiknev *SHOX* geen, disainitud vaid 5 proovi. Seetõttu ei olnud esialgse FISH-iga detekteeritud deletsioon hetkel kasutatava MK-*MAPH* platvormiga nähtav.

Patsiendil esineva kromosoomimuutuse detailsemaks kirjeldamiseks kasutati *RT-qPCR* meetodit. Selleks disainiti praimerid aberratsiooni murdepunktide lähiümbrustesse. Kontrollidena kasutati segusid viielt tsütogeneetiliselt normaalse mehe DNA-lt ning viielt tsütogeneetiliselt normaalse naise DNA-lt. Endogeense kontrollina kasutati normaalse koopiaarvuga regiooni 1. kromosoomilt. Aberratsiooni murdekohad pandi paika ~100 kb täpsusega. Murdekoht kromosoomi distaalse osa deletsiooni ning sellest proksimaalselt paikneva duplikatsiooni vahel

asub 2 862 585 ja 3 017 449 bp vahel. Duplikatsiooni proksimaalne murdepunkt asub 22 462 161 ja 22 580 912 bp vahel. Siit tulenevalt on ~3 Mb kromosoomi Xp otsast deleteerunud ning duplitseerunud segmendi suuruseks on ~19.4 - 19.7 Mb (joonis 3).



Joonis 3. *RT-qPCR* abil määratud aberratsiooni murdekohad patsiendil A-2879.

Patsiendi nr. A-2879 DNA proovi analüüsiti ka Illumina platvormi abil. Analüüsiks kasutatud HumanHap300-Duo kiipide puhul ei ole X kromosoomi lühikesel lõlul terminaalne ots markeritega kaetud. Selle tagajärjel ei olnud teiste meetoditega kindlaks tehtud Xp deletsioon Illumina'ga detekteeritav (lisa 9). Küll aga näitas eksperimendi tulemus, et tegemist võib olla veel keerulisema aberratsiooniga kui algsest arvati. Xp22.32-p22.11 regioonil esinev duplikatsioon algab Illumina andmetel positsioonist 3 968 598 ning lõpeb 22 678 212 bp juures. Sellele eelneb aga 5-6 koopiaga ala (3 113 318 – 3 659 902 bp), mis oli detekteeritav kasutades parameetriks nii alleelisagedust kui ka *logR ratio*. Samal ajal vajab nimetatud leid kinnitamist teisi meetodikaid kasutades.

4.3 1.5 Mb deletsiooni tuvastamine patsiendil 22467

Meespatsient nr. 22467 kandis X kromosoomil meile teadmata asukohaga ~1.5 Mb suurust deletsiooni. Patsiendi DNA proov saadi Leuveni Ülikooli Inimesegeneetika Keskusest, kus oli teostatud ka eelnev analüüs.

Teostatud MK-*MAPH* eksperimendid näitasid, et fluorestsentsintensiivsused jäid *CI*-90%-st madalamale tasemele X49 – X55 proovide kohal, mis tähendab, et antud regioonil esineb

patsiendil deletsioon (lisa 10). Järeldamine dr. Vermeesch`ilt Leuveni Ülikoolist kinnitas, et tegemist on X kromosoomi lühikese õla ~1.5 Mb deletsiooniga.

MK-*MAPH* abil leitud deletsioon kinnitati lookusspetsiifilise *PCR*-iga kasutades olemasolevaid MK-*MAPH* proovidele spetsiifilisi primereid huvipakkuvast regioonist (X35, X34, X49, X52, X53, X55, X58, X60). Amplifitseerimine proovidele X49, X52, X53 ja X55 vastavate primeritega ei andnud *PCR* produkti patsiendi DNA korral. Amplifitseerimine deletsiooni murdekohast proksimaalselt paiknevatele proovidele X58 ja X60 vastavate primeritega ning deletsiooni murdekohast distaalselt paiknevatele proovidele X34 ja X35 vastavate primeritega andis normaalse *PCR* produkti (lisa 11).

4.4 Kahe Eestist pärit VAM-ga perekonna analüüs

Järgnevalt analüüsiti MK-*MAPH* platvormiga kahte idiopaatilise VAM-ga perekonda Eestist. Esimesest (I) perekonnast uuriti kolme indiviidi: nr. A4175 (ema), nr. A4174 (tütar) ja nr. A4160 (poeg). Kõigil esineb VAM ning mikroanomaaliaid (nt. osaline epikantus, düsmorfed kõrvallestad jt.). Ema ühel vennal on puue, samuti on uuringusse haaratud lastel erinevad isad, mis annab alust oletada, et tegemist võib olla X kromosoomi defekti poolt põhjustatud seisundiga. Kromosoomanalüüs ei selgitanud välja haiguse põhjust.

Teisest (II) perekonnast on uurimisobjektideks järgmised indiviidid: nr. A4891 (ema), nr. A4887 (tütar) ja A4890 (poeg). Emal ja pojalt on diagnoositud VAM, tütar on normintellektiga. Kõigil esinevad lisaks mõned mikroanomaaliad (nt. kõrgem suulagi, rullunud heeliksiga kõrvad jt.). Perekonna anamneesi põhjal oletati, et tegemist võib olla XL-VAM-ga. Patsientidele tehtud kromosoomide analüüs G-vöödistusel ei tuvastanud aberratsioone.

I perekonda kuuluvatel indiviididel nr. A4174 ja A4160 ei olnud statistiliselt olulised muutused MK-*MAPH* abil detekteeritavad. Küll aga leiti naispatsiendi nr. A4175 X kromosoomil ~2 Mb-suurune, proove X0556 – X521 hõlmav deletsioon. Samasugune deletsioon tuvastati ka II VAM perekonda kuuluval isikul nr. A4887, kes on tegelikult terve (lisa 12). Teistel MK-*MAPH* abil analüüsitud II perekonna indiviididel (DNA nr. A4890 ja A4891) seda ei esinenud.

Lisaks analüüsiti kõigi indiviidide DNA proovid Illumina platvormiga ning kinnitati deletsiooni esinemine isikutel nr. A4175 ja A4887. Kirjeldatud deletsioon oli nähtav alleelisagedust parameetrina kasutatava ChromoZone.NET programmi (<http://www.illumina.com>) abil. Muutused DNA koopiaarvus detekteeriti ka teistes genomiregioonides, k.a. X kromosoomil.

5 Arutelu

5.1 MK-MAPH tulemuste analüüs ning võrdlus teiste meetodite abil saadud tulemustega

Teostatud eksperimendid näitasid, et TÜ MRI Biotehnoloogia õppetoolis välja töötatud MK-MAPH tehnoloogia sobib nii haigustega seotud kui ka fenotüübiliselt mitteavalduvate submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks. Samuti on MK-MAPH abil saadud tulemused võrreldavad teiste meetodite abil saadutega.

S-VAM-ga perekonda kuuluvate indiviidide nr. 29743, 29744 ja 29745 uurimise käigus detekteeriti ~9 Mb-suurune Xp22.2 duplikatsioon. Antud muutus näidati kõigepealt kromosoomivöödistuse ja FISH analüüsi abil. Seejärel kinnitati ning pandi paika aberratsiooni murdekohad MK-MAPH ja Illumina analüüsi käigus. Teostatud uuringute põhjal tehti kindlaks, et nimetatud patsientidel asub duplitseerunud ala X kromosoomi regioonide 9.78 – 18.83 Mb vahel. Uurides, kas nimetatud regioonis paikneb teadaolevaid VAM tekkega seotud geene, leiti, et kromosoomalades Xp22.13 ja Xp22.22 asuvad vastavalt geenid *NHS* (*Nance-Horan syndrome*; *MIM* 300457) ja *MIDI* (*Midline I*; *MIM* 300552), mille defekte seostati varem S-VAM-ga (<http://xlmr.interfree.it/home.htm>).

Lisaks kirjeldatud duplikatsioonile leiti Illumina katseplatvormi abil muutused DNA koopiaarvus ka teistes genoomi piirkondades, kusjuures osad muutused on sarnased erinevatel perekonnaliikmetel, mõned muutused kattuvad teiste uurimisgruppide poolt kirjeldatud *CNV*-dega. Võib oletada, et tegemist on fenotüübiliselt ja tsütogeneetiliselt normaalsetel indiviididel esinevate koopiaarvu variatsioonidega. Selleks, et vaadata, kas mõned analüüsi käigus tuvastatud muutustest on varem kirjeldatud, võrreldi neid koopiaarvu variatsioonide andmebaasi (<http://projects.tcag.ca/variation/>) kantud *CNV*-dega. Leiti, et ligikaudu 27% analüüsi käigus detekteeritud regioonidest kattuvad osaliselt teiste uurimisgruppide poolt avaldatud *CNV*-dega. Selle põhjal võib arvata, et vähemalt osa antud perekonnaliikmetel leitud üksikutest muutustest kujutavad endast koopiaarvu variatsioone. Osa neist võiksid järglased pärida oma isalt, kelle DNA ei olnud analüüsiks kättesaadav, osa võib olla *de novo* muutused. Samuti vaadates antud regioonides esinevaid geene leiti, et ükski neist ei põhjusta teadaolevatel andmetel kirjeldatud fenotüüpi. Kuna leitud kromosoomimuutuste kinnitamiseks ei kasutatud teisi meetodikaid, ei ole praegu võimalik täpselt öelda, kas ülejäänud Illumina analüüsi käigus kindlaks tehtud muutunud koopiaarvuga lookused on samuti *CNV*-d või osa neist on tingitud analüüsi vigadest.

Üldiselt oli antud perekonna liikmetel Illumina katseplatvormi abil detekteeritud muutuste keskmine suurus ~272 kb, mis on vastavuses ka kirjanduse andmetega (Redon et al., 2006).

Patsiendi nr. A-2879 uurimiseks on kasutatud mitmeid erinevaid metoodikaid (kromosoomivöödistus, FISH, MK-*MAPH*, *RT-qPCR* ja Illumina), mille tulemusena on õnnestunud patsiendil esineva keerulise aberratsiooni detailne iseloomustamine. Pannes kokku erinevate analüüside tulemused on tehtud kindlaks, et X kromosoomi distaalne osa (Xp22.33) on deleteerunud ning deletsioonist proksimaalselt paikneb Xp22.32-p22.11 segmente hõlmav duplikatsioon, mille suuruseks on ~19.4 - 19.7 Mb. Lisaks detekteeriti Illumina platvormiga duplikatsioonile eelneva 5-6 koopiaga ~500 kb-suuruse ala, mis ei olnud nähtav teiste meetoditega. Selle põhjuseid on mitmeid: esiteks MK-*MAPH* tehnoloogia ei võimalda detekteerida muutunud regiooni täpset koopiaarvu. Signaaliintensiivsused näitavad vaid, kas tegemist on regiooni kadumise, lisandumise või normaalse koopiaarvuga. Teiseks *RT-qPCR*-i abil ei olnud nimetatud amplifikatsioon samuti detekteeritav, sest antud ala sisse ei olnud praimerjärjestusi valitud. Samuti erinevad *RT-qPCR* ja Illumina abil leitud duplikatsiooni proksimaalse murdekoha positsioonid (vastavalt, 22 580 912 ja 22 678 212 bp). See asjaolu on põhjustatud Illumina tulemuste analüüsi iseärasustest - arvesse võetakse 10 lähestikku paiknevat proovi, mis koos annavadki ~100 kb-pikkuse regiooni. Vaadates, kas kirjeldatud kromosoomi alas asub fenotüübile mõju avaldavaid gene leiti, et tänapäevaks ei ole seal kirjeldatud ühtegi geeni. Seetõttu ei ole kahe analüüsi tulemuste erinevus nii kriitiline.

Lisaks vaadati, milliseid MK-*MAPH*, *RT-qPCR* ja Illumina analüüsi käigus tuvastatud X kromosoomi aberratsiooni regioonis paiknevaid gene võib seostada patsiendil nr. A-2879 esineva fenotüübiga. Xp22.33 deletsiooni piirkonnas paikneb *OMIM* andmebaasi andmetel 11 geeni, millest kuus on teadmata funktsiooniga. Kaks geeni 11-st võivad avaldada mõju patsiendi fenotüübile: lühikese kasvu eest vastutav *SHOX* (*short stature homeobox*; *MIM* 312865) geen ja Turner'i sündroomiga patsientidel neurokognitiivse fenotüübi häireid põhjustav *VSPA* (*visuospatial/perceptual abilities*; *MIM* 313000) geen. Kromosoomvöote Xp22.32-p22.11 hõlmav duplitseerunud regioon sisaldab vähemalt 93 geeni, millest 49 jaoks on funktsioon praeguseks teadmata (*OMIM*). Raske oletada, milliste geenide üleekspressioon antud regioonis võib avaldada mõju patsiendi fenotüübile. Siiski vähemalt kaks nendest: *MEHMO* (*mental retardation, epileptic seizures, hypogonadism and hypogonitalism, microcephaly and obesity*; *MIM* 300148) ja *ARX* (*aristaless-related homeobox*; *MIM* 300382) geenid, on seotud epileptiliste hoogudega, mis esinesid antud patsiendil.

Patsiendi nr. 22467 analüüsi näitel demonstreeriti MK-*MAPH* tehnoloogia võimet tuvastada väikeseid tavapärase tsütogeneetiliste meetodite poolt detekteerimata jäänud muutusi. Pimekatse käigus leiti patsiendil 1.5 Mb-suurune Xp22.31 deletsioon, mida kinnitati

lookusspetsiifilise PCR-i abil. *OMIM* andmebaasi andmetel paikneb tuvastatud regioonis 3 geeni. Nendest ühte – *STS* (*steroid sulfatase*; *MIM* 308100) geeni – võib seostada patsiendi fenotüübi kujunemisega. *STS* geeni mutatsioonid põhjustavad X-liitelist ihtüoosi, samuti on kirjeldatud mõnel patsiendil selle seost VAM-ga, niiöelda järjestikuste geenide sündroomiga (*contiguous gene syndrome*) seoses.

Järgnevalt teostati *MK-MAPH* analüüs kahele idiopaatilise VAM-ga perekonna liikmetele, kelle DNA proovid koguti Dr. Helen Puusepp'a doktoritöö raames. Antud kollektsiooni kogumiseks valiti perekondliku vaimse arengu mahajäämusega indiviidid, kellel uuringud, mida rutiinselt tehakse VAM põhjuste väljaselgitamiseks, on olnud normis (kromosoomanalüüs, Fragiilse X ja Angelmani sündroomi DNA test, ainevahetusuuringud, jne), samuti viitab perekonna anamnees X-liitelisele pärilikkusele (Puusepp, 2007). *MK-MAPH* analüüsi käigus ei õnnestunud patsientidel leida seost genotüübi ja fenotüübi vahel. Samal ajal tuvastati kahel erinevatesse perekondadesse kuuluval naisindiviidil ~2 Mb-suurune Xp11.1 deletsioon, mis ei olnud G-vöödistuse analüüsi abil detekteeritav. Antud aberratsioon kinnitati Illumina analüüsiga ning näidati, et teistel perekonnaliikmetel seda tüüpi deletsiooni ei esine. See asjaolu ning ka fakt, et üks deletsiooni kandvatest naisindiviididest on terve, annab alust oletada, et tegemist on VAM-ga mitteseotud *CNV*-ga. Võrreldes tuvastatud muutust andmebaasi (<http://projects.tcag.ca/variation/>) sisse kantud *CNV*-dega leiti, et antud kromosoomi piirkonnas on *CNV*-de esinemine kindlaks tehtud ka teiste uurimisgruppide poolt (Iafrate et al., 2004; Redon et al., 2006; Tuzun et al., 2005). *OMIM* andmebaasi andmetel leidub deleteerunud regioonis üheksa geeni, millest viie funktsioon on teadmata. Ühegi antud regioonis kirjeldatud geeni alaekspressioon teadaolevatel andmetel fenotüübile mõju ei avalda.

Analüüsides antud perekondade DNA proove Illumina platvormi abil, leiti lisaks teisi koopiaarvu muutusi, millest mõned paiknevad X kromosoomil. *MK-MAPH* ei suutnud neid detekteerida, kuna keskmine X kromosoomil leitud muutunud koopiaarvuga regiooni suurus oli ~170 kb, mis jääb alla *MK-MAPH* teoreetilist lahutusvõimet ~300 kb (Patsalis et al., 2007). Lisaks ei olnud tuvastatud regioonid *MAPH* proovidega piisavalt tihedalt kaetud. Tavaliselt oletatakse *MK-MAPH* puhul, et regiooni koopiaarv on muutunud, kui kolme lähestikku paikneva proovi signaaliintensiivsused on väljaspool *CI-90%*. Selle tagajärjel võivad *MAPH* proovide vahel asuvad väga väikesed muutused jääda detekteerimata.

5.2 MK-MAPH platvormi kasutamine DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks

DNA koopiaarvu muutuste määramiseks kasutatavate tsütogeneetiliste meetodite kiire areng on näidanud submikroskoopiliste muutuste tähtsat rolli geneetiliste haiguste (k.a. vaimse arengu mahajäämus) tekkimisel. On näidatud, et ~15% teadmata etioloogiaga VAM juhtude põhjuseks võivad olla mikrodeletsioonid või mikroduplikatsioonid (Knight and Flint, 2000).

Viimastel aastatel on välja töötatud ning edukalt kasutatud mitmeid MK-VGH platvorme kogu genoomi (Ishkanian et al., 2004; Vissers et al., 2003), spetsiifiliste kromosoomide (Buckley et al., 2002) ja kindlate kromosoomi regioonide (Mantripragada et al., 2003) skriinimiseks ning submikroskoopiliste geneetiliste anomaaliate tuvastamiseks. MK-VGH platvormid erinevad oma tundlikkuse, spetsiifilisuse, analüüsi hinna ja lahutusvõime poolest. Viimased arendused MK-VGH valdkonnas võimaldavad saavutada lahutusvõimet kuni 30 kb (Selzer et al., 2005). Samal ajal piiravad MK-VGH laialdast kasutamist mõned tehnilised probleemid, nagu näiteks vajadus korduvalt analüüsida normaalseid DNA proove ning kordusjärjestuste esinemine mikrokiibile hübriidiseeritavas materjalis, mis on tingitud inimese genoomse DNA suurest kompleksisusest.

Inimese genoomse DNA kompleksisuse vähendamiseks on välja töötatud mitmed strateegiad, k.a. klassikaline *MAPH* (Armour et al., 2000), *MLPA* (Schouten et al., 2002) ja *ROMA* (Lucito et al., 2000), mille rakendamine võimaldab detekteerida väga väikeseid DNA koopiaarvu muutusi. *MAPH* ja *MLPA* meetodite lahutusvõime sõltub kasutatud proovide pikkusest (~100-600 bp). Puuduseks on ühe eksperimendi käigus analüüsitavate lookuste piiratud arv (Hollox et al., 2002a), samuti eeldus, et on olemas eelnev informatsioon uuritava genoomse regiooni kohta.

Klassikalise *MAPH* meetodi liitmine mikrokiibi platvormiga võimaldaks ühendada nende eelised ning vältida eelnevalt nimetatud piiranguid (Hollox et al., 2002a; Patsalis et al., 2005). Kaks sõltumatut uurimisgruppi on rakendanud antud võimalust (Gibbons et al., 2006; Patsalis et al., 2007). Kuigi mõlema publitseeritud MK-*MAPH* meetodi eesmärgiks on läbilaskevõime tõstmine, on vaid X kromosoomi spetsiifilise MK-*MAPH* puhul näidatud ühe analüüsi käigus suure arvu (~700) proovide kasutamine (Patsalis et al., 2007).

Antud X kromosoomi spetsiifiline platvorm ning uus mikrokiibipõhine meetod MK-*MAPH* töötati välja kromosoomiaberratsioonide tuvastamiseks X kromosoomil teoreetilise lahutusvõimega ~300 kb (Patsalis et al., 2007).

Inimese X kromosoomi seostatakse paljude geneetiliste haigustega, k.a. XL-VAM-ga, mis moodustades üle 10% kõigist VAM juhtudest (Stevenson and Schwartz, 2002) pakub suurt huvi

nii arstidele kui ka geneetikutele. See asjaolu tingis vajaduse välja arendada X kromosoomile spetsiifilise platvormi X-liiteliste geneetiliste haigustega seotud koopiaarvu muutuste detekteerimiseks. MK-VGH meetodile välja töötatud X kromosoomi spetsiifilised mikrokiibid XL-VAM patsientide uurimiseks (Bauters et al., 2005) on juba näidanud oma kasulikkust teaduslikes ja kliinilistes uuringutes. Kuid nagu on eespool mainitud, võib nende kasutamisel esineda mitmeid meetodilisi probleeme, mida on püütud lahendada MK-MAPH abil.

MK-MAPH puhul kasutatavate proovide valimise printsiibid annavad meetodile olulisi eeliseid. Analüüsiks valitud proovide unikaalsus tagab MK-MAPH tehnoloogia kõrge spetsiifilisuse ja tundlikkuse, tänu selle et uuritavale genoomsele DNA-le hübriidiseeritavad proovid, mida kvantiseerimiseks rehübriidiseeritakse mikrokiibile, on 100% identsed kiibile spotitud märklaudjärjestustega. Lisaks sellele on MK-MAPH proovid pikemad, kui oligonukleotiid proovidel põhinevate mikrokiipide jaoks kasutatavad 25-50-meerid (Bignell et al., 2004; Peiffer et al., 2006). Seetõttu on MK-MAPH proovide märkimisel võimalik sinna lülitada rohkem fluorestsentsvärvi, produtseerides tugevamaid signaale. Samaaegselt lubab MAPH amplifitseeritavate proovide kasutamine vähendada uuritava materjali kompleksust ning järelkult suurendada mikrokiibi märklaudjärjestustele komplementaarsete proovide kontsentratsiooni. Selle tagajärjel muutub paremaks hübriidisatsiooni kineetika ja tõuseb fluorestsentssignaali ja taustaintensiivsuse vaheline suhe, mis on kriitiline usaldusväärsete andmete saamisel (Lucito et al., 2003; Mantripragada et al., 2004).

Märklaudfragmentidena võib bioinformaatilise analüüsi käigus valida proove peaaegu igast huvipakkuvast genoomi regioonist, k. a. kordusrikastest aladest, mis võivad olla olulised koopiaarvu muutuste seisukohalt (Mantripragada et al., 2004). Samuti võivad valitud proovid katta viimasel ajal suurt huvi äratanud *CNV* regioone (Iafate et al., 2004; Sebat et al., 2004). Analüüsi lahutusvõimet määravad mikrokiibile valitud fragmentide pikkus (400-600 bp) ning nendevaheline kaugus. Vajadusel on võimalik süsteemi lahutusvõimet tõsta, otsides ja lisades täiendavaid proove huvipakkuvatest regioonidest (Mantripragada et al., 2004). Samal ajal võivad väikesed deletsioonid/duplikatsioonid jääda detekteerimata, kui nad paiknevad geenikaardil mikrokiibi märklaudjärjestustena valitud proovide vahel.

Lisaks eespool kirjeldatud MK-MAPH analüüsisüsteemi eelistele pakub ta võimalust leitud koopiaarvu muutuste kinnitamiseks. Kõigepealt kehtib see meestel esinevate X kromosoomi deletsioonide korral. Proovispetsiifiliste praimerite kättesaadavus võimaldab kiiresti, lihtsalt ja soodsalt läbi viia tulemuste kinnitamist *PCR*-il põhinevate meetodite abil. Nii näiteks kasutati lihtsat lookusspetsiifilist *PCR* reaktsiooni patsiendil nr. 22467 MK-MAPH abil

detekteeritud deletsiooni kinnitamiseks. Vajadusel saab praimerite valimiseks välja töötatud arvutitarkvara (<http://bioinfo.ebc.ee/maphdesigner>) abil leida täiendavaid praimerjärjestusi huvipakkuvast regioonist ning täpsustada aberratsiooni murdekohad. Lisaks sellele demonstreeriti patsient nr. A-2879 näitel, et MAPHDesigner sobib ka praimerite valikuks *RT-qPCR* jaoks.

Nagu iga teise tehnoloogiaga, kaasnevad MK-*MAPH*-i kasutamisega mõned piirangud. Nende seas on analüüsiks kasutatava algmaterjali suhteliselt suur kogus (2 µg) ja kontsentratsioon (vähemalt 200 ng/µl). Samal ajal kasutatakse klassikalise *MAPH*-i puhul 0.5-1 µg (Armour et al., 2000), BAC/PAC kloonidel põhineva MK-VGH-i puhul 0.5 µg (de Vries et al., 2005) ja Illumina Infinium™ II Assay katseplatvormi puhul 0.75 µg (Peiffer et al., 2006) genoomset DNA-d. Kuid tuleb pöörata tähelepanu sellele, et 2 µg DNA-d on vaja ühe filtri valmistamiseks, mida saab kasutada ca 20 eksperimendi jaoks. See muudab korduskatsete tegemise lihtsamaks ja kiiremaks, võrreldes MK-VGH tehnoloogiaga ning samal ajal lubab uuritava materjali kokku hoida. Teiseks piiravaks teguriks on MK-*MAPH* proovide tundlikkus DNA saastusele, mis võib mõjutada signaalide suhet. Seepärast võimaliku saastusega DNA proovide uurimine, näiteks normaalse koe rakkudega saastunud tuumori biopsia, võib olla raskendatud MK-*MAPH* puhul.

Puuduseks on ka analüüsi käsitsi tehtava töö suhteliselt suur hulk, kuna *MAPH* amplifitseeritavate proovide valmistamine ning uuritava DNA märkimiseks ettevalmistamine on tömahukad ja aeganõudvad protsessid. Lisaks sellele võivad kahest hübriidsatsiooni etapist (üks filtril ning teine mikrokiibil) tulenevad võimalikud vead mõjutada lõpptulemust. Seda probleemi on võimalik osaliselt lahendada proovide *in silico* disainil valitud parameetrite abil, mis kindlustavad proovide ühtse pikkuse ja GC sisalduse võimaldades maksimaalselt optimiseerida *PCR*-i ja hübriidiseerimisetapid.

Asjaolu, et normaalse indiviidi ja patsiendi DNA proove hübriidiseeritakse erinevatel mikrokiipidel võib samuti avaldada mõju lõpptulemusele, tõstes varieeruvust kahe erineva hübriidsatsiooni vahel. Signaaliintensiivsused võivad erineda erinevatel kiipidel, seetõttu on analüüsi tulemuste normaliseerimine väga oluline. Teiselt poolt lähenedes võimaldab patsiendi materjali analüüsist saadud andmete võrdlus kontrollpaneeliga eksperimendi aega ja materjali kokku hoida, vältides normaalse indiviidi DNA korduvat analüüsimist. Lisaks sellele on fenotüübiliselt normaalsete inimeste DNA-s esinevate *CNV*-de (Iafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004) mõju tulemustele vähendatud normaalsete indiviidide DNA proovidest koostatud kontrollpaneeli kasutamisega.

Kokkuvõtteks ei ole meie poolt välja töötatud süsteemi kasutusvõimalused piiratud ainult X kromosoomi defektidega patsientide skriinimisega. Esitatud loogika abil proove disainides on võimalik katta ära kõiki inimese kromosoomi või kindlad genoomi regioone. Teostatud eksperimendid on näidanud, et MK-*MAPH* tehnoloogia võib leida kasutust anomaalse fenotüübiga patsientide skriinimisel, genotüüp-fenotüüp korrelatsiooni uuringutes ning geneetiliste variatsioonide uurimisel.

5.3 MK-*MAPH* protokollide modifitseerimine

Võrreldes Katrin Männik'u magistritöös kirjeldatuga (Männik, 2004) ja hiljem publitseerituga (Patsalis et al., 2007) on praegune MK-*MAPH* tehnoloogia protokoll muutunud lihtsamaks nii tehniliselt kui ajaliselt. Kõigepealt puudutab see proovide märkimisviisi.

Proovide märkimine on üheks kriitiliseks etapiks MK-*MAPH* tehnoloogia puhul, sest ta peab olema efektiivne, et anda mikrokiibile hübriidiseerides piisava tugevusega signaale. Klassikalise *MAPH* puhul märgitakse proovid amplifikatsiooni käigus, kasutades üht tavalist ja üht radioaktiivse- või fluorestsentsmärkega praimerit (Armour et al., 2000; Sismani et al., 2001). See märkimisviis on piisav, kui signaalitugevus hinnatakse geelil spetsiaalse aparatuuri abil, kuid ei ole efektiivne MK-*MAPH* korral (Männik, 2004). Esialgu kasutati MK-*MAPH* analüüsi puhul kaudset märkimist, viies *nick* translatsioonil, mille puhul oli nukleotiidisegus kogu dTTP asendatud aa-dUTP-ga, DNA ahelasse aminoallüülmodifikatsiooniga nukleotiidid ning liites neile seejärel Cy3TM fluorestsentsvärvi. See märkimismeetod võimaldab saada reprodutseeritavalt spetsiifilised ja analüüsiks piisava tugevusega signaale, kuid on samal ajal töömahukas ning tõstab kogu analüüsi hinda. Käesolevas töös üritati loobuda *nick* translatsioonist ning selle asemel lülitada aminoallüülmodifikatsiooniga dUTP-d *MAPH* proovidesse otse *PCR*-i käigus. Selleks kasutati amplifikatsioonil nukleotiidisegu, milles 50% dTTP-st asendati aa-dUTP-ga. On teada, et aa-dUTP lisamine *PCR* reaktsiooni alandab selle efektiivsust. Meie katsetes oli aga *PCR*-i saagis geelelektroforeesil kontrollides piisav ning lõpuks saadi ka proove mikrokiibile hübriidiseerides analüüsiks piisava tugevusega signaalid. Antud märkimismeetodit kasutati Eestist pärit VAM-ga perekondade analüüsiks. Teiste patsientide uurimiseks rakendati märkimine *nick* translatsiooni abil. Edaspidi on plaanis kasutada oluliselt vähem aega nõudvat ning odavamalt *PCR*-il põhinevat kaudset märkimisviisi.

Lisaks sellele on muutunud *MAPH* amplifitseeritavate proovide ja mikrokiibi märklaudjärjestuste valmistamise protokollid. Kui algselt amplifitseeriti nimetatud fragmendid otse glütseroolis külmutatud bakterikultuurist, siis praegu kasutatakse *PCR*-i reaktsioonil

puhastatud plasmiidset DNA-d. Selleks kasvatati bakterikultuurid ülesse, eraldati plasmiidne DNA ning loodi kloonipank. See tegevus lubab meil jääda täiesti sõltumatuks meie partneritest KNGI-s, kus teostati *MAPH* proovidenähtud järjestuste kloonimine.

5.4 Illumina BeadArray tehnoloogia kasutamine DNA uurimisel

Illumina Inc. eesmärgiks on uute tehnoloogiate välja töötamine ning rakendamine geneetilise varieeruvuse ja genoomi funktsioonide uurimiseks. Illumina pakub mikrokiibipõhiseid lahendusi probleemidele, mis olid veel mõne aasta eest lahenduseta. Mitmeid erinevaid mikrokiipe ja katseplatvorme on välja töötatud, mis võivad olla kohandatud mitmesuguste geneetiliste analüüside jaoks, k.a. *SNP* genotüpiseerimine, DNA koopiaarvu muutuste tuvastamine, geeniekspressiooni ja DNA metülatsiooni uuringud (<http://www.illumina.com>).

BeadArray mikrokiipide valmistamise tehnoloogia erineb tavapärasest oligonukleotiidsete mikrokiipide tootmisest. Üheks olulisemaks erinevuseks on asjaolu, et tavaliselt kas sünteesitakse oligonukleotiidid otse klaasile (Lucito et al., 2003) või spotitakse eelnevalt sünteesitud fragmendid kahemõõtmelisele kandjale (Barrett et al., 2004), kusjuures iga kiibielemendi asukoht on rangelt fikseeritud. Vastupidi, BeadArray tehnoloogia põhineb ränikuulikeste, kuhu on seondunud oligonukleotiidid, juhuslikul kokkupanekul substraadil. Sel juhul spetsiifilise kuulikese asukoha kaardistamine ja informatsiooni dekodeerimine on mikrokiibi tootmise protsessi üheks osaks (Fan et al., 2006b). Rakendatud tehnoloogia võimaldab oluliselt tõsta mikrokiibil leiduvate elementide hulka ning muuta katseplatvormi palju miniatuursemaks (Fan et al., 2006b). Illumina pakub kahte BeadArray mikrokiibi formaati: BeadChip mikrokiibid, kuhu kuuluvad ka antud töös kasutatud HumanHap300-Duo kiibid, ning Array Matrix mikrokiibid (<http://www.illumina.com>). Erinevate mikrokiipide ja katseplatvormide ühendamine võimaldabki läbi viia mitmesuguseid geneetilisi analüüse.

Käesoleva magistritöö raames kasutati DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks HumanHap300-Duo kiibid ja InfiniumTM II Assay katseplatvorm (Steemers et al., 2006). Antud mikrokiibid sisaldavad >318 000 tag *SNP*-d ning võimaldavad samaaegselt analüüsida kahte DNA proovi. Seda on efektiivne rakendada kasvajate uuringute puhul, kui tahetakse võrrelda ühe indiviidi normaalseid ja vähikudesid (Steemers and Gunderson, 2007). Mikrokiibi jaoks valitud *SNP*-d paiknevad geenikaardil üksteisest keskmiselt ~9-10 kb kaugusel, mis annab kogu süsteemi efektiivseks lahutusvõimeks ~90-100 kb. Üldiselt sobib BeadChip mikrokiibi ja InfiniumTM II Assay katseplatvormi kombinatsioon *SNP* genotüpiseerimiseks, DNA koopiaarvu muutuste

tuvastamiseks ning koopiaarvu seisukohalt neutraalsete sündmuste detekteerimiseks (Steemers and Gunderson, 2007).

5.5 Geneetilisteks uuringuteks kasutatavate tehnoloogiate kombineerimine

Antud töö raames teostatud katsed on näidanud, et geneetiliste haiguste põhjuste välja selgitamiseks on mõistlik kasutada mitmeid erinevaid meetodeid. Kombineerides omavahel vastavalt vajadusele ja püstitatud küsimustele traditsioonilisi ning molekulaarse tsütogeneetika tehnoloogiaid võib saavutada parimaid tulemusi geneetiliste ümberkorralduste analüüsil (Smeets, 2004; Speicher and Carter, 2005). Kiibipõhised tehnoloogiad (k.a. MK-VGH, MK-*MAPH*, Illumina) sobivad hästi genoomi esmaseks skriinimiseks (Rauch et al., 2006). Lookusspetsiifilised meetodikad (k.a. *RT-qPCR*, lookusspetsiifiline *PCR*, klassikaline *MAPH*) aitavad kromosoomimuutuseid detailsemalt iseloomustada. Nende kahe meetodite grupi poolt detekteerimata jäänud tasakaalustatud aberratsioonide tuvastamiseks võib kasutada tavapärasest kromosoomide diferentsiaalvärvimist ning FISH-i (Salman et al., 2004).

Katsesüsteemid mitme erineva analüüsi paralleelseks läbi viimiseks alles hakkavad tänapäeval arenema. Õige mikrokiibi ja katseplatvormi valik võimaldaks alandada saadud informatsiooni ühiku hinda, tõstes samal ajal analüüsi läbilaskevõimet. Üheks üllatuseks on fakt, et suurenenud katsesüsteemi kompleksus ei pruugi tulemuseks anda vähemkvaliteetseid andmeid (Fan et al., 2006a). Illumina näitel demonstreeriti, et kombineerides omavahel normaliseeritud signaaliintensiivsuse ning alleelisageduse võib multifunktsionaalse platvormi korral saavutada tundlikkuma ja täpsema andmete analüüsi (Peiffer et al., 2006). Selle tulemusena *SNP* genotüpiseerimiseks kasutatud süsteemide ümberdisainimine, mis võimaldab neid rakendada DNA struktuursete ja arvuliste muutuste uurimiseks, teeb ilmselt revolutsiooni inimese geneetikas (Fan et al., 2006a).

Tulevikus sisaldab ilmselt kogu genoomi analüüsistrateegia mitmete meetodite komplekti, mille seas on *SNP* genotüpiseerimine, epigeneetilised uuringud, DNA koopiaarvu analüüs, sekveneerimine ja geeniekspressioon (Steemers and Gunderson, 2007). Selle tagajärjel tekib vajadus erinevate meetodite abil saadud andmeid analüüsida, võrrelda ning interpreteerida. Näiteks hetkel kasutame me ainult osa Illumina eksperimentide käigus kogunenud informatsioonist, nimelt andmeid DNA koopiaarvu muutuste kohta. Samal ajal kõigi analüüsitud indiviidide jaoks on meil lisaks olemas genotüpiseerimisinfo, mida hiljem tuleb DNA struktuurse varieeruvusega kokku panna võimalikke seoste tuvastamiseks. Näiteks uurides 70 bp – 7 kb-

suuruseid *CNV*-d ning nende lähedal paiknevaid *SNP*-d leidsid Hinds koos kaaslastega (Hinds et al., 2006), et need geneetilise varieeruvuse vormid on omavahel ahelduses, mis viitab nende sarnasele evolutsioonile. Huvitav oleks ka uurida *CNV*-de ja *SNP*-de seost geeniekspressiooniga, mis võiks anda informatsiooni nende rollist inimpopulatsiooni fenotüübilises varieeruvuses. Üks taoline töö publitseeriti hiljuti Stranger jt. poolt (Stranger et al., 2007), kus leiti et 83,6% ja 17,7% kogu detekteeritud geeniekspressiooni erinevustest on tingitud vastavalt *SNP*-de ja *CNV*-de poolt.

Kokkuvõtteks, ilmselt hakatakse tulevikus teaduslikes uuringutes järjest rohkem rakendada katsesüsteeme mitme erineva analüüsi paralleelseks läbi viimiseks. Samal ajal on praegu veel raske öelda, kui efektiivsed võivad nad olla igapäevases kliinilises praktikas.

Kokkuvõte

DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks kasutatavate tsütogeneetiliste meetodite kiire areng on näidanud submikroskoopiliste muutuste tähtsat rolli geneetiliste haiguste, k.a. vaimse arengu mahajäämuse, tekkimisel. Vaimse arengu mahajäämist põhjustavad faktorid on väga heterogeensed ning umbes pooltel juhtudel on häire põhjus leidmata. Arvatakse, et suurel osal juhtudel võib vaimse arengu mahajäämuse teke olla seotud erinevates genoomipiirkondades esinevate submikroskoopiliste muutustega DNA koopiaarvus.

Inimese X kromosoomiga seostatakse üle 10% kõigist vaimse arengu mahajäämuse juhtudest, mis tingis vajaduse välja areneda katsesüsteem X-liitelise vaimse arengu mahajäämusega seotud DNA koopiaarvu muutuste detekteerimiseks. TÜ MRI Biotehnoloogia õppetoolis töötati välja X kromosoomi spetsiifiline platvorm ning uus mikrokiibil põhinev *multiplex amplifiable probe hybridisation* meetod (MK-MAPH), mis võimaldavad tuvastada X kromosoomil leiduvaid aberratsioone teoreetilise lahutusvõimega ~300 kb.

Käesoleva magistritöö raames uuriti patsientide DNA proove submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks X kromosoomil, kasutades X kromosoomi spetsiifilist MK-MAPH meetodit. Selleks viidi läbi katsed, võrreldes omavahel tsütogeneetiliselt normaalsete indiviidide DNA proove ning patsientidelt saadud DNA proove. Teostatud eksperimendid näitasid, et MK-MAPH tehnoloogia sobib nii haigustega seotud kui ka fenotüübiliselt mitteavalduvate submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks. MK-MAPH analüüsil kindlaks tehtud aberratsioonid suudeti kinnitada teisi meetodikaid (k.a. lookusspetsiifiline PCR, RT-qPCR ja Illumina) kasutades.

Saadud tulemused näitasid, et MK-MAPH tehnoloogia ning X kromosoomile vastav mikrokiip on piisavalt töökindlad ja tundlikud tundmatute submikroskoopiliste DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks ning tulevikus võib neid kasutada teaduslikes ja kliinilistes uuringutes X-liitelise vaimse arengu mahajäämuse põhjuste välja selgitamiseks ning DNA koopiaarvu variatsioonide detekteerimiseks.

Summary

Detection of submicroscopic DNA copy-number changes by array-based MAPH methodology.

Rapid advancement of high-resolution DNA copy number assessment methods revealed a significant contribution of submicroscopic genetic imbalances to the occurrence of abnormal phenotypes, including mental retardation. Underlying causes of mental retardation are extremely heterogeneous and the etiology remains unknown in about half of the cases. There are evidences that many of these idiopathic cases may be caused by submicroscopic deletions or duplications of unknown location in the human genome.

X-linked mental retardation accounts for over 10% of inherited mental retardation cases. Because of that it was very important to develop assays for detection of X-linked mental retardation causative changes in DNA copy number. Human chromosome X-specific array and array-based MAPH technology have been developed in Dept. of Biotechnology of IMCB at University of Tartu to detect submicroscopic DNA copy-number changes in chromosome X at theoretic resolution of 300 kb.

The aim of my research was to study DNA samples from patients revealing submicroscopic DNA copy-number alterations on chromosome X using chromosome X-specific array-based MAPH methodology. A series of control experiments have been carried out to compare cytogenetically normal female and male DNA samples with the genomic material from patients. The experimental results demonstrated that array-MAPH methodology is reliable for detection of disease-causative as well as phenotypically neutral copy-number changes. The aberrations found with array-MAPH were also confirmed by other technologies (locus-specific PCR, RT-qPCR and Illumina).

Experiments demonstrated that array-MAPH methodology and the chromosome X specific array are reliable for the high-resolution measurement of copy number changes and have the potential to be used as research and diagnostic tools for identifying the copy number alterations involved in X-linked mental retardation as well as for detection of genomic variations.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat dots. Ants Kurge ning prof. Andres Metspalu, kelle laboris antud töö teoks sai. Samuti dr. Helen Puusepa ja Katrin Männikut väärtuslike nõuannete ja kannatliku suhtumise eest. Tänan ka koostööpartnereid dr. Philippos Patsalist ja dr. Ludmila Kousoulidou Küprose Neuroloogia ja Geneetika Instituudist, prof. Maido Remmi ja Priit Paltat TÜ MRI bioinformaatika õpetoolist, dr. Katrin Õunapit SA TÜK Meditsiinigeneetika Keskusest, dr. Joris Vermeeschi Leuveni Ülikoolist Belgiast.

Lisaks kuuluvad südamlikud tänusõnad Sven Parkelile, Kristina Kormilitsinale, Korneelia Antonile, Priit Tomsonile ja Viljo Soole. Suur tänu ka kõigile teistele toredatele inimestele TÜ MRI Biotehnoloogia õpetoolist abi ja meeldiva töökeskkonna loomise eest.

Kasutatud kirjandus

- Akrami, S.M., Rowland, J.S., Taylor, G.R. and Armour, J.A. (2003) Diagnosis of gene dosage alterations at the PMP22 gene using MAPH. *J Med Genet*, 40, e123.
- Allen, K.M., Gleeson, J.G., Bagrodia, S., Partington, M.W., MacMillan, J.C., *et al.* (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 20, 25-30.
- Armour, J.A., Sismani, C., Patsalis, P.C. and Cross, G. (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res*, 28, 605-609.
- Barrett, M.T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., *et al.* (2004) Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17765-17770.
- Bauters, M., Van Esch, H., Marynen, P. and Froyen, G. (2005) X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet*, 48, 263-275.
- Bienvenu, T., Poirier, K., Friocourt, G., Bahi, N., Beaumont, D., *et al.* (2002) ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet*, 11, 981-991.
- Bignell, G.R., Huang, J., Greshock, J., Watt, S., Butler, A., *et al.* (2004) High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res*, 14, 287-295.
- Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M.C., *et al.* (1998) Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*, 392, 923-926.
- Buckley, P.G., Mantripragada, K.K., Benetkiewicz, M., Tapia-Paez, I., Diaz De Stahl, T., *et al.* (2002) A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet*, 11, 3221-3229.
- Buckley, P.G., Mantripragada, K.K., Piotrowski, A., Diaz de Stahl, T. and Dumanski, J.P. (2005) Copy-number polymorphisms: mining the tip of an iceberg. *Trends Genet*, 21, 315-317.
- Carrie, A., Jun, L., Bienvenu, T., Vinet, M.C., McDonnell, N., *et al.* (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 23, 25-31.
- Caspersson, T., Zech, L. and Johansson, C. (1970) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res*, 60, 315-319.
- Castellvi-Bel, S. and Mila, M. (2001) Genes responsible for nonspecific mental retardation. *Mol Genet Metab*, 72, 104-108.
- Chelly, J. (1999) Breakthroughs in molecular and cellular mechanisms underlying X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet*, 8, 1833-1838.
- Chelly, J. and Mandel, J.L. (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*, 2, 669-680.
- Chiurazzi, P., Tabolacci, E. and Neri, G. (2004) X-linked mental retardation (XLMR): from clinical conditions to cloned genes. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 41, 117-158.
- Croen, L.A., Grether, J.K. and Selvin, S. (2001) The epidemiology of mental retardation of unknown cause. *Pediatrics*, 107, E86.
- D'Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M., *et al.* (1998) Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet*, 19, 134-139.
- De Preter, K., Speleman, F., Combaret, V., Lunec, J., Laureys, G., *et al.* (2002) Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol*, 15, 159-166.
- de Vries, B.B., Pfundt, R., Leisink, M., Koolen, D.A., Vissers, L.E., *et al.* (2005) Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet*, 77, 606-616.

- Fan, J.B., Chee, M.S. and Gunderson, K.L. (2006a) Highly parallel genomic assays. *Nat Rev Genet*, 7, 632-644.
- Fan, J.B., Gunderson, K.L., Bibikova, M., Yeakley, J.M., Chen, J., *et al.* (2006b) Illumina universal bead arrays. *Methods Enzymol*, 410, 57-73.
- Feuk, L., Carson, A.R. and Scherer, S.W. (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*, 7, 85-97.
- Fiegler, H., Carr, P., Douglas, E.J., Burford, D.C., Hunt, S., *et al.* (2003) DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer*, 36, 361-374.
- Flint, J. and Knight, S. (2003) The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 310-316.
- Florijn, R.J., Bonden, L.A., Vrolijk, H., Wiegant, J., Vaandrager, J.W., *et al.* (1995) High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet*, 4, 831-836.
- Freeman, J.L., Perry, G.H., Feuk, L., Redon, R., McCarroll, S.A., *et al.* (2006) Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*, 16, 949-961.
- Freude, K., Hoffmann, K., Jensen, L.R., Delatycki, M.B., des Portes, V., *et al.* (2004) Mutations in the FTSJ1 gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*, 75, 305-309.
- Frints, S.G., Froyen, G., Marynen, P. and Fryns, J.P. (2002) X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin Genet*, 62, 423-432.
- Gecz, J., Gedeon, A.K., Sutherland, G.R. and Mulley, J.C. (1996) Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet*, 13, 105-108.
- Gecz, J. and Mulley, J. (2000) Genes for cognitive function: developments on the X. *Genome Res*, 10, 157-163.
- Gibbons, B., Datta, P., Wu, Y., Chan, A. and Al Armour, J. (2006) Microarray MAPH: accurate array-based detection of relative copy number in genomic DNA. *BMC Genomics*, 7, 163.
- Greydanus, D.E. and Pratt, H.D. (2005) Syndromes and disorders associated with mental retardation. *Indian J Pediatr*, 72, 859-864.
- Gu, Y., Shen, Y., Gibbs, R.A. and Nelson, D.L. (1996) Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nat Genet*, 13, 109-113.
- Hahn, K.A., Salomons, G.S., Tackels-Horne, D., Wood, T.C., Taylor, H.A., *et al.* (2002) X-linked mental retardation with seizures and carrier manifestations is caused by a mutation in the creatine-transporter gene (SLC6A8) located in Xq28. *Am J Hum Genet*, 70, 1349-1356.
- Harada, N., Hatchwell, E., Okamoto, N., Tsukahara, M., Kurosawa, K., *et al.* (2004) Subtelomere specific microarray based comparative genomic hybridisation: a rapid detection system for cryptic rearrangements in idiopathic mental retardation. *J Med Genet*, 41, 130-136.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-1030.
- Hinds, D.A., Kloek, A.P., Jen, M., Chen, X. and Frazer, K.A. (2006) Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet*, 38, 82-85.
- Hoebeeck, J., van der Luijt, R., Poppe, B., De Smet, E., Yigit, N., *et al.* (2005) Rapid detection of VHL exon deletions using real-time quantitative PCR. *Lab Invest*, 85, 24-33.
- Hollox, E.J., Akrami, S.M. and Armour, J.A. (2002a) DNA copy number analysis by MAPH: molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn*, 2, 370-378.

- Hollox, E.J., Atia, T., Cross, G., Parkin, T. and Armour, J.A. (2002b) High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet*, 39, 790-795.
- Iafate, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., *et al.* (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*, 36, 949-951.
- Inlow, J.K. and Restifo, L.L. (2004) Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics*, 166, 835-881.
- Ishkanian, A.S., Malloff, C.A., Watson, S.K., DeLeeuw, R.J., Chi, B., *et al.* (2004) A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet*, 36, 299-303.
- Jensen, L.R., Amende, M., Gurok, U., Moser, B., Gimmel, V., *et al.* (2005) Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*, 76, 227-236.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., *et al.* (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258, 818-821.
- Kalscheuer, V.M., Freude, K., Musante, L., Jensen, L.R., Yntema, H.G., *et al.* (2003) Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 35, 313-315.
- Kleefstra, T. and Hamel, B.C. (2005) X-linked mental retardation: further lumping, splitting and emerging phenotypes. *Clin Genet*, 67, 451-467.
- Kleefstra, T., Yntema, H.G., Oudakker, A.R., Banning, M.J., Kalscheuer, V.M., *et al.* (2004) Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet*, 41, 394-399.
- Knight, S.J. and Flint, J. (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet*, 37, 401-409.
- Knight, S.J., Regan, R., Nicod, A., Horsley, S.W., Kearney, L., *et al.* (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*, 354, 1676-1681.
- Kriek, M., White, S.J., Bouma, M.C., Dauwerse, H.G., Hansson, K.B., *et al.* (2004) Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet*, 41, 249-255.
- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A., Jantke, I., Nothwang, H.G., *et al.* (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 26, 247-250.
- Langer-Safer, P.R., Levine, M. and Ward, D.C. (1982) Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 4381-4385.
- Laumonier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., *et al.* (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet*, 74, 552-557.
- Lebel, R.R., May, M., Pouls, S., Lubs, H.A., Stevenson, R.E., *et al.* (2002) Non-syndromic X-linked mental retardation associated with a missense mutation (P312L) in the FGD1 gene. *Clin Genet*, 61, 139-145.
- Lee, J.A. and Lupski, J.R. (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron*, 52, 103-121.
- Li, W., Cui, Y., Kushner, S.A., Brown, R.A., Jentsch, J.D., *et al.* (2005) The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin reverses the learning and attention deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Curr Biol*, 15, 1961-1967.
- Lin, H., Pizer, E.S. and Morin, P.J. (2000) A frequent deletion polymorphism on chromosome 22q13 identified by representational difference analysis of ovarian cancer. *Genomics*, 69, 391-394.

- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4, 357-362.
- Locke, D.P., Seagraves, R., Nicholls, R.D., Schwartz, S., Pinkel, D., *et al.* (2004) BAC microarray analysis of 15q11-q13 rearrangements and the impact of segmental duplications. *J Med Genet*, 41, 175-182.
- Lockwood, W.W., Chari, R., Chi, B. and Lam, W.L. (2006) Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet*, 14, 139-148.
- Lucito, R., Healy, J., Alexander, J., Reiner, A., Esposito, D., *et al.* (2003) Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res*, 13, 2291-2305.
- Lucito, R., West, J., Reiner, A., Alexander, J., Esposito, D., *et al.* (2000) Detecting gene copy number fluctuations in tumor cells by microarray analysis of genomic representations. *Genome Res*, 10, 1726-1736.
- Lugtenberg, D., Yntema, H.G., Banning, M.J., Oudakker, A.R., Firth, H.V., *et al.* (2006) ZNF674: A New Kruppel-Associated Box-Containing Zinc-Finger Gene Involved in Nonsyndromic X-Linked Mental Retardation. *Am J Hum Genet*, 78, 265-278.
- Lupski, J.R. (1998) Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*, 14, 417-422.
- Lupski, J.R. and Stankiewicz, P. (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 1, e49.
- Mandel, J.L. and Chelly, J. (2004) Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet*, 12, 689-693.
- Mantripragada, K.K., Buckley, P.G., de Stahl, T.D. and Dumanski, J.P. (2004) Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet*, 20, 87-94.
- Mantripragada, K.K., Buckley, P.G., Jarbo, C., Menzel, U. and Dumanski, J.P. (2003) Development of NF2 gene specific, strictly sequence defined diagnostic microarray for deletion detection. *J Mol Med*, 81, 443-451.
- Mason, G., Provero, P., Vaira, A.M. and Accotto, G.P. (2002) Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol*, 2, 20.
- Massion, P.P., Kuo, W.L., Stokoe, D., Olshen, A.B., Treseler, P.A., *et al.* (2002) Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res*, 62, 3636-3640.
- McBride, S.M., Choi, C.H., Wang, Y., Liebelt, D., Braunstein, E., *et al.* (2005) Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a *Drosophila* model of fragile X syndrome. *Neuron*, 45, 753-764.
- McFadden, D.E. and Friedman, J.M. (1997) Chromosome abnormalities in human beings. *Mutat Res*, 396, 129-140.
- McNeil, N. and Ried, T. (2000) Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*, 2000, 1-14.
- Meloni, I., Bruttini, M., Longo, I., Mari, F., Rizzolio, F., *et al.* (2000) A mutation in the rett syndrome gene, MECP2, causes X-linked mental retardation and progressive spasticity in males. *Am J Hum Genet*, 67, 982-985.

- Meloni, I., Muscettola, M., Raynaud, M., Longo, I., Bruttini, M., *et al.* (2002) *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat Genet*, 30, 436-440.
- Merienne, K., Jacquot, S., Pannetier, S., Zeniou, M., Bankier, A., *et al.* (1999) A missense mutation in *RPS6KA3* (*RSK2*) responsible for non-specific mental retardation. *Nat Genet*, 22, 13-14.
- Männik, K. (2004) Inimese X kromosoomile spetsiifilise mikrokiibi väljatöötamine vaimse alaarenguga seotud DNA koopiaarvu submikroskoopiliste muutuste tuvastamiseks. *TÜ MRI, Biotehnoloogia õppetool*. Tartu Ülikool, Tartu, Vol. M.Sc, p. 99.
- Neri, G. and Opitz, J.M. (2000) Sixty years of X-linked mental retardation: a historical footnote. *Am J Med Genet*, 97, 228-233.
- Nokelainen, P. and Flint, J. (2002) Genetic effects on human cognition: lessons from the study of mental retardation syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72, 287-296.
- Oostlander, A.E., Meijer, G.A. and Ylstra, B. (2004) Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet*, 66, 488-495.
- Partington, M., Mowat, D., Einfeld, S., Tonge, B. and Turner, G. (2000) Genes on the X chromosome are important in undiagnosed mental retardation. *Am J Med Genet*, 92, 57-61.
- Patsalis, P.C., Kousoulidou, L., Männik, K., Sismani, C., Zilina, O., *et al.* (2007) Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization. *Eur J Hum Genet*, 15, 162-172.
- Patsalis, P.C., Kousoulidou, L., Sismani, C., Männik, K. and Kurg, A. (2005) MAPH: from gels to microarrays. *Eur J Med Genet*, 48, 241-249.
- Peiffer, D.A., Le, J.M., Steemers, F.J., Chang, W., Jenniges, T., *et al.* (2006) High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res*, 16, 1136-1148.
- Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., *et al.* (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20, 207-211.
- Pollack, J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., *et al.* (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 23, 41-46.
- Puusepp, H., Männik, K., Zilina, O., Parkel, S., Kurg, A., Õunap, K. . (2007) Vaimse arengu mahajäämuse geneetilised põhjused: X-liiteline vaimse arengu mahajäämus. *Eesti arst*, 86, 239 - 245.
- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., *et al.* (2006) Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*, 140, 2063-2074.
- Raymond, F.L. (2006) X linked mental retardation: a clinical guide. *J Med Genet*, 43, 193-200.
- Raymond, F.L. and Tarpey, P. (2006) The genetics of mental retardation. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R110-116.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., *et al.* (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444, 444-454.
- Renieri, A., Pescucci, C., Longo, I., Ariani, F., Mari, F., *et al.* (2005) Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. *J Cell Physiol*, 204, 8-20.
- Rooms, L., Reyniers, E. and Kooy, R.F. (2005) Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*, 25, 513-524.
- Ropers, H.H. (2006) X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 260-269.

- Ropers, H.H. and Hamel, B.C. (2005) X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*, 6, 46-57.
- Ropers, H.H., Hoeltzenbein, M., Kalscheuer, V., Yntema, H., Hamel, B., *et al.* (2003) Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet*, 19, 316-320.
- Salman, M., Jhanwar, S.C. and Ostrer, H. (2004) Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? *Clin Genet*, 66, 265-275.
- Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., *et al.* (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30, e57.
- Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., *et al.* (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273, 494-497.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexander, J., Young, J., *et al.* (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305, 525-528.
- Selzer, R.R., Richmond, T.A., Pofahl, N.J., Green, R.D., Eis, P.S., *et al.* (2005) Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, 44, 305-319.
- Shaffer, L.G. and Lupski, J.R. (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 34, 297-329.
- Sharkey, F.H., Maher, E. and FitzPatrick, D.R. (2005) Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child*, 90, 1264-1269.
- Sharp, A.J., Locke, D.P., McGrath, S.D., Cheng, Z., Bailey, J.A., *et al.* (2005) Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet*, 77, 78-88.
- Shaw-Smith, C., Redon, R., Rickman, L., Rio, M., Willatt, L., *et al.* (2004) Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*, 41, 241-248.
- Shaw, C.J., Shaw, C.A., Yu, W., Stankiewicz, P., White, L.D., *et al.* (2004) Comparative genomic hybridisation using a proximal 17p BAC/PAC array detects rearrangements responsible for four genomic disorders. *J Med Genet*, 41, 113-119.
- Shoichet, S.A., Hoffmann, K., Menzel, C., Trautmann, U., Moser, B., *et al.* (2003) Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*, 73, 1341-1354.
- Sismani, C., Armour, J.A., Flint, J., Girgalli, C., Regan, R., *et al.* (2001) Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet*, 9, 527-532.
- Smeets, D.F. (2004) Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem*, 37, 439-446.
- Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., *et al.* (2001) Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet*, 29, 263-264.
- Snijders, A.M., Pinkel, D. and Albertson, D.G. (2003) Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2, 37-45.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., *et al.* (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, 20, 399-407.

- Speicher, M.R. and Carter, N.P. (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6, 782-792.
- Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S. and Ward, D.C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*, 12, 368-375.
- Stankiewicz, P. and Lupski, J.R. (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet*, 18, 74-82.
- Stemers, F.J., Chang, W., Lee, G., Barker, D.L., Shen, R., *et al.* (2006) Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods*, 3, 31-33.
- Stemers, F.J. and Gunderson, K.L. (2007) Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. *Biotechnol J*, 2, 41-49.
- Stevenson, R.E. and Schwartz, C.E. (2002) Clinical and molecular contributions to the understanding of X-linked mental retardation. *Cytogenet Genome Res*, 99, 265-275.
- Stranger, B.E., Forrest, M.S., Dunning, M., Ingle, C.E., Beazley, C., *et al.* (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 315, 848-853.
- Stromme, P., Mangelsdorf, M.E., Shaw, M.A., Lower, K.M., Lewis, S.M., *et al.* (2002) Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet*, 30, 441-445.
- Zechner, U., Wilda, M., Kehrer-Sawatzki, H., Vogel, W., Fundele, R., *et al.* (2001) A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends Genet*, 17, 697-701.
- Zemni, R., Bienvenu, T., Vinet, M.C., Sefiani, A., Carrie, A., *et al.* (2000) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet*, 24, 167-170.
- Tarpey, P., Parnau, J., Blow, M., Woffendin, H., Bignell, G., *et al.* (2004) Mutations in the *DLG3* gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*, 75, 318-324.
- Toniolo, D. (2000) In search of the MRX genes. *Am J Med Genet*, 97, 221-227.
- Trask, B.J. (2002) Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet*, 3, 769-778.
- Tuzun, E., Sharp, A.J., Bailey, J.A., Kaul, R., Morrison, V.A., *et al.* (2005) Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet*, 37, 727-732.
- Weksberg, R., Hughes, S., Moldovan, L., Bassett, A.S., Chow, E.W., *et al.* (2005) A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*, 6, 180.
- Vervoort, V.S., Beachem, M.A., Edwards, P.S., Ladd, S., Miller, K.E., *et al.* (2002) *AGTR2* mutations in X-linked mental retardation. *Science*, 296, 2401-2403.
- White, S., Kalf, M., Liu, Q., Villerius, M., Engelsma, D., *et al.* (2002) Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the *DMD* gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet*, 71, 365-374.
- Vissers, L.E., de Vries, B.B., Osoegawa, K., Janssen, I.M., Feuth, T., *et al.* (2003) Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet*, 73, 1261-1270.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22, 130-131, 134-138.
- Xu, J. and Chen, Z. (2003) Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 117, 15-24.

- Ylstra, B., van den Ijssel, P., Carvalho, B., Brakenhoff, R.H. and Meijer, G.A. (2006) BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res*, 34, 445-450.
- Yntema, H.G., Poppelaars, F.A., Derksen, E., Oudakker, A.R., van Roosmalen, T., *et al.* (2002) Expanding phenotype of XNP mutations: mild to moderate mental retardation. *Am J Med Genet*, 110, 243-247.

Avaldatud artikli äratrükk

ARTICLE

Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization

Philippos C Patsalis^{*1}, Ludmila Kousoulidou¹, Katrin Männik², Carolina Sismani¹, Olga Žilina², Sven Parkel², Helen Puusepp², Neeme Tõnisson², Priit Palta², Maido Remm² and Ants Kurg²

¹Department of Cytogenetics, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Nicosia, Cyprus; ²Department of Biotechnology, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu/Estonia Biocentre, Tartu, Estonia

Array-based genome-wide screening methods were recently introduced to clinical practice in order to detect small genomic imbalances that may cause severe genetic disorders. The continuous advancement of such methods plays an extremely important role in diagnostic genetics and medical genomics. We have modified and adapted the original multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH) to a novel microarray format providing an important new diagnostic tool for detection of small size copy-number changes in any locus of human genome. Here, we describe the new array-MAPH diagnostic method and show proof of concept through fabrication, interrogation and validation of a human chromosome X-specific array. We have developed new bioinformatic tools and methodology for designing and producing amplifiable hybridization probes (200–600 bp) for array-MAPH. We designed 558 chromosome X-specific probes with median spacing 238 kb and 107 autosomal probes, which were spotted onto microarrays. DNA samples from normal individuals and patients with known and unknown chromosome X aberrations were analyzed for validation. Array-MAPH detected exactly the same deletions and duplications in blind studies, as well as other unknown small size deletions showing its accuracy and sensitivity. All results were confirmed by fluorescence *in situ* hybridization and probe-specific PCR. Array-MAPH is a new microarray-based diagnostic tool for the detection of small-scale copy-number changes in complex genomes, which may be useful for genotype–phenotype correlations, identification of new genes, studying genetic variation and provision of genetic services.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 22 November 2006; doi:10.1038/sj.ejhg.5201738

Keywords: MAPH; microarray; submicroscopic aberrations; genomic analysis; chromosome X; bioinformatics

Introduction

It is well known that various genetic imbalances can result in a wide range of pathological conditions such as mental

retardation, malformations, developmental delay, neurological disorders and congenital anomalies. Different methodologies have been introduced to clinical practice in order to detect these genetic imbalances and provide prenatal and postnatal diagnosis to numerous groups of patients by revealing the genetic cause and mechanism of their disease. Classical karyotyping allows whole-genome screening for chromosomal aberrations larger than 5 Mb, however, smaller aberrations are not detectable with the existing G-banding analysis. Such small imbalances, called

*Correspondence: Dr PC Patsalis, Department of Cytogenetics, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, PO Box 23462, 1683 Nicosia, Cyprus. Tel: +357 22 39 26 95; Fax: +357 22 39 27 93; E-mail: patsalis@cing.ac.cy
Received 6 July 2006; revised 28 September 2006; accepted 12 October 2006

'submicroscopic', require other methodologies that provide high-resolution analysis.

The development of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methods led to the detection of subtle cryptic chromosomal abnormalities smaller than 5 Mb.^{1,2,3} Comparative genomic hybridization (CGH), using metaphase chromosomes permitted the detection of copy-number changes as small as 3 Mb.⁴ The resolution of small size copy-number change detection was dramatically increased with the advancement of array-based CGH using BAC, PAC or cDNA clones,⁵⁻⁷ achieving a resolution higher than 1 Mb.⁸ To further increase, the sensitivity and specificity, the hybridization of genomic representations to CGH arrays has been developed.⁹ An average resolution of 30 kb throughout the genome was achieved by arraying long oligonucleotide probes and hybridizing with representations from cancer and normal cells.¹⁰ In addition, Affymetrix SNP arrays have recently been used for genome-wide detection of chromosomal regions with DNA copy-number alterations^{11,12} and other commercial solutions exist with extreme resolution.¹³ Currently, the tiling resolution BAC arrays covering the entire human genome with approximately one clone per 100 kb are also available.¹⁴

A novel DNA dosage detection method, called multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH), enables accurate and reliable detection of changes in DNA copy-number with a theoretical resolution up to 100 bp within a defined region of interest.¹⁵ The basic principle of the method is that the probes can be quantitatively recovered and amplified after hybridization on solid matrix. In practice, the studied genomic DNA is denatured, immobilized on a membrane and hybridized to a mixture of probes. Each probe is designed to be amplifiable and to target any unique coding or non-coding genomic sequence. As MAPH is fast, cost-effective and relatively easy to perform,¹⁶ it has been used for the detection of small DNA copy-number changes.¹⁷ A major drawback of MAPH is the fact that gel-based detection used in this method is only applicable to a limited number of probes. The majority of mentioned classical MAPH studies have included about 30–50 probes per assay.

We have applied classical MAPH to a novel microarray-based approach, aiming to contribute to the advancement in diagnosis of small copy-number changes throughout the human genome. The new array-MAPH method enables accurate and reliable determination of copy-number changes in virtually any targeted locus of human genome. It combines the flexibility, specificity and sensitivity of MAPH with the potential of high-resolution genomic analysis, provided by a microarray format. Here, we describe the detection of large and small genomic imbalances through the fabrication, interrogation and validation of a human chromosome X-specific array at the 238 kb median spacing of probes.

Methods

Array-MAPH methodology is described in Figure 1. The methodology requires (a) probe selection and preparation, (b) microarray preparation and (c) array-MAPH hybridization and data analysis.

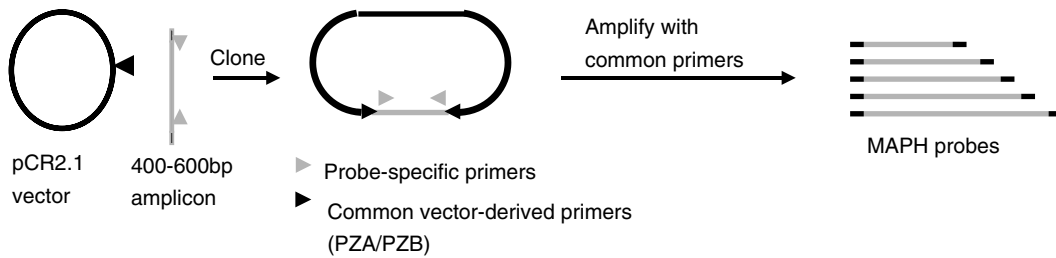
Probe selection and preparation

Array-MAPH requires the use of specifically designed hybridization probes. Such hybridization probes should be: unique in the human genome; evenly spaced over the studied genomic region; similar in size (preferably 400–600 bp) and GC content (30–55%) to ensure similar hybridization conditions. In addition, these probes have to be amplified from the human genome, which requires design of PCR primers suitable for genomic PCR. To design locus-specific hybridization probes used in the current study, 1500 evenly spaced candidate regions from chromosome X were determined. The sequences (1000 bp) from each region were downloaded from the ENSEMBL database (NCBI Human Genome assembly build 35.1). In the first phase of the hybridization probe design, all candidate sequences were tested for their uniqueness by comparing them against each other with BLAST2 program.¹⁸ Sequences that showed similarity score higher than 100 bits (~identical regions longer than 50 bp) with any other candidate region were rejected. Secondly, PCR primers for amplifying hybridization probes from the candidate sequences were designed with the modified Primer3 program¹⁹ using the parameters shown in Supplementary Method 1. Thirdly, all designed PCR primers were tested for their uniqueness in the human genome. A substring consisting of 18 nucleotides from the each primer's 3' end was detached and the number of the occurrences of these substrings in the human chromosome sequences was counted as potential binding sites. If a pair of primers had in sum more than 10 putative binding sites or if both primers had more than three occurrences in the human genome, they were discarded together with corresponding probe region. Primers were also rejected, if a pair of primers was able to generate more than one PCR product from the human genome. Product was predicted if two primers bound onto opposite strands within 1000 bp from each other. In the last step, the remaining candidate probes were tested conclusively for their uniqueness in the human genome using the BLAST2 program. The DUST filter within BLAST2 algorithm was switched off with the - F F option, otherwise, some repeated regions in the human genome could remain unnoticed. Probes that showed similarity score higher than 120 bits (~identical regions longer than 60 bp) with regions other than their own correct binding site in the genome were removed.

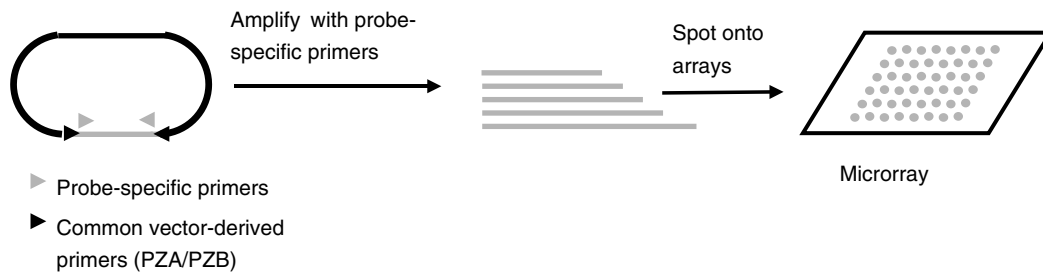
From the designed candidate probes, 558 probes from the human chromosome X were finally selected on the basis of uniform spacing, maintaining a 150–350 kb

a Probe selection and preparation

Probe preparation by cloning genomic amplicon



b Microarray preparation



c Array-MAPH hybridization and data analysis.

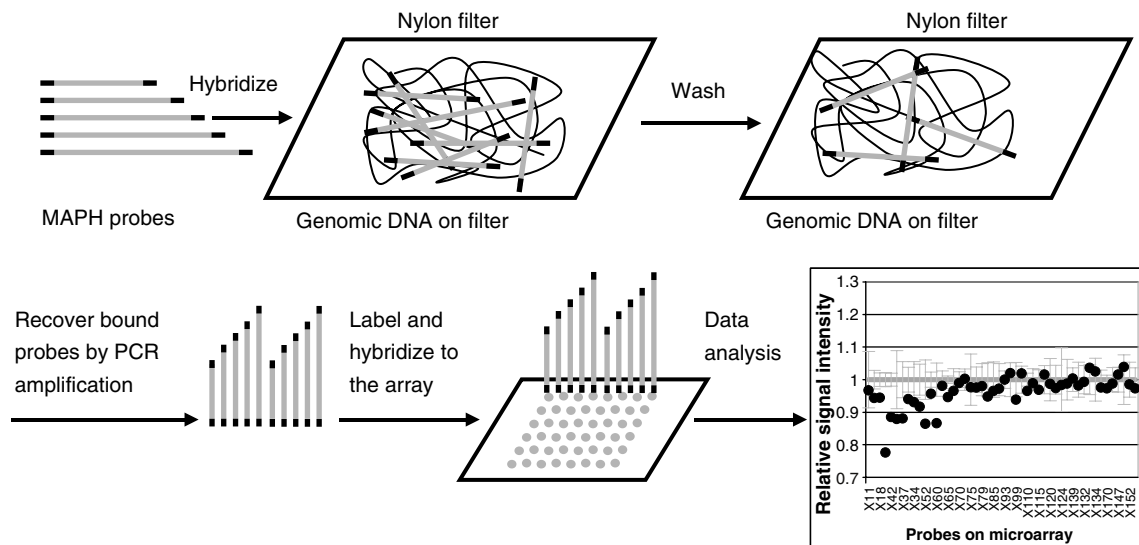


Figure 1 A flow diagram of array-MAPH methodology.

between probes, resulting in median distance of 238 kb. Another 107 probes from human autosomal chromosomes were designed as normalization controls. The selected probes, primers for their amplification, probe locations (according to the NCBI Human Genome assembly build 35.1) in the human genome and their lengths are presented in Supplementary Table 1.

Probe and microarray preparation

The candidate probes were amplified by PCR from normal 46,XY source of genomic DNA (Supplementary Method 2a) and confirmed for their expected size, amplification efficiency and specificity. Amplicons were then cloned into the pCR2.1 vector using a TOPO TA cloning kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) allowing archiving and

rapid amplification of each probe. Universal vector-derived primers were used to confirm cloning efficiency (Supplementary Method 2b). Clone identity was confirmed for every probe by PCR amplification using the probe-specific primer sets (Supplementary Method 2c). The successfully cloned candidate probes were cultured in LB medium with 40 µg/ml ampicillin and cryopreserved with 10% glycerol at -80°C. Array-MAPH amplifiable probes were developed by PCR amplification using PZA and PZB universal primers flanking the vector-cloning site (Supplementary Method 2b).

Array-MAPH target sequences were amplified for spotting onto the array by PCR using specific unique primers for every cloned probe (Supplementary Method 2c). The array-MAPH target sequences were then dissolved in 25% DMSO at final concentration of 30 ng/µl and spotted onto Genorama™ SAL-1 microarray slides (Asper Biotech Ltd, Tartu, Estonia) in duplicates with the use of VersArray ChipWriter Pro arrayer (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). All probes were arrayed in random order, to minimize the possibility that a spatial artifact during array hybridization will be incorrectly interpreted as an aberration.

Array-MAPH hybridization and data analysis

Two micrograms of human test genomic DNA was immobilized on Hybond+ filters (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) as described previously.¹⁵ The filters were then hybridized with the array-MAPH amplifiable probes and washed to remove unbound and nonspecifically bound probes (Supplementary Method 3a). Each filter was placed into separate tube and all bound probes were recovered from filters by denaturing and quantitative PCR amplification (Supplementary Method 3b). The recovered probe mixture was purified and labeled by nick translation using aminoallyl-dUTP-s and later treatment with amino-reactive Cy3 dye (GE Healthcare) (Supplementary Method 3c). The recovered probe mixture was hybridized to the microarray for quantification using automated hybridization station HS-400 (Tecan Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Austria) (Supplementary Method 3d). The microarrays were scanned using Affymetrix 428 microarray scanner (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Raw signal intensities were extracted with BaseCaller module of Genorama™ Genotyping Software 4.2 Package (Asper Biotech Ltd). As each target sequence was presented in duplicate, their average pixel fluorescence intensity was used for further analysis with the specifically designed software for array-MAPH, called MAPH-Stat, available on request for academic use. The same program was also used for resorting of probes into their genomic order.

Microarray signals were normalized using the MAPH-Stat program (between-slide normalization) with respect to the median of autosomal control probe-specific signals from the given microarray. In order to adjust the raw data to

normal distribution, which is required for correct calculation of confidence intervals (CIs), raw signal intensity values were converted to logarithmic scale by taking logarithm of signal intensity values with base 2. Then, average (AVERAGE) and CI 90% values were calculated for each (*i*) probe using data from the control panel containing signals from five DNA samples of cytogenetically controlled phenotypically normal individuals. This was carried out separately for male and female control panel. The use of CI 90% gives the theoretical false positive (two consecutive probes deviated from CI values to the same direction) rate of 0.5%.

The following transformation was made for signal intensity values from studied DNA calculated from the control panel: $CONVERTED_VALUE_i = VALUE_i / AVERAGE_i$. CI values for each probe were converted by using the same formula. An example of data analysis is shown in the Supplementary Table 2.

Signal intensity values of at least two adjacent probes with the intensity above or below the CI 90% values were considered indicative for the potential copy number change in the analyzed region.

FISH and PCR confirmation analyses

FISH analyses were used to confirm duplication on chromosome X of patient A-2879 (Supplementary Figure 1) and PCR analyses were used to confirm the deletion in patients 220728, 22467 and A045 (Supplementary Method 4). For confirmation with FISH, BAC and PAC clones were obtained from the clone library of The Wellcome Trust Sanger Institute and cultured according to the provided instructions (www.sanger.ac.uk). *STS* gene-specific probe for FISH analysis was obtained from Vysis Inc. (Downers Grove, IL, USA). The protocol for BAC and PAC extraction was obtained from BACPAC Resources Center Home Page (www.bacpac.chori.org). Labeling and hybridization was performed using Nick Translation Kit (Vysis Inc.) according to the provided standard protocol. The confirmation with PCR analyses is described in Supplementary Method 4.

Results

The first step towards the application of MAPH to a microarray format was the development of a chromosome X-specific array containing 558 probes spanning almost the entire chromosome X with median spacing of 238 kb and 107 control probes, representing all autosomal chromosomes. To simplify the *in silico* conducted probe design process and to make it reproducible, we prepared special software and tools for it. We also made a web interface called MAPHDesigner (<http://bioinfo.ebc.ee/MAPH>) for the developed programs. As web-based service, MAPHDesigner is freely available for all academic and non-academic users.

Probes were spotted onto microarray slides and used as hybridization targets. The chromosome X-specific

microarray was tested with the new array-MAPH methodology to analyze normal male and female DNA samples, as well as DNA samples from patients carrying known and unknown genomic imbalances. Each microarray with patient data is compared against a control panel of five normal individuals, which are analyzed on individual microarray. The signals from each array are normalized before comparison using the median signal intensity from the autosomal control probes from various experiments. Normalized signal values of the analyzed male and female samples were compared with CI 90% to the respective signal intensities for each of the array-MAPH probes from the control experiments.

Initial validation of array-MAPH was performed with normal DNA samples. All experiments were carried out in four replicates and gave comparable results. Replicate experiments are required to minimize possible biases related to experimental variations. DNA from a normal 46,XX control female subject was studied by comparing it against a control panel of five normal female subjects. As expected, the vast majority of the fluorescence intensities of chromosome X-specific probes remained within the calculated CI 90% values. From similar assay with four normal individuals, we estimated our empirical rate of false positives. This was carried out by counting all consecutive two probe deviations from CI 90% values trending into the same direction and was found to be ca. 1% on the average and 3% in the worst case. Secondly, DNA from a phenotypically normal male subject was compared to a control panel of five normal female subjects DNA samples. In this case, the normalized ratios for chromosome X-specific probes were clearly differentiated from autosomal as they remained below the CI 90%, demonstrating that the method reliably detects differences between one and two chromosomal copies.

To further validate the array-MAPH method, we used patient DNA samples with known chromosome X abnormalities. For various experiments, female patient DNA samples were compared to female control panels and male patient DNA samples to male control panels. Patient A-2879 is a female whom the initial cytogenetic analysis showed a chromosome Xp rearrangement. First FISH analyses using loci-specific probes for the *STS* and *SHOX* gene, the loci *DXZ1* and whole chromosome X paint revealed a complex aberration with a deletion of distal-most part of Xp22.3 and a proximal Xp22.31–p22.32 duplication. Array-MAPH was used to identify the size of the duplication. Our data showed the same duplication found by FISH; moreover, the duplicated area appeared to span a greater region than expected, extending to chromosomal bands Xp22.32–p22.12 (Figure 2). Second FISH analysis using the *STS* gene-specific probe, six BAC and one PAC clones confirmed the extended duplication identified by array-MAPH (Supplementary Figure 1). Our current probe list does not cover the distal-most part of Xp,

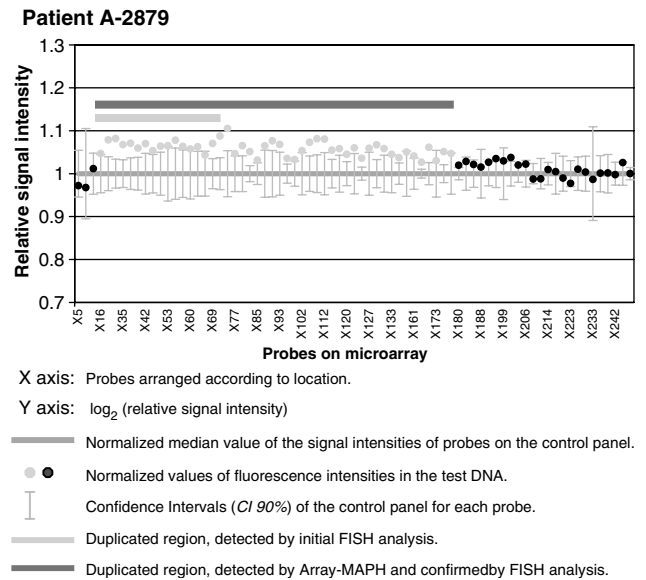


Figure 2 Array-MAPH profile of patient A-2879.

so in this study, we could not analyze the small deleted region from initial FISH finding. Detailed description of the patient, clinical data and additional cytogenetic analysis will be reported elsewhere.

DNA samples of patients 220728 and 22467 were kindly provided by Dr J Vermeesch (Center for Human Genetics, Catholic University of Leuven, Belgium). The patient 220728 is a male carrying a deletion estimated initially to cover a region of maximum 7.5 Mb on the short arm of chromosome X detected by array-CGH and confirmed by FISH (Dr J Vermeesch, personal communication). The patient DNA was used in a blind test to validate the array-MAPH approach. Array-MAPH determined a 5.45–6 Mb Xp terminal deletion, spanning from probe X020 (2 771 275 bp) to X63 (8 443 336 bp) (Figure 3). Deletion breakpoints were confirmed by probe-specific and locus-specific PCR. The proximal breakpoint was estimated between 8 220 853 bp and 8 443 336 bp, whereas the distal breakpoint was between 2 445 055 bp and 2 771 275 bp (Figure 4). The discrepancy between array-CGH and array-MAPH results could be explained by the difference in the resolution of the two platforms.

Patient 22467 is a male, carrying a 1.5 Mb deletion on the short arm of chromosome X (Dr J Vermeesch personal communication). Array-MAPH showed a deletion between probes X34 (5 952 842 bp) and X58 (8 000 728 bp) (Figure 5), which was confirmed by probe-specific PCR (Figure 6).

Screening of 20 clinically affected male individuals from X-linked mental retardation families (unpublished data) resulted in the detection of a 500 kb deletion on Xq25 in patient A045 (Figure 7). The deletion was confirmed with probe-specific PCR (Figure 8a). Additional primers were

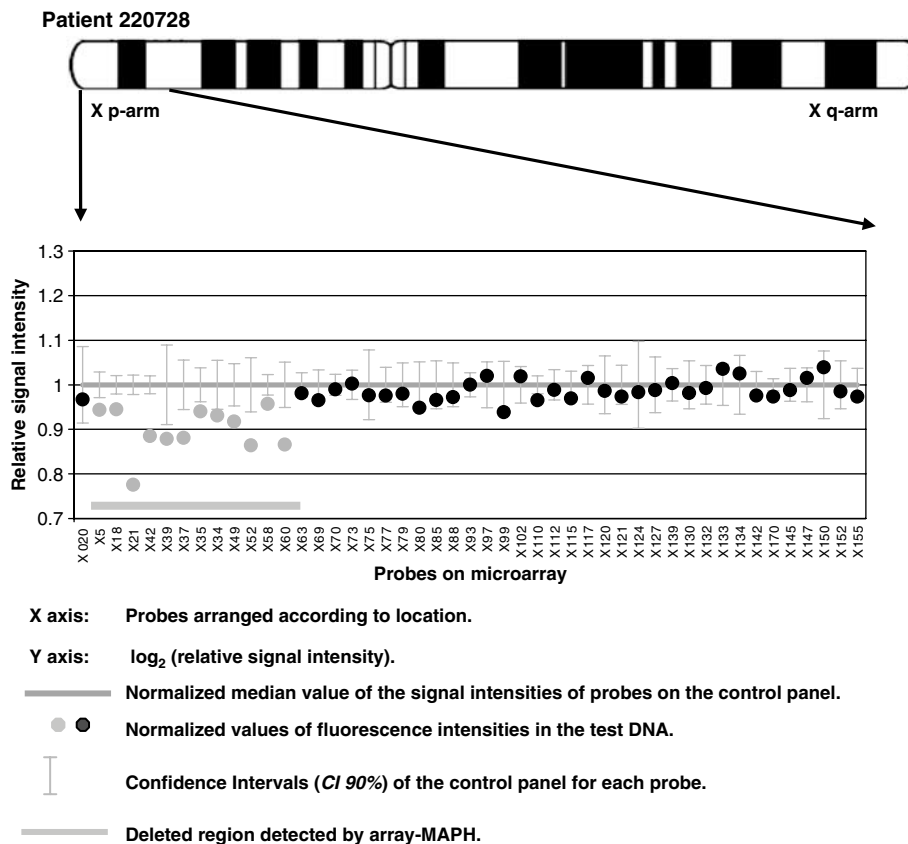


Figure 3 Array-MAPH profile of patient 220728.

designed into the deleted region using the existing methodology for developing array-MAPH probes (Supplementary Table 3) and the breakpoints were refined by PCR (Figure 8b), estimating the deletion to be 23 kb in size spanning from 121 018 669 bp to 121 041 883 bp.

Discussion

We describe the detection of large and small genomic imbalances using the new array-MAPH methodology. Array-MAPH was validated using a chromosome X-specific array with 558 probes, providing a median spacing of 238 kb over the entire human chromosome X. The 154-Mb human chromosome X was chosen because it is one of the best characterized chromosomes with complete sequence information available and provides an excellent model for studying X-linked genetic diseases. Initial validation of array-MAPH approach revealed certain limitations and advantages of the method.

Among the limitations of array-MAPH is the relatively large amount and concentration of starting DNA material needed. It was empirically established that best results can be obtained with 2 μ g of genomic DNA, whereas only 0.5–

1 μ g is needed for gel-based MAPH,¹⁵ 0.5 μ g for BAC/PAC array-CGH²⁰ and 250 ng for Affymetrix SNP arrays.¹¹ However, this amount is less than the 6 μ g needed for some oligonucleotide-based array platforms.²¹ The necessary DNA quantity must be contained in a limited volume (less than 10 μ l) to enable spotting on small (2 \times 3 mm) filters. Therefore, DNA concentration should be at least 200 ng/ μ l. Nevertheless, one should consider that in case of array-MAPH the 2 μ g of DNA are required for preparing a filter and the same filter can be used for multiple analyses.

Array-MAPH involves two hybridization steps: the first one on filters and a second one on arrays. As a result, possible errors from both hybridizations are added to the final analysis. This problem is partially solved by uniform size and GC content of all probes, which allows maximum optimization of PCR and hybridization steps, avoiding errors and biases. In addition, the uniform size and GC content allows to overcome a potential hybridization issue of classical MAPH, where the probes have to be designed with different size for gel electrophoresis-based identification and quantification.

A potential drawback of single sample hybridization might be an increased influence of microarray-caused

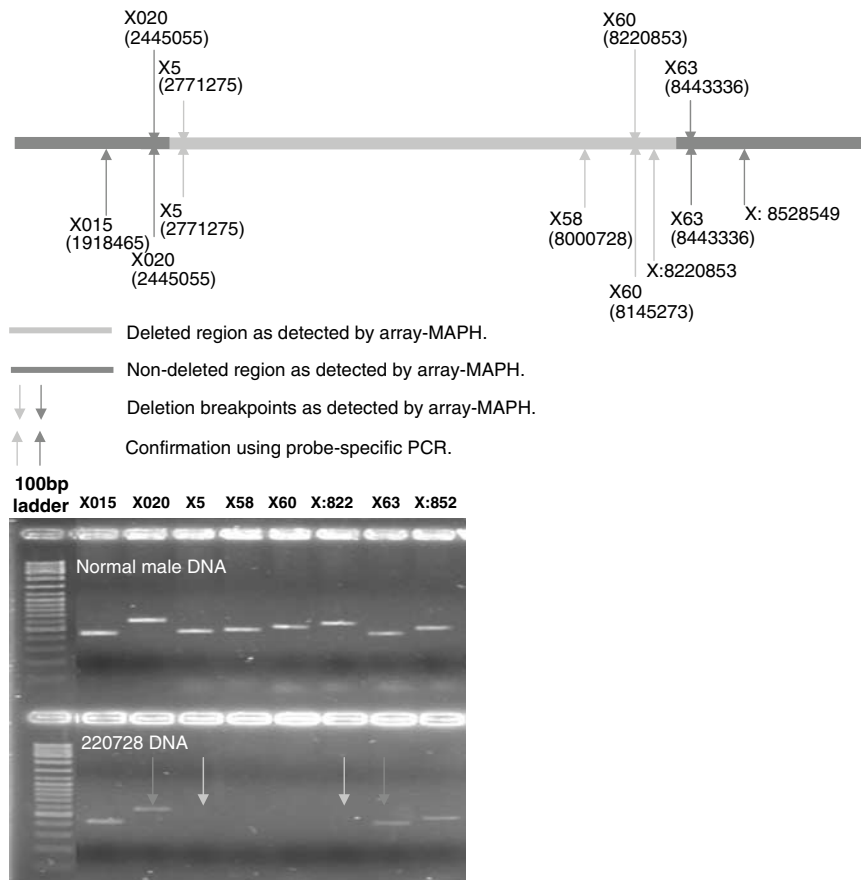


Figure 4 Probe-specific PCR confirmation of 5.67 Mb deletion for patient 220 728. Probes X5, X58, X60 and locus X:8220853, covering the region between 2771275 bp and 8220853 bp gave no product when amplified from patient’s DNA, whereas probes X63 and locus X:8528549 proximal to the breakpoint and locus X015 and X020 distal to the breakpoint give normal PCR products.

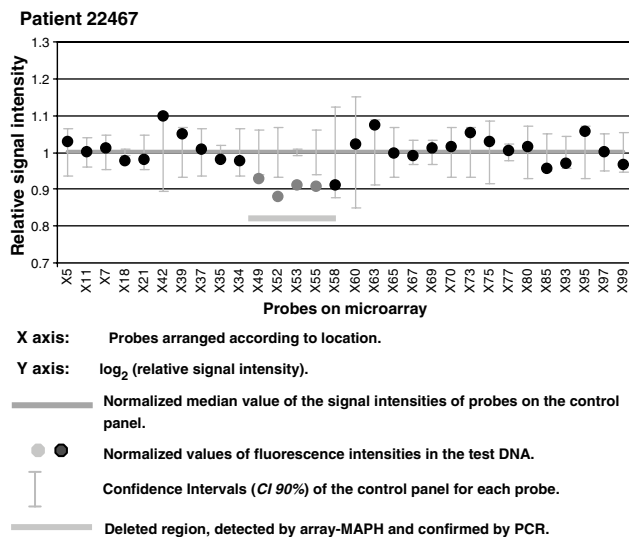


Figure 5 Array-MAPH profile of patient 22467.

artefacts and variances. Although normalization and analysis is performed in a way that minimizes this type of experimental bias, still it is important to use automated hybridization systems to get as uniform hybridization efficiency as possible. At the same time, an automatic hybridization station will increase sample throughput.

A limiting factor for the clinical application of array-MAPH is that array-MAPH probes, similarly to oligonucleotides used for array-CGH, are extremely sensitive to DNA heterogeneity, which might cause an alteration of signal ratios. Therefore, one would expect that cancer cell line analysis might present certain challenges for array-MAPH, as tumor biopsies are often contaminated with normal tissue. This is also true for other samples with possible DNA contamination, such as amniotic fluid or fetal blood and mosaics.

A considerable advantage of the new approach is the nature of specifically designed probes it uses. *In silico*, probe development excludes repetitive or even partially

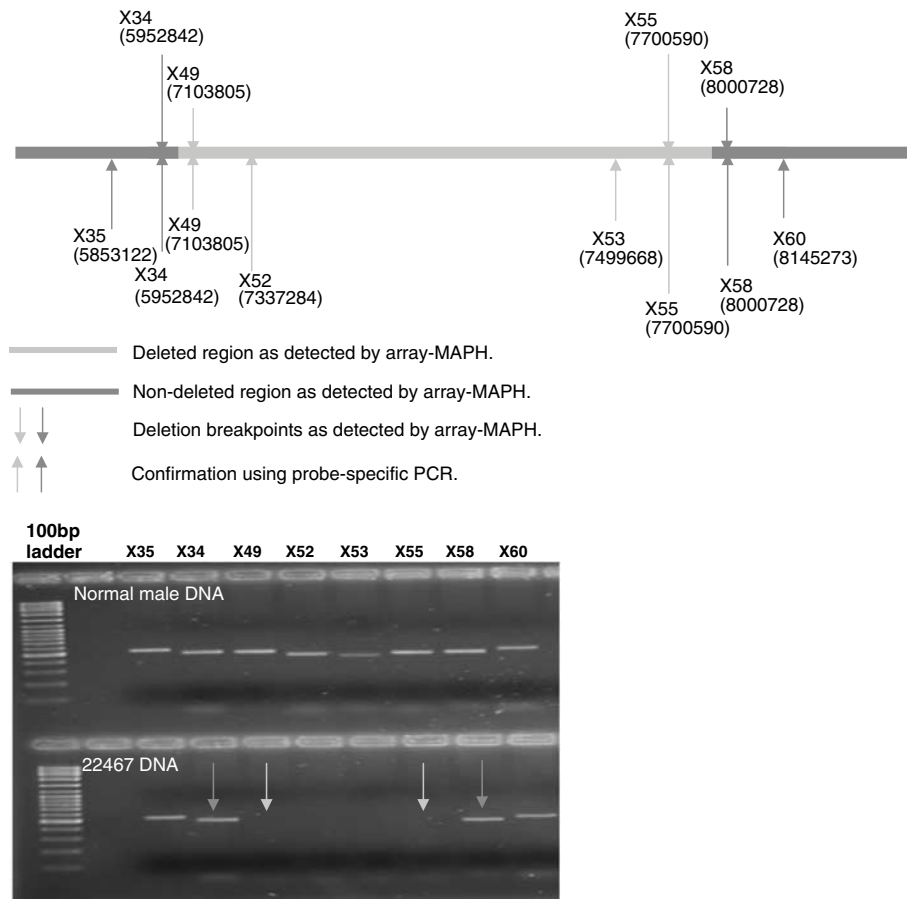


Figure 6 Probe-specific PCR confirmation of 1.5 Mb deletion for patient 22467. Probes X49, X52, X53 and X55, covering the region between 7 103 805 bp and 7 700 590 bp give no product when amplified from patient's DNA, whereas probes X58 and X60 proximal to the breakpoint and probes X34 and X35 distal to the breakpoint give normal PCR products.

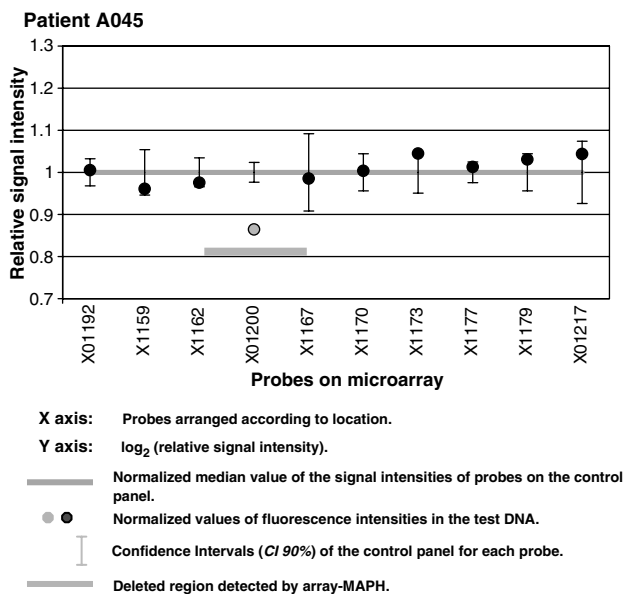


Figure 7 Array-MAPH profile of patient A045.

redundant sequences and ensures specificity and sensitivity of array-MAPH, owing to 100% probe identity to the target sequence. Also, the uniqueness of probes enables to avoid the pseudoautosomal region on the chromosome X, which assures that probes used in such study will not result in the incorrect copy-number assessment for the corresponding chromosome X sequences. Similar probe development approach has been used also by other groups to design gene-specific strictly sequence defined microarrays for detection of diagnostically significant gene copy-number aberrations.^{22,23} Comparison of array-CGH with genomic and PCR-based targets has shown that drawbacks of genomic clone-based approach caused mainly by the presence of redundant DNA sequences in the genomic clones can be circumvented by using short PCR-based microarray probes.²⁴ Probes for array-MAPH have the flexibility to target virtually any locus in the genome and cover large-scale copy-number variations (LCVs).^{25,26} The relatively small size of probes (400–600 bp) allows detection of copy-number changes of small regions, facilitating the design of exon-specific and region-specific

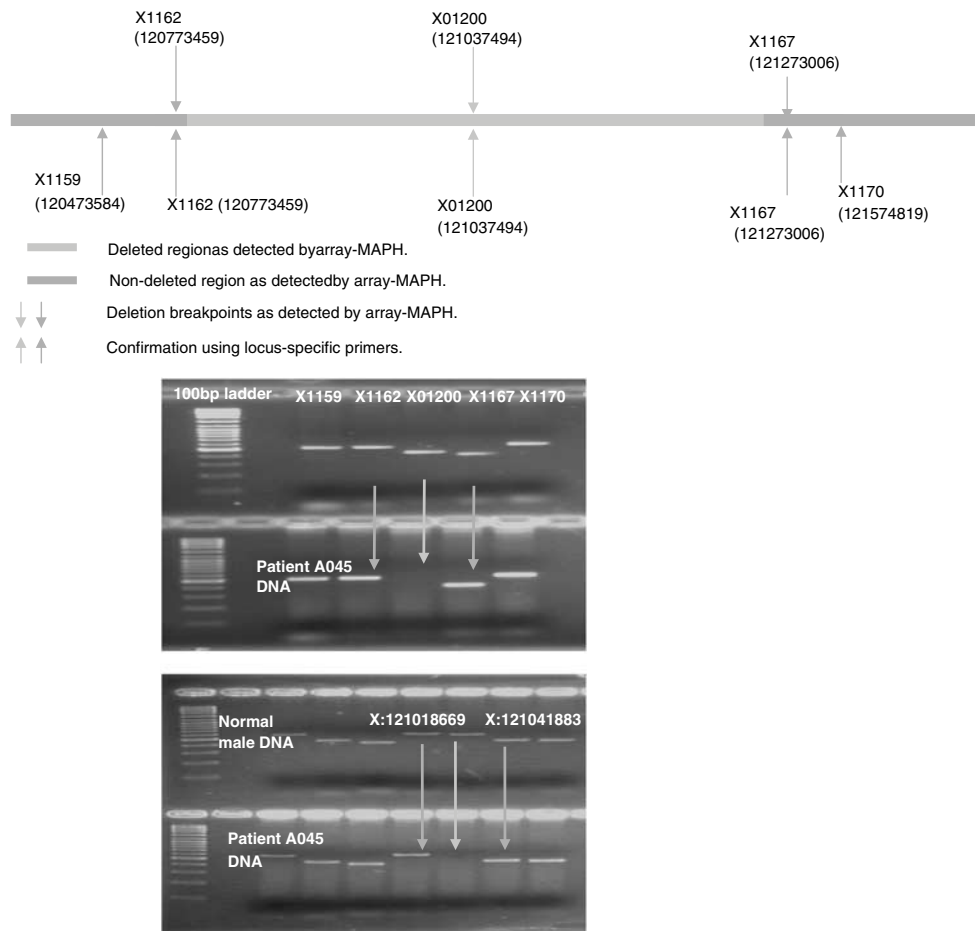


Figure 8 (a) Probe-specific PCR confirmation of 500 kb deletion for patient A045. Probe X01200 at 121 037 494 bp gives no product when amplified from patient's DNA, whereas probes X1159 and X1162 proximal to the breakpoint and probes X1167 and X1170 distal to the breakpoint give normal PCR products. (b) Amplification with additional primers narrows down the deletion to 23 kb between 121 018 669 bp and 121 041 883 bp. Probes located proximal to 121 018 669 bp and distal to 121 041 883 bp give normal PCR products, whereas probe located at 121 030 378 bp gives no product.

high-resolution arrays. This is also in a good agreement with data from others,²³ who have demonstrated that the shortest stretch of unique sequence, which allows reliable detection of single copy-number changes is 490 bp using fluorescently labeled total human DNA in the hybridization experiments.

Furthermore, one should consider the low complexity of DNA material hybridized to the microarray in case of array-MAPH and consequently increased concentration of probe complementary to target sequences. This is critical for obtaining reliable data,^{9,27,28} as it significantly improves hybridization kinetics and increases signal to noise ratio. As genomic representations in case of ROMA technology,¹⁰ array-MAPH also provides means to amplify the quantity of studied loci, thereby increasing signal to noise ratio during hybridization to arrayed probes.

Unlike array-CGH, where two different fluorophores are used, array-MAPH labeling involves a single fluorophore,

with reference signal values for comparison. Data from patient material is directly compared to CIs of the control data set. Recent large-scale studies show the presence of LCVs in several genomic regions of phenotypically normal individuals.^{25,26} When searching for aberrations causing abnormal phenotypes, comparison of studied DNA against a panel composed of different pooled normal DNAs will enable more reliable analysis. However, LCVs can be investigated as well by limiting the heterogeneity of DNAs included in the control panel. In routine applications, a control panel will reduce the need for repeated analysis of normal DNAs, saving on materials and analysis time.

In contrast to clone-based technologies, the method does not rely on clone availability from BAC, PAC or other libraries, as probes can be rapidly and almost unrestrictedly selected from any location in genome. Having all probe-specific primers available, it is easy to carry out PCR-based confirmation procedures for any detected copy-number

alteration in studied DNA. Moreover, it is easy to confirm or reject candidate copy number changes and further refine the breakpoints by designing more primers using the existing software tools developed for MAPH probe design. Using this approach, we confirmed the deletion and its breakpoints for patient A045. Despite the fact that in general, single probe deviations as in case of A045, are considered to be 'false positive' and at present, we rely on two or more consecutive probes to warrant a copy-number change, there is always the option of simultaneous investigation of 10–20 loci, that showed 'false positive' ratios. Therefore, in some cases, even single probe alterations, classified as 'false positive' can be further studied and smaller deletions or duplications detected.

Our current data demonstrate the ability of array-MAPH followed by locus-specific PCR to detect deletions and duplications as small as 23 kb (patient A045). Nevertheless, the array-MAPH platform itself carries the potential of even higher resolution considering the 500 bp probe size and the flexibility to vary probe spacing according to the scientific question to be answered.

Array-MAPH can be useful for several applications in medical genomics. Even though array-MAPH can easily be applied to diagnosis of known genetic syndromes caused by copy-number alterations, it is a particularly useful tool for high-resolution screening of patients with abnormal phenotype and no genetic findings, detection of microdeletions, microduplications, genotype–phenotype correlations, gene identification and studying genetic variation. Further development and optimization of the technique may result in improved cost-effectiveness, reproducibility and dynamics, thereby revealing the full potential of array-MAPH platform.

Acknowledgements

This work was funded by the grants 30/2001 from the Cyprus RPF, QLRT-2001-01810 from the EURO-MRX EU, 5467 from the Estonian Science Foundation, by 0182649s04 from the Estonian Ministry of Education and Research and by 070191/Z/03/Z from the Wellcome Trust International Senior Research Grant. We thank D Andreou, C Tryfonos, E Hadjiyanni, C Pitta, C Antoniadis, S Bashiardes and G Slavin for their contribution. Many thanks to Professor J Vermeesch, Dr K Öunap and Dr R Žordania for the provision of DNA samples and the Wellcome Trust Sanger Institute for the provision of BAC/PAC clones.

References

- 1 Test and Technology Transfer Committee: Technical and clinical assessment of fluorescence *in situ* hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations. *Genet Med* 2000; **2**: 356–361.
- 2 Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C: Fluorescence *in situ* hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *Eur J Hum Genet* 2004; **12**: 647–653.
- 3 Knight SJ, Flint J: Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 2000; **37**: 401–409.
- 4 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D *et al*: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; **258**: 818–821.
- 5 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**: 207–211.
- 6 Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA *et al*: Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; **23**: 41–46.
- 7 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**: 399–407.
- 8 Snijders AM, Nowak N, Seagraves R *et al*: Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; **29**: 263–264.
- 9 Lucito R, West J, Reiner A *et al*: Detecting gene copy number fluctuations in tumor cells by microarray analysis of genomic representations. *Genome Res* 2000; **10**: 1726–1736.
- 10 Lucito R, Healy J, Alexander J *et al*: Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 2003; **13**: 2291–2305.
- 11 Zhao X, Li C, Paez JG *et al*: An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004; **64**: 3060–3071.
- 12 Huang J, Wei W, Zhang J *et al*: Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics* 2004; **1**: 287–299.
- 13 Selzer RR, Richmond TA, Pofahl NJ *et al*: Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **44**: 305–319.
- 14 Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK *et al*: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; **36**: 299–303.
- 15 Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G: Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: 605–609.
- 16 Hollox EJ, Akrami SM, Armour JA: DNA copy number analysis by MAPH: molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; **2**: 370–378.
- 17 Patsalis PC, Kousoulidou L, Sismani C, Mannik K, Kurg A: MAPH: from gels to microarrays. *Eur J Med Genet* 2005; **48**: 241–249.
- 18 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA *et al*: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 3389–3402.
- 19 Rozen S, Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; **132**: 365–386.
- 20 Cai WW, Mao JH, Chow CW, Damani S, Balmain A, Bradley A: Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 393–396.
- 21 Barrett MT, Scheffer A, Ben-Dor A *et al*: Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 17765–17770.
- 22 Mantripragada KK, Buckley PG, Jarbo C, Menzel U, Dumanski JP: Development of NF2 gene specific, strictly sequence defined diagnostic microarray for deletion detection. *J Mol Med* 2003; **81**: 443–451.
- 23 Mantripragada KK, Thuresson AC, Piotrowski A *et al*: Identification of novel deletion breakpoints bordered by segmental duplications in the NF1 locus using high resolution array-CGH. *J Med Genet* 2006; **43**: 28–38.
- 24 Mantripragada KK, Tapia-Paez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP: DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med* 2004; **13**: 273–279.

- 25 Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN *et al*: Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; **36**: 949–951.
- 26 Sebat J, Lakshmi B, Troge J *et al*: Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; **305**: 525–528.
- 27 Lucito R, Nakimura M, West JA *et al*: Genetic analysis using genomic representations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4487–4492.
- 28 Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S *et al*: Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 1233–1237.

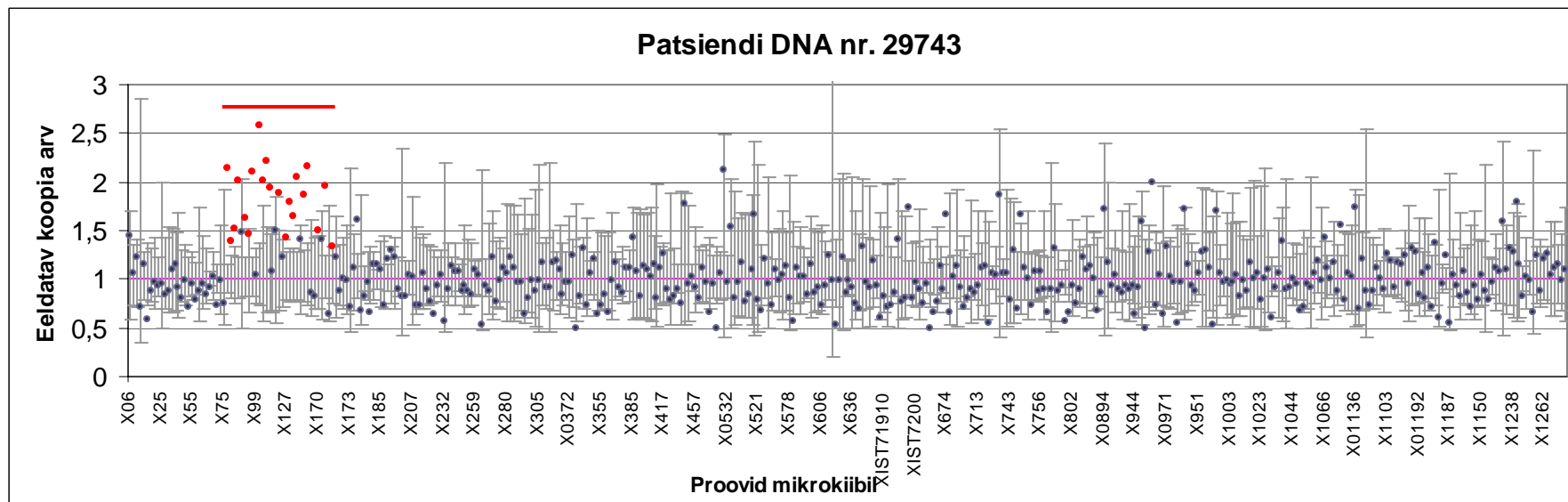
Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

Lisad

LISA 1. RT-qPCR-is kasutatud praimerid ning detekteeritud vastava lookuse koopiaarv - patsient nr. A-2879

Lookuse Nr	Positsioon	5'Praimer	3'Praimer	Lookuse koopiaarv
1	X:743820	TTGGGTGTTTCGTTGGTGCAA	AGCCCATGGCTTCGTTTTCA	1
2	X:1694469	TGCACAAAAGCATCAACGCA	TTGAGCGTGTTTCATGCCG	1
3	X:2628098	TGCAGATGGTTTGAGCGGAA	TTGTTCCAAGGGCCAAGAA	1
4	X:2862585	GCAATGATGAAGGCCGAAA	TCTTTGCCCATGCTGCTGA	1
5	X:3017449	TTCGGCGCCATGAGATTACA	TCATGGTTGCAGGCAGGAAA	3
6	X:3869359	AATGCAGTGGCCAACCACAA	TTGCAAAGGCATTTCTGCCA	3
7	X:3950013	TGGTGGTGGGCAGATTTTCA	TGGGTTGTTGAAGGGCATGA	3
8	X:21563709	TCAAATGCCACGGGCAAAAT	TGGGCATGATCCACATTGCT	3
9	X:22051201	ACCAGCGCTTCGTTGAAAA	TTTCAGTTTGTGGCGGAGCA	3
10	X:22206542	TGCCATCATTGTGCTGTCCA	TCAGGCAAATGGGCCTTTG	3
11	X:22332841	ACGCGCTTGACAAATGGGAT	TCCAATGCAACTTGCCCAA	3
12	X:22414587	ATTGCCTCTGCGCAATTTGAC	TCCCCGCCATTAACCCAAAT	3
13	X:22462161	TGGAGGCTGGTTGCAACATTT	TTTGGGGAGAAGTTTGCCGA	3
14	X:22580912	TCACGATGGTGAAAGGCCAA	ATGAAACTGCCCGCAAAGA	2
15	X:22614261	TGGCAAGGACTTCCAAACCAA	TGCCCGTGATCACAAACAACA	2
16	X:22713901	TGCCGGAGCATCGCAATTAT	TCCACACATTTTCATGCCCA	2
17	X:22815540	GGCCATTGGCAAATGTTGGA	TGGTTGCCAGAAAGGCCAAA	2
18	X:22903607	ACTTCCCATTGCAGGCCAAA	AAGCTTGGGCCCATTTCTTCA	2
19	X:22932616	TTTTGCAGGGGATGAAGCAA	TGCCGGGTCAAAATATCCCTT	2
20	X:23083395	CAATGGCAGAATGCTGGGAAA	TGCCAGTCAACCGACATTGAA	2
21	X:23122498	TTCATGCCTGATGGGGCTTT	TTTGGCATGCTGTGCTGTGA	2
22	X:23399891	TCAGGCAAAGGCCACAAACA	AAAGTGGCACCGATTGGCAT	2
23	X:23761333	TGAATCTGCGGCTGAAAGCA	TGCCAAGGAAGTGCCATGAA	2
24	X:23980302	TGCATTATTGCCATGGGCCT	TGGGGAATGCCACAGTTGAA	2
25	X:24021824	TCACCAAATGACCGTGCCA	TTGGCAAAGATTGGGGCAA	2

LISA 2. Mikrokiibil põhinev *MAPH* analüüs DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks – patsient nr. 29743

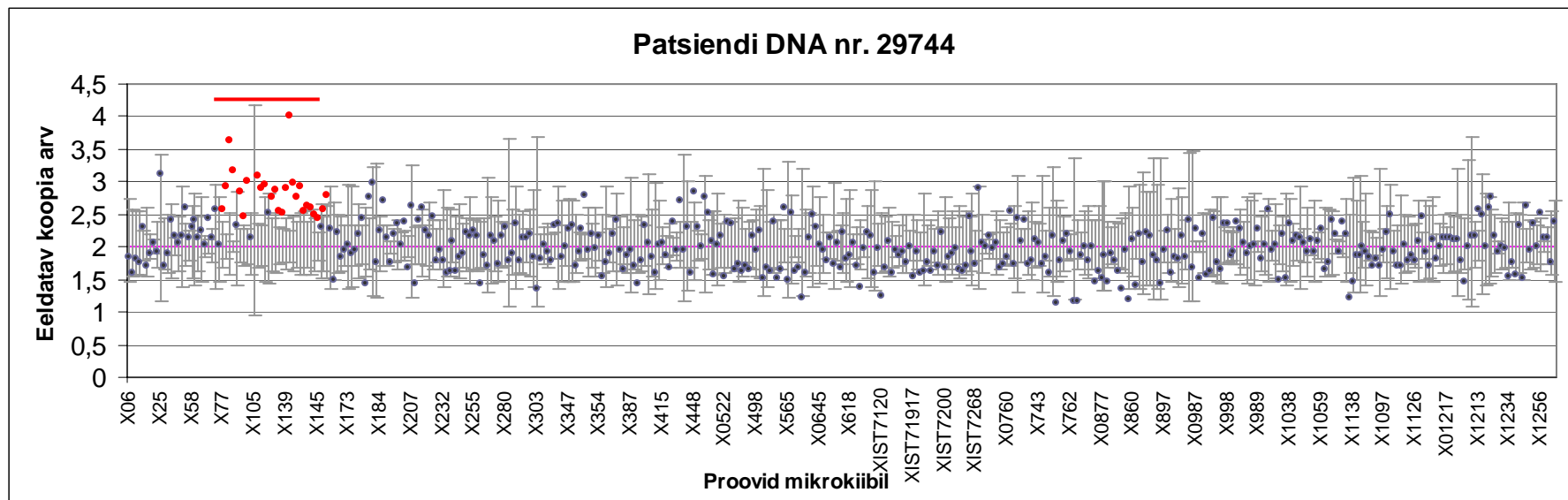


Joonisel on roosa joonega tähistatud proovide mediaanväärtus antud analüüsil, mustalt kujutatud veapiirid näitavad kontrollpaneeli usaldusvahemikku iga proovi jaoks, sinised ja punased punktid iseloomustavad normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid uuritavas DNA-s.

Graafiku X-teljel paiknevad X kromosoomile vastavad mikrokiibi proovid alates Xp telomeerest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni, Y-teljel on proovide eeldatavad koopia arvud.

Punasega on märgitud MK-*MAPH* abil leitud duplitseerunud ala.

LISA 3. Mikrokiibil põhinev *MAPH* analüüs DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks – patsient nr. 29744

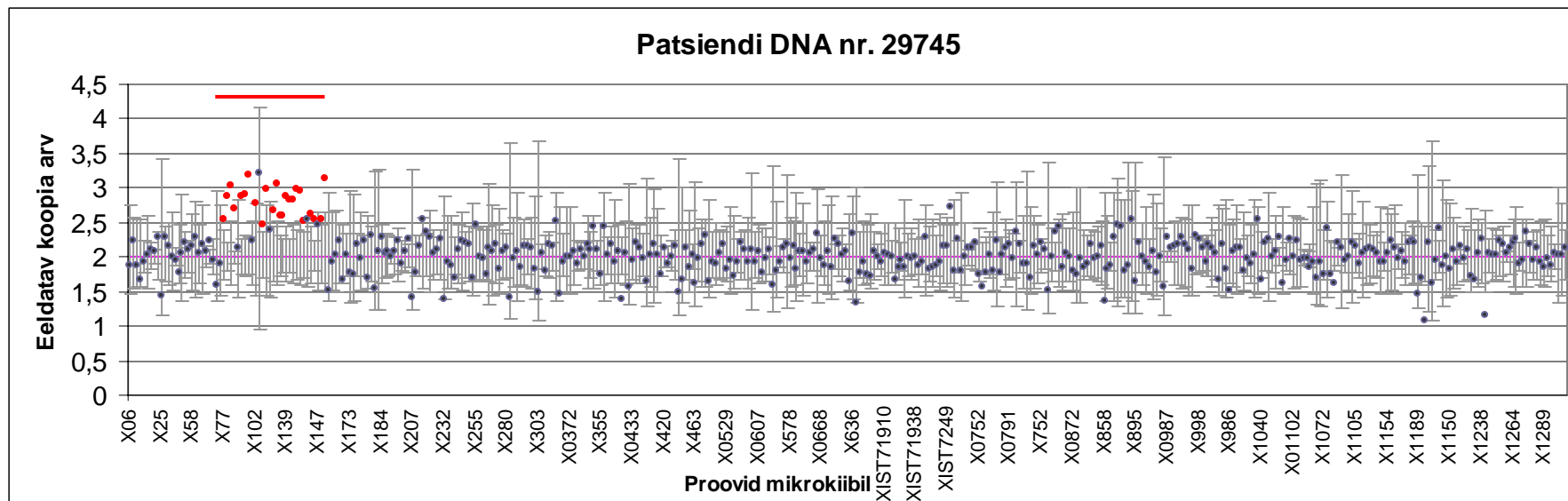


Joonisel on roosa joonega tähistatud proovide mediaanväärtus antud analüüsil, mustalt kujutatud veapiirid näitavad kontrollpaneeli usaldusvahemikku iga proovi jaoks, sinised ja punased punktid iseloomustavad normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid uuritavas DNA-s.

Graafiku X-teljel paiknevad X kromosoomile vastavad mikrokiibi proovid alates Xp telomeerest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni, Y-teljel on proovide eeldatavad koopia arvud.

Punasega on märgitud MK-*MAPH* abil leitud duplitseerunud ala.

LISA 4. Mikrokiibil põhinev *MAPH* analüüs DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks – patsient nr. 29745

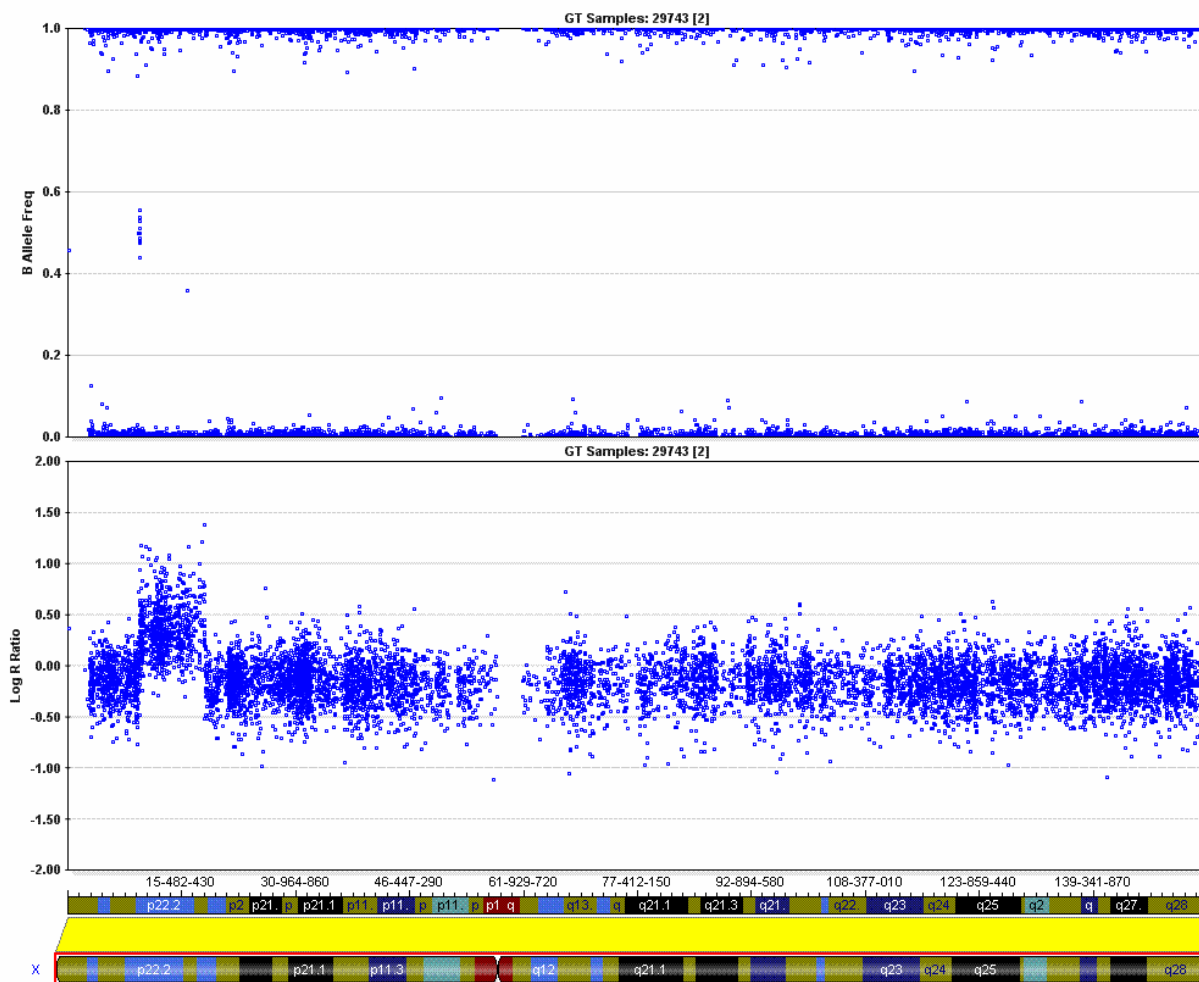


Joonisel on roosa joonega tähistatud proovide mediaanväärtus antud analüüsil, mustalt kujutatud veapiirid näitavad kontrollpaneeli usaldusvahemikku iga proovi jaoks, sinised ja punased punktid iseloomustavad normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid uuritavas DNA-s.

Graafiku X-teljel paiknevad X kromosoomile vastavad mikrokiibi proovid alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni, Y-teljel on proovide eeldatavad koopia arvud.

Punasega on märgitud MK-*MAPH* abil leitud duplitseerunud ala.

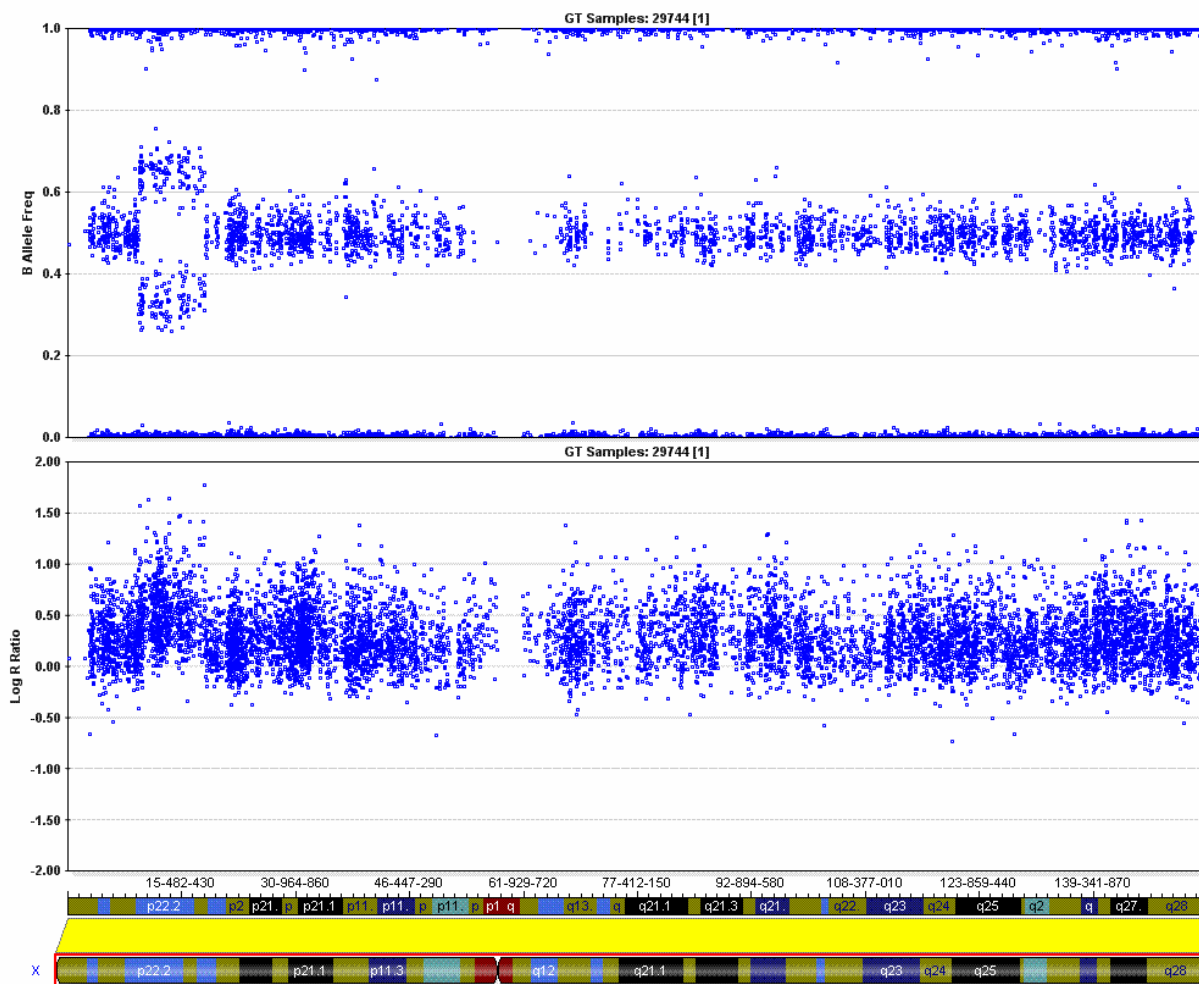
LISA 5. Mikrokiibil põhineva *MAPH* analüüsi tulemuste kinnitamine Illumina analüüsiga – patsient nr. 29743



Ülemisel joonisel on esitatud MK-*MAPH* analüüsil leitud duplikatsiooni detekteerimine Illumina platvormiga, kasutades parameetrina alleelisagedust (*B allele frequency*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad alleelisageduse väärtused.

Alumisel joonisel on toodud duplikatsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina normaliseeritud signaaliintensiivsust (*logR ratio*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad signaaliintensiivsused. Duplikatsiooni kohal on *logR ratio* väärtused suurenenud.

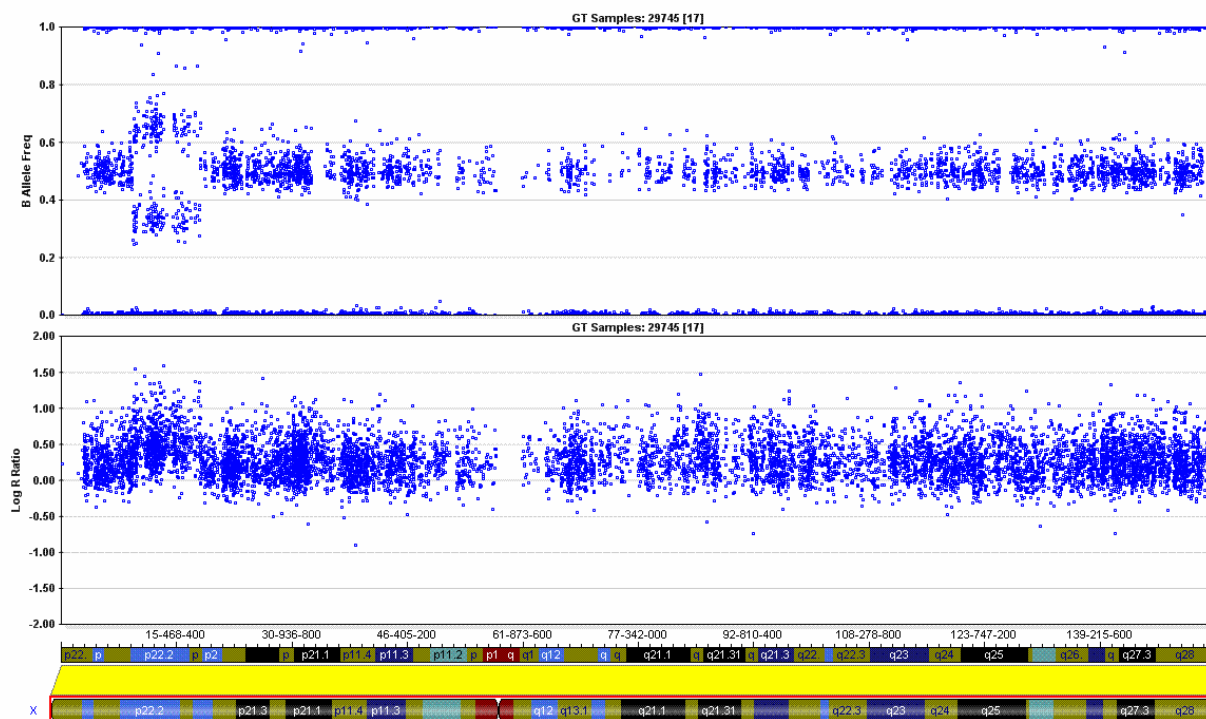
LISA 6. Mikrokiibil põhineva *MAPH* analüüsi tulemuste kinnitamine Illumina analüüsiga – patsient nr. 29744



Ülemisel joonisel on esitatud MK-*MAPH* analüüsil leitud duplikatsiooni detekteerimine Illumina platvormiga, kasutades parameetrina alleelisagedust (*B allele frequency*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad alleelisageduse väärtused. Duplikatsiooni kohal on toimunud heterosügootide jagunemine (*split*) kaheks klastriks (üks 0.67, teine 0.33 juures).

Alumisel joonisel on toodud duplikatsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina normaliseeritud signaaliintensiivsust (*logR ratio*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad signaaliintensiivsused. Duplikatsiooni kohal on *logR ratio* väärtused suurenenud.

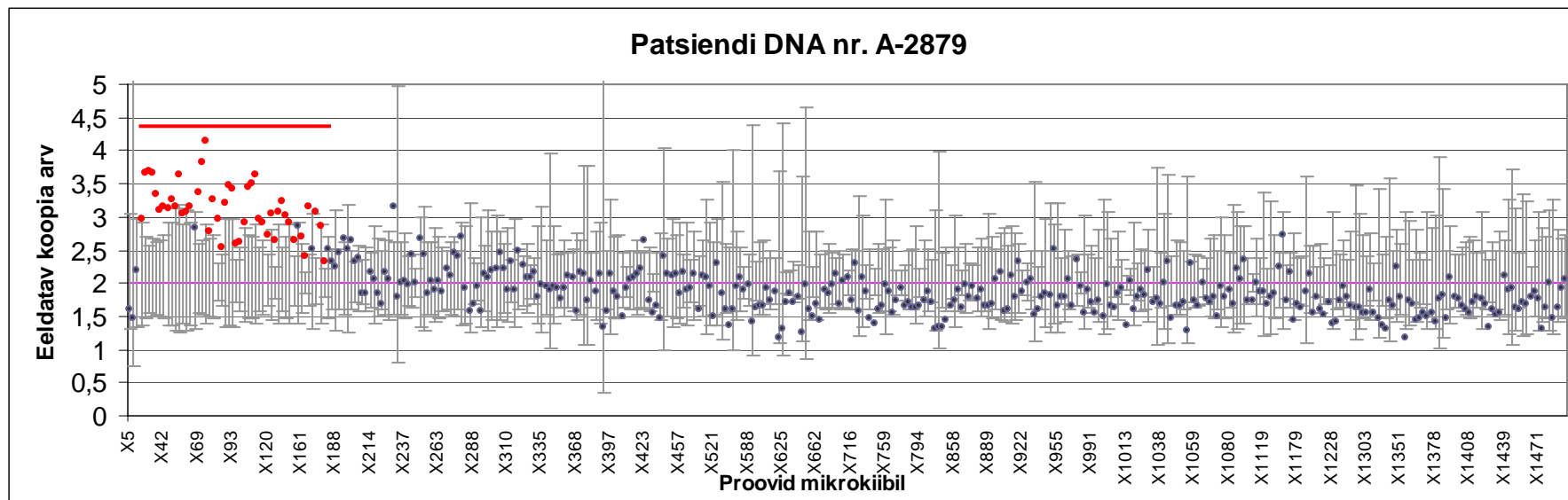
LISA 7. Mikrokiibil põhineva *MAPH* analüüsi tulemuste kinnitamine Illumina analüüsiga – patsient nr. 29745



Ülemisel joonisel on esitatud MK-*MAPH* analüüsil leitud duplikatsiooni detekteerimine Illumina platvormiga, kasutades parameetrina alleelisagedust (*B allele frequency*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad alleelisageduse väärtused. Duplikatsiooni kohal on toimunud heterosügootide jagunemine (*split*) kaheks klastriks (üks 0.67, teine 0.33 juures).

Alumisel joonisel on toodud duplikatsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina normaliseeritud signaaliintensiivsust (*logR ratio*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad signaaliintensiivsused. Duplikatsiooni kohal on *logR ratio* väärtused suurenenud.

LISA 8. Mikrokiibil põhinev *MAPH* analüüs DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks – patsient nr. A-2879

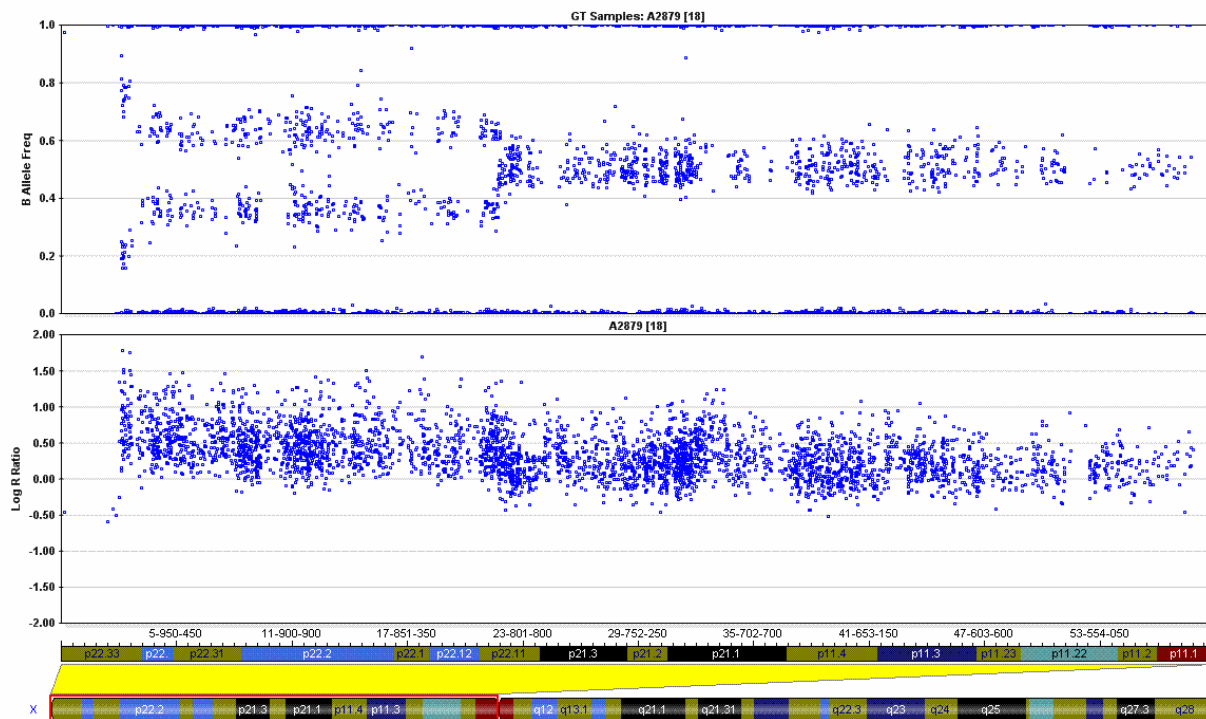


Joonisel on roosa joonega tähistatud proovide mediaanväärtus antud analüüsil, mustalt kujutatud veapiirid näitavad kontrollpaneeli usaldusvahemikku iga proovi jaoks, sinised ja punased punktid iseloomustavad normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid uuritavas DNA-s.

Graafiku X-teljel paiknevad X kromosoomile vastavad mikrokiibi proovid alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni, Y-teljel on proovide eeldatavad koopia arvud.

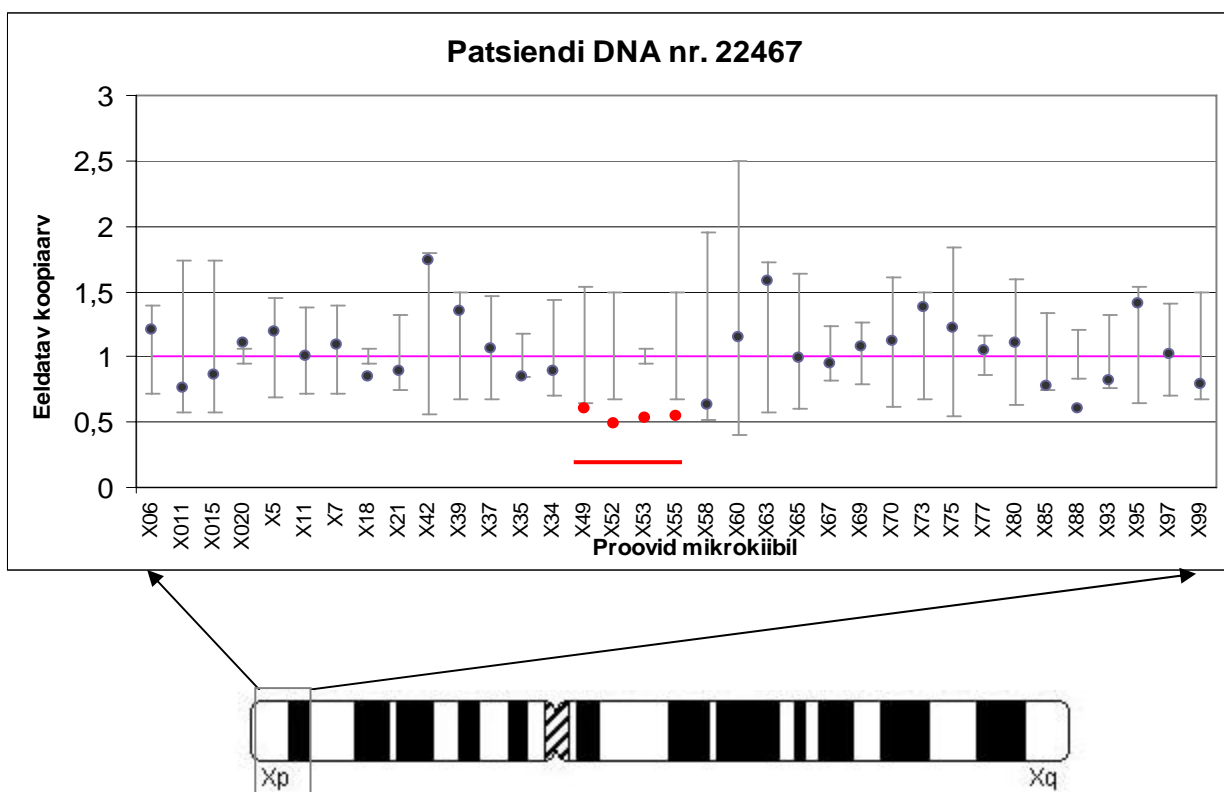
Punasega on märgitud MK-*MAPH* abil leitud duplitseerunud ala.

LISA 9. Mikrokiibil põhineva *MAPH* analüüsi tulemuste kinnitamine Illumina analüüsiga – patsient nr. A-2879



Ülemisel joonisel on esitatud MK-*MAPH* analüüsil leitud duplikatsiooni detekteerimine Illumina platvormiga, kasutades parameetrina alleelisagedust (*B allele frequency*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad alleelisageduse väärtused. Duplikatsiooni kohal on toimunud heterosügootide jagunemine (*split*) kaheks klastriks. Alumisel joonisel on toodud duplikatsiooni detekteerimine, kasutades parameetrina normaliseeritud signaaliintensiivsust (*logR ratio*). Graafiku X-teljel paiknevad HumanHap300-Duo mikrokiibile valitud X kromosoomil leiduvad *SNP*-d alates Xp telomeersest otsast kuni Xq telomeerse ala lõpuni. Y-teljel on *SNP*-dele vastavad signaaliintensiivsused. Duplikatsiooni kohal on *logR ratio* väärtused suurenenud. Xp distaalses otsas on detekteeritav 5-6 koopiaga ala.

LISA 10. Mikrokiibil põhinev *MAPH* analüüs DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks – patsient nr. 22467

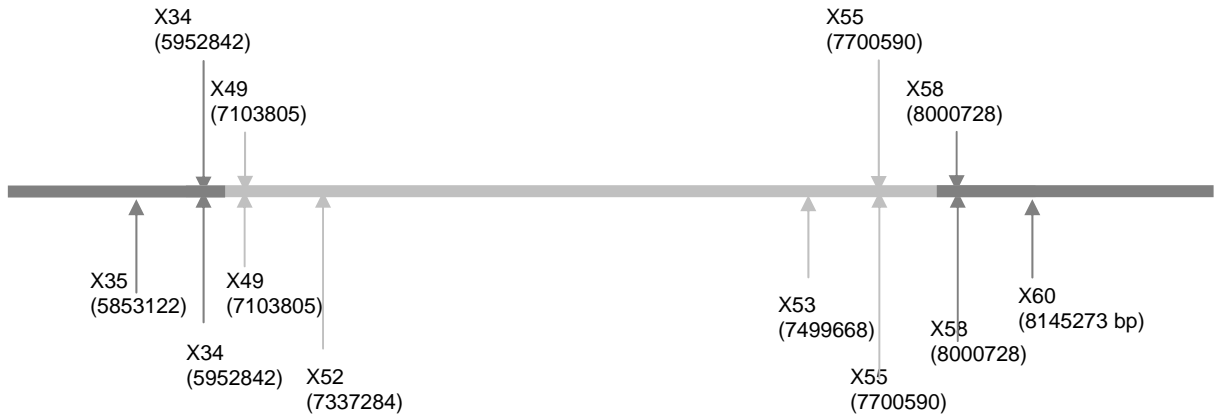


Joonisel on roosa joonega tähistatud proovide mediaanväärtus antud analüüsil, mustalt kujutatud veapiirid näitavad kontrollpaneeli usaldusvahemikku iga proovi jaoks, sinised ja punased punktid iseloomustavad normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid uuritavas DNA-s.

Graafiku X-teljel paiknevad X kromosoomile vastavad mikrokiibi proovid alates Xp telomeersest otsast (proov X06) kuni Xp22.2 (proov X99), Y-teljel on proovide eeldatavad koopia arvud.

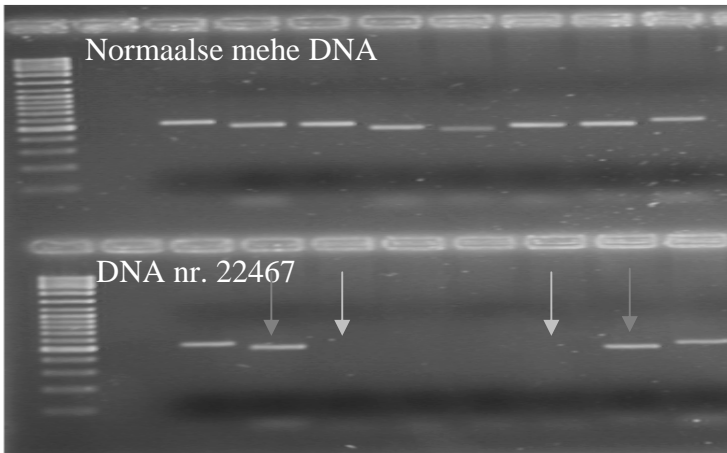
Punasega on märgitud MK-*MAPH* abil leitud deleteerunud ala.

LISA 11. MK-*MAPH* poolt leitud aberratsiooni kinnitamine lookusspetsiifilise PCR-i abil - patsient nr. 22467

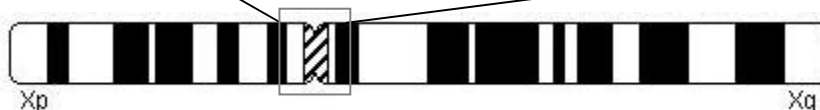
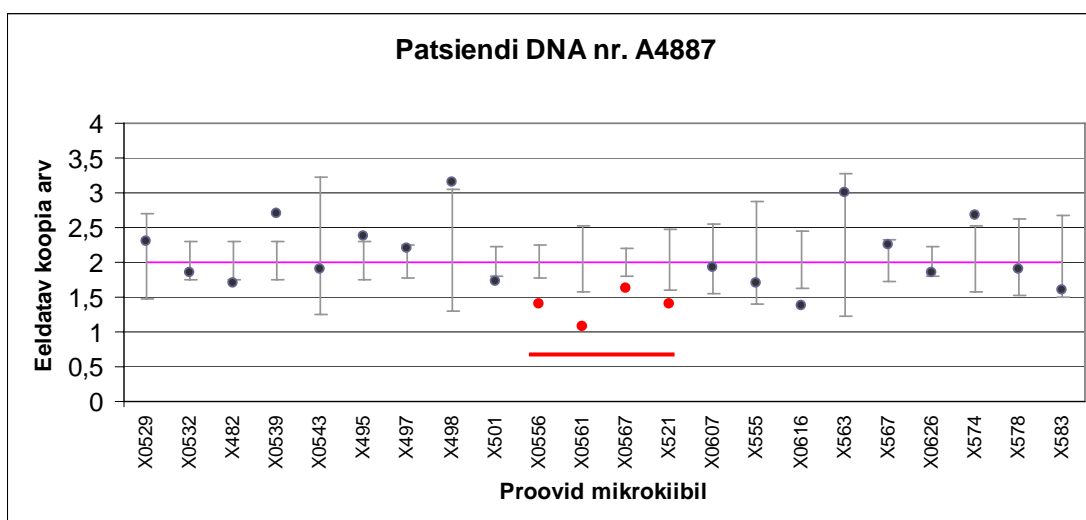
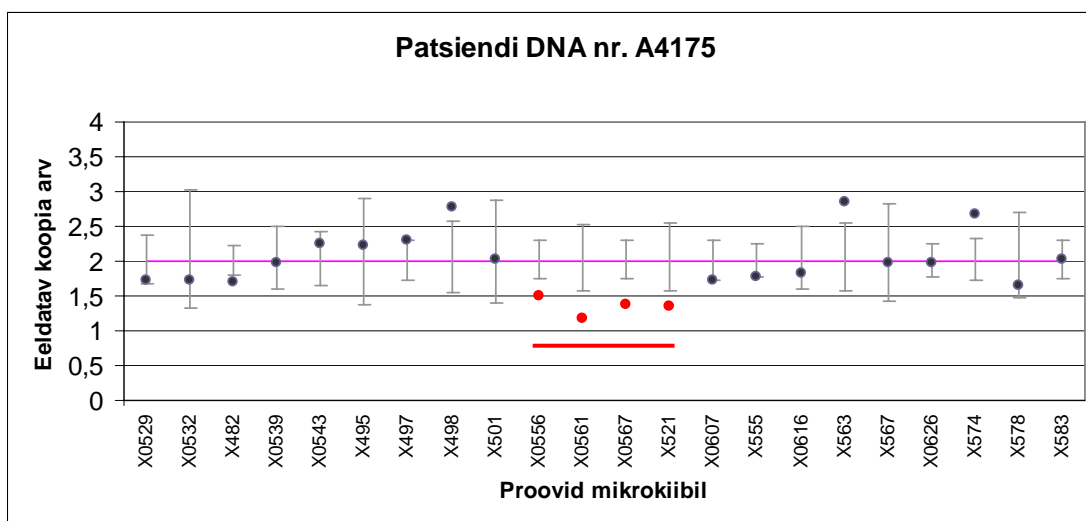


- Deletereunud ala, detekteeritud MK-*MAPH* meetodil
- Mittedeletereunud ala, detekteeritud MK-*MAPH* meetodil
- ↓ ↓ Deletsiooni murdekohad, detekteeritud MK-*MAPH* meetodil
- ↑ ↑ Deletsiooni murdekohad, kinnitatud lookusspetsiifilise PCR-iga

100bp ladder **X35** **X34** **X49** **X52** **X53** **X55** **X58** **X60**



LISA 12. Mikrokiibil põhinev *MAPH* analüüs DNA koopiaarvu muutuste tuvastamiseks – patsiendid nr. A4175 ja A4887



Joonisel on roosa joonega tähistatud proovide mediaanväärtus antud analüüsil, mustalt kujutatud veapiirid näitavad kontrollpaneeli usaldusvahemikku iga proovi jaoks, sinised ja punased punktid iseloomustavad normaliseeritud fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid uuritavas DNA-s.

Graafiku X-teljel paiknevad X kromosoomile vastavad mikrokiibi proovid alates Xp11.22 (proov X0529) kuni Xq12 (proov X583), Y-teljel on proovide eeldatavad koopia arvud.

Punasega on märgitud MK-*MAPH* abil leitud deleteerunud ala.