

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Karmen Vaiküll

**Meditsiinilist sekkumist vajavate geenivariantide leidmine Eesti Geenivaramu
geenidonoritel**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Bioloogia

Juhendajad Neeme Tõnisson PhD

Liis Leitsalu MSc

TARTU 2016

ABSTRAKT

Meditsiinilist sekkumist vajavate geenivariantide leidmine Eesti Geenivaramu geenidoonoritel

Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium (ACMG) on koostanud 56 geeni miinimumnimekirja, mille alusel soovitatakse anda tagasisidet meditsiiniliselt oluliste geenivariantide kohta. Kuna Eesti Geenivaramu soovib anda haigusseoseliste geenivariantide kohta geenidoonoritele tagasisidet, oli käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks leida Eesti Geenivaramu geenidoonoritel ACMG nimekirja alusel teadaolevalt ja eeldatavalt patogeensed geenivariandid. Tulemusteks saadi vastavaid geenivariante 28, millest 10 olid teadaolevalt patogeensed. Kokku esines vastavaid geenivariante 41 isikul, kellest 16 isikul esines teadaolevalt või eeldatavalt patogeenne BRCA1 või BRCA2 geenivariant, mis võib põhjustada pärilikku rinna- või munasarjavähki. Saadud tulemused on esialgsed ning patogeensete geenivariantide otsimist jätkatakse.

Märksõnad: ACMG, juhuleiud, tagasiside

T490 Biotehnoloogia

Identifying medically actionable mutations in gene donors of Estonian Genome Center

The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) has published recommendations about reporting medically actionable incidental findings in 56 genes to genome and exome sequencing participants. As one of the aims of Estonian Genome Center is to provide feedback to its gene donors, the aim of this study was to identify known and expected pathogenic mutations in gene donors of Estonian Genome Center. 28 gene variants were detected respectively in which 10 of the variants was known pathogenic. Known and expected pathogenic mutations was found together in 41 individuals, 16 of them were carrying BRCA1 or BRCA2 variants related to hereditary breast and ovarian cancer. However these are not the final results and additional research is necessary.

Keywords: ACMG, incidental findings, disclosure

T490 Biotechnology

SISUKORD

ABSTRAKT	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Variatsioonid inimgenoomis	7
1.2. Mutatsioonid ja nende patogeneetilised mehhanismid	7
1.3. Mendeleeruvad ehk monogeensed haigused.....	8
1.3.1. Autosoom-dominantne pärandumine	9
1.3.2. Autosoom-retsessiivne pärandumine	10
1.3.3. X-kromosoomne pärandumine	10
1.4. Juhuleiud meditsiinigeneetilistes uuringutes	11
1.5. ACMG 56 geeni nimekiri	11
1.6. Geenivariantide patogeensuse hindamine	15
1.6.1. Geenivariantide andmebaasid	16
1.7. Meditsiiniliselt oluliste leidude tagasiside eetilised aspektid	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1. Töö eesmärk.....	20
2.2. Materjal ja meetodika	20
2.2.1. Valim.....	20
2.2.2. Töö etapid.....	20
2.2.3. Geenivariantide HGVS tähiste kontroll	21
2.2.4. Geenivariantide patogeensuse hindamine	22
2.2.5. Geenivariantide esinemise kontroll	23
2.3. Tulemused.....	24
2.4. Arutelu	27
KOKKUVÕTE	29
SUMMARY	30

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	31
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	35
TÄNUAVALDUSED.....	36
LIHTLITSENTS.....	37

KASUTATUD LÜHENDID

ACMG – *American College of Medical Genetics and Genomics*, Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium

AD – autosoomdominantne

AR – autosoomretsessiivne

BIC – *Breast Cancer Information Core*

cDNA – *complementary DNA*, komplementaarne DNA

EP – eeldatavalt patogeenne

HGMD – *The Human Genome Mutation Database*

HGVS – *Human Genome Variation Society*

InSiGHT – *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours*

mRNA – *messenger RNA*, informatsiooni-RNA

SD – semidominantne

TP – teadaolevalt patogeenne

TÜ EGV – Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu

UCSC – *University of California Santa Cruz*, California Santa Cruzi Ülikool

XL – X-liiteline

SISSEJUHATUS

Tehnoloogiline areng võimaldab üha enam uurida seoseid inimeste genotüübi ja fenotüübi vahel. Inimeste fenotüübilisele varieeruvusele on aluseks genotüübiline varieeruvus. Genotüübi varieerumises mängivad olulist rolli mutatsioonid, mis põhjustavad ka pärilikke haigusi. Pärilike mendeleeruvate ehk nn monogeensete haiguste puhul on ühe geeni ja selle variantide mõju fenotüübile erinevalt polügeensetest väga kõrge ning seetõttu on neid lihtsam seostada konkreetsete geenivariantidega.

Nii kliinilises praktikas kui teaduses kasutatakse haigusseoseliste variantide otsimisel üha enam suuri paneel- või ülegenoomseid sekveneerimisuuringuid. Selliste uuringute tulemusena võidakse avastada geenivariante, mis ei ole otseselt seotud konkreetse uuringu eesmärgiga, kuid millest teavitamine uuritavatele võib olla meditsiiniliselt oluline, näiteks võib aidata antud haigusi ennetada või varem avastada. Samas kätkeb haigusseoselistest geenivariantidest teavitamine ka mitmeid riske, mistõttu jätkuvalt arutletakse teadus- ja meditsiiniüldsuses, kuidas ja milliste juhuslikult avastatud geenivariantide kohta peaks tagasisidet andma.

Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegium (ACMG, *American College of Medical Genetics and Genomics*) on koostanud minimaalse soovitusliku geeninimekirja, millistest geenivariantidest võiks uuritavatele tagasisidet anda. Arvestada tuleb, et kunagi ei ole võimalik geenivariantide alusel ennustada kõiki terviseriske ning alati on võimalik, et mingid riskid jäävad tähelepanuta, kuna kõikide geenivariantide olulisus fenotüübile ei ole selge.

Käesoleva bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse ülevaade mutatsioonide rollist pärilike haiguste tekkes, monogeensete haiguste pärandumisviisidest, Ameerika Meditsiinigeneetika ja Genoomika Kolleegiumi koostatud geeninimekirjast ning geenivariantide haigusseoselisuse hindamisest. Samuti käsitletakse pärilike terviseriskide tagasisidega seotud eetilisi aspekte.

Kuna Eesti Geenivaramu soovib toetada terviseedendust ning hakata „Inimgeeniuringute seadusest“ lähtuvalt andma tagasisidet pärilike terviseriskide kohta, on töö praktilise osa eesmärkideks teha esmavalik Eesti Geenivaramu geenidonorite ülegenoomsel sekveneerimisel tuvastatud meditsiiniliselt olulistest geenivariantidest, lähtudes ACMG koostatud geeninimekirjast.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Variatsioonid inimgenoomis

Uue põlvkonna sekveneerimistehnoloogia on muutnud võimalikuks identifitseerida inimeste geneetilist varieeruvust, mis on aluseks inimeste fenotüübilisele mitmekesisusele. Ülegenoomset sekveneerimist on võimalik teostada kiiresti ning järjest väiksemate kuludega. (Smith jt., 2016) On leitud, et iga genoom sisaldab rohkem kui 4 miljonit referentsjärjestusest erinevat variatsiooni (Goddard jt., 2014) ning iga inimene kannab umbes 250 kuni 300 funktsiooni kadu põhjustavat geenivarianti, millest 50 kuni 100 teatakse olevat seotud pärilike haigustega (Altshuler jt., 2010). Kuna enamiku sagedaste ja harvaesinevate variantide mõju fenotüübile ja sealhulgas haigusriskidele on teadmata, on vaja veel väga palju teha, et mõista genotüübi ja fenotüübi vahelisi seoseid, mis on praegu üks põhilistest eesmärkidest bioloogias ja meditsiinis (Altshuler jt., 2010).

1.2. Mutatsioonid ja nende patogeneetilised mehhanismid

Variatsioone genoomis põhjustavad DNA struktuuris toimuvad muutused ehk mutatsioonid. Enamik mutatsioone on neutraalsed mõjutamata fenotüüpi. Kui mutatsiooni tulemusena tekib muutus fenotüübis, on enamasti tegemist kahjuliku mutatsiooni ehk geeniveaga, mis võib viia pärilike haiguste tekkeni. (Mikelsaar jt., 2010) Mutatsioon võib tekkida sugurakus, pärandudes sugulise paljunemise abil järglastele või somaatilises rakus, pärandudes raku järglaskonnale (Heinaru, 2012). Mutatsiooni ulatus võib varieeruda ühe nukleotiidi muutusest terve kromosoomi kadumiseni (Turnpenny ja Ellard, 2012).

Mutatsioonid võib jagada punktmutatsioonideks, mille puhul toimub ühe nukleotiidi asendumine teisega ning deletsioonideks ja insertioonideks, mille korral toimub vastavalt ühe või enama nukleotiidi kadumine või lisandumine. Üheks insertiooni vormiks on duplikatsioon, mille puhul toimub nukleotiidi või DNA lõigu kahekordistumine. (Mikelsaar jt., 2010) Kõige sagedamini esinevaks mutatsioonitüübiks on punktmutatsioon (Turnpenny ja Ellard, 2012).

Punktmutatsiooni tagajärjel võib asenduda üht aminohapet kodeeriv koodon teise koodoniga, mille tõttu aminohape vahetub (*missense* mutatsioon) tekitades muutusi sellele vastava valgusstruktuuris ja talitluses. Tekkida võib ka enneaegne stoppkoodon (*nonsense* mutatsioon), mille tõttu lõpeb geeniproducti süntees põhjustades valgutootmise lõppemise või lühema valgus, mis ei funktsioneer. (Mikelsaar jt., 2010) Deletsioonid ja insertioonid kutsuvad esile

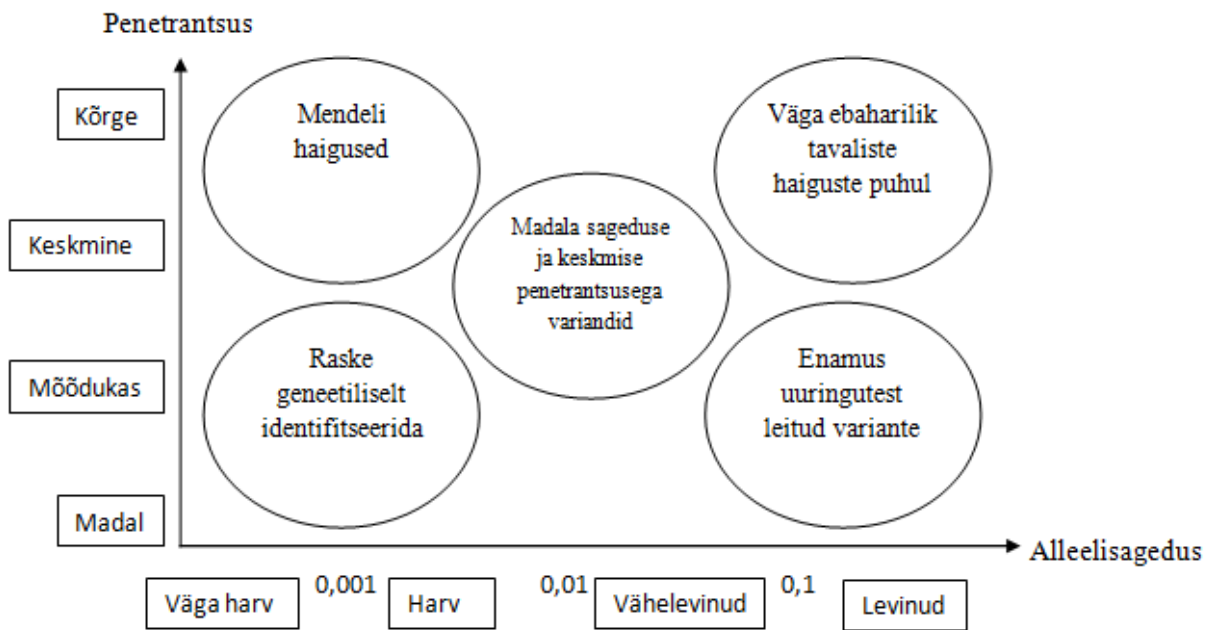
raaminihkemutatsioone, kui DNA lõigu pikkus ei jagu enam kolmega. See toob kaasa vale aminohappeahela või enneagse stoppkoodoni tekke. (Turnpenny ja Ellard, 2012)

DNA mittekodeerivas alas olevad mutatsioonid enamasti fenotüübilist efekti ei anna (Turnpenny ja Ellard, 2012), välja arvatud mutatsioon 5' promootoralas, mille tulemusena ei kopeerita informatsiooni mRNA-ks (Mikelsaar jt., 2010), või teistes regulaatoralades, mis mõjutavad geeniekspressiooni taset. Mutatsioonid kõrgelt konserveerunud splaiss-saitides põhjustavad splaissingu kõrvalekaldeid, mille tulemusena võib kaduda kodeeriv järjestus või säilida intronjärjestus, mis omakorda viivad lugemisraami nihkeni. (Turnpenny ja Ellard, 2012)

Kui geeniproducti võime oma normaalse funktsiooni täitmiseks kaob (nullaleel) või väheneb, on tegemist *loss-of-function* tüüpi mutatsiooniga, kui aga tekib uus funktsioon, on tegemist *gain-of-function* mutatsiooniga, mis mõlemad toovad kaasa valgustruktuuri muutuse, põhjustades haiguse. (Strachan jt., 2015)

1.3. Mendeleeruvad ehk monogeensed haigused

Pärilikud haigused võivad tekkida mitmel viisil: mutatsioonist geenipaari ühes või mõlemas alleelis (monogeenselt) (Mikelsaar jt., 2010) või mutatsioonist mitmes erineva lookusega geenis (polügeenselt) (Turnpenny ja Ellard, 2012). Hulgitegurilike haiguste väljakujunemist mõjutavad suurel määral keskkonnategurid ning need ei järgi Mendeli pärandumisseadusi (Turnpenny ja Ellard, 2012). Samuti on teada näiteid modifitseerivatest geenidest ning oligogeenselt pärilikkusest, mistõttu ka nn monogeensed haigused võivad avalduda varieeruvail kujul ja erinevas vanuses ning avaldumine ei jälgi seetõttu alati Mendeli pärandumisseadusi (Strachan jt., 2015). Enamik sagedasematest haigustest, näiteks astma, diabeet, kõrgvererõhutõbi, südamelihase infarkt, ajuinfarkt, migreen jt on hulgitegurilised. Monogeenselt päranduvate ehk mendeleeruvate haiguste puhul on üldiselt keskkonnategurite tähtsus väike. Neid haigusi esineb harvem, kuid neil on kõrgem penetrantsus (Joonis 1). Monogeensete haiguste avaldumine ehk fenotüübi muutus sõltub nende pärandumisviisist. Eristatakse autosoomdominantset, -retsessiivset ning X- ja Y-kromosoomset pärilikkust, kuid Y-kromosoomselt päranduvaid haigusi teada ei ole. (Mikelsaar jt., 2010) Küll on teada liigse Y-kromosoomi (XYY, XYYY) mõju fenotüübile.



Joonis1. Geenivariandid alleelisageduse ja geneetilise efekti tugevuse järgi (muudetud joonis Mccarthy jt., 2008)

1.3.1. Autosoom-dominantne pärandumine

Autosoom-dominantse pärilikkuse puhul avaldub haigus juhul, kui on tegemist heterosügootsete isikutega, mille puhul geenipaari üks alleel on mutantne ning teine alleel normaalne. Haige vanema lastel on 50% tõenäosus saada mutantne või normaalne alleel (Mikelsaar jt., 2010). Haigus esineb järjestikustes põlvkondades ning meestel ja naistel sama sagedusega (Heinaru, 2012).

Dominantse pärandumise korral on haiguse penetrantsus enamasti sajaprotsendiline (Strachan jt, 2015), kuid võib ette tulla mittetäielikku penetrantsust, mille puhul on mutatsioon olemas, kuid ei avaldu fenotüübis ning haigete põlvkondade vahel on terve isik. Ühes perekonnas võib haigus avalduda ka erineva raskusastmega, kergetest sümptomitest eluohtliku seisundini. Sellisel juhul on tegemist varieeruva ekspressiooniga. (Mikelsaar jt., 2010)

Autosoom-dominantsed haigused esinevad tavaliselt haige vanema järglastel, kuid võib juhtuda, et haigust põhjustav geen ei pärine kummaltki vanemalt ning tervetel vanematel on haige laps. Sel juhul on tegemist uusmutatsiooniga, mis on tekkinud vanema sugurakus. Haigelt lapselt pärandub haigusgeen edasi tavapärasel viisil. (Mikelsaar jt., 2010) Kui aga mõlemad vanemad on haiged, on lapsel tõenäosus olla haiguse suhtes homosügootne. Haigus võib sel juhul olla tõsisem või avalduda varasemas eas. (Turnpenny ja Ellard, 2012) Kui

haigus kulgeb heterosügootses olekus homosügootsest olekust kergemini, on alleel semidominantne (Heinaru, 2012).

Paljud dominantseid haigused võivad olla heterogeensed, misjuhul sama haigust põhjustavad erinevad mutatsioonid samas alleelis (alleelne heterogeensus) või mutatsioonid erinevates geenides (lookusheterogeensus) (Mikelsaar jt., 2010).

1.3.2. Autosoom-retsessiivne pärandumine

Retsessiivse pärandumise korral avaldub haigus ainult juhul, kui geeni mõlemas alleelis on mutatsioon ehk isik on haiguse suhtes homosügoot. Heterosügootidel retsessiivsed haigused ei avaldu ning neid kutsutakse haiguse kandjateks (Turnpenny ja Ellard, 2012). Retsessiivsete haiguste puhul võib sündida tervetel vanematel haige laps. Haigus pärandub 25% tõenäosusega ning tihti õdedel-vendadel ei kordu. Kuna retsessiivsete haiguste mutatsioonide kandjaid on vähe, esineb neid haigusi eriti harva. Haigel isikul tavaliselt haigeid lapsi ei sünni, kuna tõenäosus, et abikaasa kannab sama geeniviga, on väga väike. Suurem on tõenäosus sugulusabieludes. (Mikelsaar jt., 2010)

Retsessiivselt päranduvate haiguste kulg on erinevalt dominantsetest haigustest isikuti üsna sarnane. Nagu dominantsete haiguste puhul, esineb nii alleelset- kui lookusheterogeensus. Mõnel juhul on retsessiivsete haigustega isikud mutatsiooni suhtes ühendheterosügootid, mis tähendab, et haigust põhjustava geeni eri alleelides on erinevad mutatsioonid. (Mikelsaar jt., 2010)

1.3.3. X-kromosoomne pärandumine

X-kromosoomse pärandumise puhul on nii mutatsiooni kandumine kui tagajärjed sugupooltel erinevad. Kuna meestel esineb ainult üks X-kromosoom, on nemad haiguse suhtes hemisügootid. X-kromosoomset dominantset pärilikkust eristab autosoomdominantsest pärilikkusest vaid haiguse puudumine haige mehe poegadel, sageli ka haiguse kergem vorm naistel X-kromosoomi inaktvatsiooni tõttu. Nii X-kromosoomse dominantse kui retsessiivse pärilikkuse puhul pärivad haigusgeeni mehelt kõik tütreid ning mitte ükski poeg. Mutatsiooniga naise poegadel on 50% risk retsessiivselt päranduvat haigust põdeda. Naistel kahe X-kromosoomi tõttu retsessiivne haigus ei avaldu, kuid X-kromosoomi mittejuhusliku inaktvatsiooni tõttu võib neil siiski kergeid sümptomeid esineda. (Mikelsaar jt., 2010)

1.4. Juhuleiud meditsiinigeneetilistes uuringutes

Eksoomi ja genoomi sekveneerimine on kiiresti levinud meditsiinipraktikasse. Koos arenenud bioinformaatiliste võimalustega kasutatakse sekveneerimist näiteks haruldaste haiguste molekulaarsel iseloomustamisel, individuaalse ravi määramisel, farmakogenoomikas, sünnieelses uuringus ning haigusriskide populatsioonipõhisel hindamisel. Uuringute käigus võidakse avastada geenivariante, mille leidmine ei ole otseselt seotud konkreetse uuringu eesmärgiga, kuid mis võivad olla meditsiiniliselt olulised. (Green jt., 2014) Selliseid juhuslikult avastatud variante nimetatakse juhuleidudeks. Neid võib ka tahtlikult otsida, seetõttu kohati nimetatakse selliseid leide sekundaarseteks (Olfson jt., 2015).

Juhuleiud esinevad ka teaduspraktikas. Kuna genoomi sekveneerimine, mis viiakse läbi teaduses, erineb meditsiinis kasutatavast, tuleb teha vahet teaduses ja meditsiinis esinevatel juhuleidudel. Teadustöö on tavaliselt avastusele orienteeritud ning hõlmab uuringus laiemat hulka geene või kogu genoomi. Kliinilised rakendused keskenduvad üldiselt konkreetsetele geenidele, et panna diagnoos või määrata parim ravi. Sekveneerimine teostatakse sealjuures kõrgetasemelise katvusega, et saada võimalikult täpsed tulemused. (Budin-Ljøsne jt., 2016)

Nii teadlased kui arstid on eetilise dilemma ees, kas teavitada inimesi meditsiiniliselt olulistest juhuleidudest ning on palju vaieldud kuidas ja mil määral seda tuleks teha (Cassa jt., 2012). Praeguseks on leitud nii teadlaste kui arstide seas, et põhjendatult oluliste juhuleidude kohta on soovituslik tagasisidet anda (Lohn jt., 2014).

Teadlastele ei ole seni antud selgeid juhendeid juhuleidudest teavitamise kohta (Knoppers jt., 2015). Seniste juhendite kohaselt peavad tagasisidestatavad leiud olema analüütiliselt usaldusväärsed, põhjendatult olulised ning meditsiinilist sekkumist võimaldavad, kuid puuduvad kindlaksmääratud lisakriteeriumid ja meetodid, mille alusel leidude kvalifitseerumist hinnata (Budin-Ljøsne jt., 2016).

1.5. ACMG 56 geeni nimekiri

Kuna tagasisidet on eeskätt soovituslik anda meditsiinilist sekkumist võimaldavate ehk nn sekkumistõhusate (*actionable*) geenivariantide kohta (Hofmann, 2016), tuleb need geenid ja geenivariandid eristada mittepatogeensetest, teadmata tähendusega geenivariantidest ning geenidest ja geenivariantidest, mis on küll haigusseoselised, kuid haigust ei ole võimalik ennetada või selle kulgu oluliselt mõjutada. Sekkumistõhus tähendab, et geenivariant on

patogeenne või suure tõenäosusega patogeenne ning võimaldab meditsiinilist sekkumist, vähendades märkimisväärselt haigestumist või suremust (Roche ja Berg, 2015).

2013. aastal andis ACMG töögrupp välja eelkõige kliinilises praktikas kasutamiseks mõeldud miinimumnimekirja sekkumistõhusatest geenidest ja nendega seotud haigustest. Nimekiri koosneb 56 geenist (tabel 1), millega seotud geenivariantidest tuleks inimestele teada anda, olenemata nende vanusest ja soost. Nimekirjas olevatele geenidele vastab 24 harvaesinevat haigusseisundit, mis valiti nimekirja seetõttu, et on kõige sagedamini esinevad monogeensed haigused ning vastavatest geenivariantidest teadmine võimaldaks haigust ennetades või ravides ära hoida nendest tulenevat rasket tervisehäiret. Teavitama peaks ainult sellistest geenivariantidest, mis on varasemalt kirjeldatud ning tunnistatud haigusseoseliseks (patogeenseks) või geenivariantidest, mida pole varasemalt kirjeldatud, kuid eeldatakse, et need võivad suure tõenäosusega haigust põhjustada. Keskendumata peaks punktmutatsioonidest ning väikestest insertioonidest ja deletsioonidest põhjustatud haigustele. ACMG töögrupp soovib uuritavatelt nimekirja kuuluvaid geenivariante aktiivselt otsida. (Green jt., 2014)

Eestis on ACMG nimekiri kasutusele võetud eksoomi sekveneerimise puhul Tartu Ülikooli Kliinikumis.

(http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/images/stories/Saatelehed/Eksoomi_sekveneerimine_nousoleku_vorm.pdf)

Tabel 1. ACMG nimekiri (Green jt., 2013)

Fenotüüp	Avaldumise iga	Geen	Pärandumine	Variant, millest teatada
Pärilik rinna- ja munasarjavähk	Täiskasvanu	BRCA1	AD	KP & EP
		BRCA2		
Li-Fraumeni sündroom	Laps/täiskasvanu	TP53	AD	KP & EP
Peutz-Jeghers'i sündroom	Laps/täiskasvanu	STK11	AD	KP & EP
Lynchi sündroom	Täiskasvanu	MLH1	AD	KP & EP
		MSH2		
		MSH6		
		PMS2		
Perekondlik	Laps	APC	AD	KP & EP

adenomatoosne polüpoos				
MUTYH-seoseline polüpoos	Täiskasvanu	MUTYH	AR	KP & EP
Von Hippel Lindau sündroom	Laps/täiskasvanu	VHL	AD	KP & EP
Mitmekordne endokriinne neoplaasia tüüp I	Laps/täiskasvanu	MEN1	AD	KP & EP
Mitmekordne endokriinne neoplaasia tüüp II	Laps/täiskasvanu	RET	AD	KP
Perekondlik medullaarne kilpnäärmevähk	Laps/täiskasvanu	RET	AD	KP
PTEN hamartoomi tuumori sündroom	Laps	PTEN	AD	KP & EP
Retinoblastoom	Laps	RB1	AD	KP & EP
Pärilik paranglioom-feokromotsütoomi sündroom	Laps/täiskasvanu	SDHD	AD	KP & EP
		SDHAF2		KP
		SDHC		KP & EP
		SDHB		
Tuberoosse skleroosi kompleks	Laps	TSC1	AD	KP & EP
		TSC2		
Wilmsi tuumor	Laps	WT1	AD	KP & EP
Neurofibromatoos tüüp I	Laps/täiskasvanu	NF2	AD	KP & EP
Ehlersi-Danlos sündroom, vaskulaarne tüüp	Laps/täiskasvanu	COL3A1	AD	KP & EP
Marfani sündroom, Loeys-Dietz sündroom, perekondlik aordi aneurüsm ja dissektsioon	Laps/täiskasvanu	FBN1	AD	KP & EP
		TGFBR1		
		TGFBR2		
		SMAD3		
		ACTA2		
		MYLK		
MYH11				

Hüpertroofiline kardiomiopaatia, laienuud kardiomiopaatia	Laps/täiskasvanu	MYBPC3	AD	KP & EP
		MYH7		KP
		TNNT2		KP & EP
		TNNI3		KP
		TPM1		
		MYL3		
		ACTC1		
		PRKAG2		
		GLA	XL	KP & EP
		MYL2	AD	KP
		LMNA		KP & EP
Katehholaminergiline polümorfne ventrikulaarne tahhükardia		RYR2	AD	KP
Arütmogeenne parema vatsakese kardiomiopaatia	Laps/täiskasvanu	PKP2	AD	KP & EP
		DSP		
		DSC2		
		TMEM43		KP
		DSG2		KP & EP
Romano-Wardi pika QT sünoom tüüp I, II ja III, Brugada sündroom	Laps/täiskasvanu	KCNQ1	AD	KP & EP
		KCNH2		
		SCN52		
Perekondlik hüperkolesteroleemia	Laps	LDLR	SD	KP & EP
		APOB	SD	KP
		PCSK9	AD	
Pahaloomulise hüpertermia vastuvõtlikkus	Laps/täiskasvanu	RYR1	AD	KP
		CACNA1S		

KP- kindlalt patogeenne, EP- eeldatavalt patogeenne

AD- autosoomdominantne, SD- semidominantne, AR- autosoomretsessiivne, XL- X-liiteline

1.6. Geenivariantide patogeensuse hindamine

Geenivariantide patogeensuse hindamine põhineb alleelisagedustel, *in silico* ennustatavatel efektidel, esinemisel tervetel kontrollisikutel, teaduskirjandusel ning geenivariantide andmebaasidel. Kõige olulisemad allikad on haigusseoselisuse osas teaduskirjandus ja lookus-spetsiifilised andmebaasid (Hegde jt., 2015) (tabel 2). Meditsiinilist olulisust aitavad selgitada ka funktsionaalsed või perekondliku segregatsiooni uuringud (Shkedi-Rafid jt., 2014). Alati ei ole võimalik geenivariantide olulisust siiski täpselt määratleda, sest esineb palju variante, mille tähendus on ebaselge (Strong jt., 2014). Lisaks leitakse pidevalt uusi geenivariante, mille kohta varasemalt andmed puuduvad (Shkedi-Rafid jt., 2014).

ACMG on välja andnud soovitusel mendeleeruvaid haigusi põhjustavate variantide klassifitseerimiseks viide kategooriasse: patogeensed, tõenäoliselt patogeensed, healoomulised, tõenäoliselt healoomulised ja ebaselge tähendusega (VUS, *variant of uncertain significance*), kusjuures „tõenäoline“ viitab üle 90% kindlusele (Richards jt., 2015). Variandi patogeensust tõestab juhendi kohaselt kõige tugevamini nullalleel geen, mille funktsiooni kadumine on haiguse põhjuseks. Lisaks annavad tõestust patogeensusele näiteks uusmutatsioon patsiendil, kellel esinevat haigust perekonnas varem olnud ei ole, variandi sageduse suurenemine haigetel isikutel võrreldes sagedusega kontrollisikutel ning funktsionaalsete uuringute käigus tuvastatud kahjustav efekt geenile või geeniproduktile. Healoomulisusele viitab tugevalt üle 5% alleelisagedus populatsioonis või kõrgem alleelisagedus, kui vastava haiguse puhul eeldatav. Healoomulisusele viitab ka see kui uuritaval haigusel on täielik penetrantsus lapseas, kuid vastav variant leitakse tervel täiskasvanul või kui funktsionaalsete uuringute käigus on tõestatud mutatsiooni kahjustava mõju puudumine valgu funktsioonile või splaissingule. (Richards jt., 2015)

Missense muutuse kahjustava mõju ennustamiseks kasutatakse lisaks *in silico* analüüsi, näiteks PolyPhen2, SIFT ja MutationTaster jt arvutiprogrammidega, mis toetuvad fülogeneetilisele ja struktuursele informatsioonile. Enamike algoritmide ennustustäpsus on aga 65-80%, (Richards jt., 2015) kuna täielikult automatiseeritud analüüs ei arvesta patsiendi kliinilise informatsiooni ega perekondlike andmetega, mis võivad tegelikke olukordi mõjutada (Lohn jt., 2014).

Tõsiseks probleemiks variantide liigitamise juures on muutuv teadmistepagas (Lohn jt., 2014). Kuna II põlvkonna sekveneerimistehnika abil identifitseeritakse variante üle terve genoomi, on enamus leidudest ebaselge tähendusega (Goddard jt., 2014). Praegu ebaselge tähendusega geenivariandid võivad aga tulevikus osutuda olulisteks (Lohn jt., 2014). Samuti

võib esineda süstemaatilistest sekveneerimisvigadest tulenevaid valepositiivseid leide (Goldfeder jt., 2015). Seega on enne tagasiside andmist soovitatav iga mutatsiooni olemasolu kontrollida teise meetodiga, näiteks Sangeri sekveneerimisega (Berg jt., 2012).

1.6.1. Geenivariantide andmebaasid

Geenivariantide patogeensuse hindamine toetub suuresti andmebaasides olevale infole. Tabelis 2 on toodud näiteid geenivariantide andmebaasidest koos kirjeldustega.

Tabel 2. Näiteid geenivariantide andmebaasidest

Andmebaas	Kirjeldus
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ Laia ulatusega andmebaas, mis sisaldab infot geenivariantide kliinilisest olulisusest. Variantid on igas suuruses ning pärinevad igast genoomi piirkonnast, nii sugu-kui somaatilistest rakkudest. Variantide interpretatsioon toimub kliiniliste - ja teaduslaborite, lookuspõhiste andmebaaside, ekspertpaneelide ja praktiliste juhendite põhjal. (Landrum jt., 2015)
HGMD (<i>The Human Genome Mutation Database</i>)	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php Ulatuslik andmebaas, mis sisaldab sugurakkudes toimunud mutatsioone inimese pärilike haigustega seotud geenides. Andmebaas sisaldab mutatsioone, millel on tõendeid haigusseoselisuse kohta või mis võivad olla potentsiaalselt seotud haigusega. Andmed mutatsioonide kohta saadakse teaduslikust kirjandusest. (Stenson jt., 2013)
LOVD (<i>Leiden Open Variation Database</i>)	http://www.lovd.nl/ Andmebaaside süsteem, kuhu kogutakse geenivariante lookuspõhistest andmebaasidest. Andmeid saavad lisada registreeritud kasutajad, lisatud info kinnitatakse kuraatorite poolt. (Fokkema jt., 2011)
BIC (<i>Breast Cancer Information Core</i>)	https://research.nhgri.nih.gov/bic/ Lookuspõhine andmebaas, mis sisaldab andmeid rinnavähiga seotud geenide BRCA1 ja BRCA2 mutatsioonidest. Andmeid saavad lisada registreeritud kasutajad, enne avaldamist vaadatakse need üle juhtivkomitee liikmete poolt. (https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/application.cgi)

<p>InSiGHT (<i>International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours</i>)</p>	<p>http://insight-group.org/variants/classifications/ Lookuspõhine andmebaas, mis keskendub Lynchi sündroomiga seotud MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 geenide mutatsioonide klassifitseerimisele. Variantide patogeensust määrab spetsiaalne komitee kirjanduse põhjal, millele järgneb kinnitamine telefonikonverentsi teel. (Plazzer jt., 2013)</p>
---	--

1.7. Meditsiiniliselt oluliste leidude tagasiside eetilised aspektid

Palju on arutletud, kas ülegenoomse sekveneerimise tagajärjel leitud geenivariantidest peaks uuritavaid teavitama, kui need ei ole otseselt seotud uuringute eesmärgiga. Valdavalt on jõutud üksmeelele, et meditsiiniliselt oluliste leidude kohta tuleks tagasisidet anda. Seda siiski ainult uuritavate nõusolekul (Dal-Ré jt., 2014).

Üks olulisemaid põhjusi tagasiside toetamiseks on võimalus vähendada haigestumist ja suremust haigustesse, mida saab ravida ja ennetada (Lohn jt., 2014). Näiteks patsiendil APC geeni inaktiveeriva ja jämesoolevähki tekitava geenivariandi avastamine võimaldab võtta patsient jälgimise alla ning avastada vähk varases staadiumis, mil see allub ravile kõige paremini (Hegde jt., 2015). Teise põhjusena tagasiside toetamiseks on välja toodud inimeste õigus saada informatsiooni, mis puudutab neid endid (Lohn jt., 2014). Uuringud on ka näidanud, et nii arstid kui teadlased tunnevad moraalselt kohustust teavitada meditsiiniliselt olulistest leidudest, sest see informatsioon kuulub uuritavatele (Knoppers jt., 2015). Kui inimesed on teadlikud juhuleidude esinemisest, võivad nad teadlaste vaikimist tõlgendada sellena, et neil ei esine terviseriske mõjutavaid leide (Wolf jt., 2012). Kolmandaks võib mutatsioonileid uuritaval ennustada ka teiste pereliikmete haigestumist. Näiteks autosoom-retsessiivse haigusega seotud alleeli kandlusel ei ole tähtsust kandja tervisele, kuid see võib mõjutada järeltulijate tervist. Pärilikest haigusriskidest teadmine võib aidata teha reproduktiivseid valikuid või elustiili ja tervisekäitumise muutusi (Shkedi-Rafid jt., 2014). Samuti võib lapse testimisel leitud juhuleidude edastamine aidata ennetada tõsist terviseprobleemi lapsevanemal, näiteks teavitada suurenenud vähiriskist ja anda võimaluse varaseks meditsiiniliseks sekkumiseks (Green jt., 2014). (Green jt., 2014).

Tagasiside andmise teeb keeruliseks see, et geenivariantide meditsiinilist olulisust võib olla raske kindlaks teha ning healoomulised variandid võidakse määrata patogeenseks või

vastupidi (Shkedi-Rafid jt., 2014). Teadmine patogeensetest geenivariantidest võib põhjustada inimestele ängistust ning töö- ja elukindlustusealast diskrimineerimist (Hegde jt., 2015), millel võivad olla suuremad tagajärjed kui mutatsioonil endal (Knoppers jt., 2015). Uuringud näitavad, et tuntakse vastutust rääkida mutatsioonileiust ka sugulastele, sest informatsioon võib neile kasulik olla. Kuid on leitud, et inimeste jaoks on keeruline ühendust võtta, sest ei olda sugulastega kontaktis või tuntakse võimetust jagada sellist keerulist informatsiooni. (Shkedi-Rafid jt., 2014) Uuringutest on selgunud, et mõned osalejad keeldusid kandjastaatuse informatsioonist, sest vastav käitumine oleks vastuolus nende religioosete tõekspidamistega. Samuti tõdeti, et teadmine kandjastaatusest ei ole üheselt positiivne, vaid koormab ning põhjustab muret. (Roche ja Berg, 2015) Lapsi ei peaks rahvusvaheliste soovitude kohaselt täiskasvanueas avalduvate geneetiliste haiguste osas testima, kui puudub meditsiiniline kasulikkus. On ka välja toodud, et lapse huvi peaks olema ainus põhjus testimiseks ning tulemuste tagasisideks. (Shkedi-Rafid jt., 2014)

Enne leidudest teavitamist, tuleb saada uuritavalt nõusolek. Nõusoleku saamise protsessis tuleb käsitleda nii potentsiaalset kasu kui kaasnevaid riske (Wolf jt., 2012), kuna inimesed reageerivad oma geneetilisele infole erinevalt, tundes muret või hoopis valmisolekut tegutsemiseks (Budin-Ljøsne jt., 2016). Teadlike otsuste tegemiseks tuleb inimesi harida ülegenoomse sekveneerimise osas, sest paljud uuringud on näidanud, et laiemal üldsusel ei ole head ülevaadet ja mõistmist geneetikast (Knoppers jt., 2015). Tagasiside peab olema teostatud nii, et sellest saab aru ilma kõrgema astme geneetikaalaste teadmisteta (Hegde jt., 2015). Kuna esineb väga palju geenivariante, mida ei osata tõlgendada, on tähtis jagada uuritavale informatsiooni, millel on selge tähendus. Uuringutest on selgunud, et see vähendab stressi ja depressiooniriski võrreldes ebaselge geneetilise informatsiooni jagamisega (Lohn jt., 2014).

Tagasisidet peaks läbi viima isik, kellel on teadmised vastava leiukohta. Selleks võib vaja minna nii geneetilist nõustajat kui ka arsti, kuid alati ei ole sellist koostööd lihtne rajada (Budin-Ljøsne jt., 2016). Professionaalid, kes viivad läbi tagasikutsumist, peavad olema valmis soovitama edasisi toiminguid või tagama hea ligipääsu ravile (Wolf jt., 2012). Leidude kindlakstegemine, tõlgendamine ja nendest teavitamine ning kliiniline kontroll vajavad aga lisarahastust ja võivad suurendada tervishoiuasutuste ajakulu (Shkedi-Rafid jt., 2014). On leitud, et suurim väljakutse leidudest teavitamisel on arstide ajapuudus ja piiratud kompetents pärilike haigustega tegelemisel (Yu jt., 2014), aga ka geeninõustajate ja meditsiinigeneetikute vähesus. Sellest tulenevalt võib tagasisidet teostada järk-järgult, alustades kõige kiireloomulisematest juhtudest. (Budin-Ljøsne jt., 2016) Juhul kui patsiendil on

meditsiinilistes andmetes juba olemas leiuga seostuv diagnoos, ei ole kohustust leiust teavitada (Wolf jt., 2012). Samas jääb siis ebaselgeks leiu pärandumine perekonnas ning kasutamata võimalus pereliikmete terviseriskide vähendamiseks.

Murekohaks on, kas uurija peab või võib informeerida leiust, kui osaleja ei ole andnud varasemalt nõusolekut või on tagasisidest keeldunud, kuid leiul on suur tähtsus tervise seisukohalt ning terviseriski oleks võimalik ära hoida. Näiteks on leitud geenivariant seotud katastroofilise reaktsiooniga tavalise ravimi suhtes ning leiust teavitamine võimaldaks selle ravimi vältimist. (Wolf jt., 2012) Eetika nõuete kohaselt tuleb austada uuritava autonoomset otsust leiust mitte teada (Dal-Ré jt., 2014). Kuna arstidel on aga kohustus arvestada patsiendi heaoluga võivad nad tulevikus vastutada meditsiiniliselt oluliste leidude mitteteatamise eest (Shkedi-Rafid jt., 2014).

Uuringud on näidanud, et suurem osa uuritavatest soovib saada tagasisidet ülegenoomsete testide käigus leitud geenivariantide kohta, eriti kui on leitud midagi tõsist (Wolf jt., 2012), sest teadmised tajutakse rohkem kasu kui kahju (Roche ja Berg, 2015). Näiteks 94% 200-st eksoomi sekveneerimises osalejast soovis ühes avaldatud uuringutest saada geneetilist tagasisidet (Blackburn jt., 2015). Tulemusi ei saa aga otse kasutada tegeliku otsuse ennustamiseks, kuna osalejate vaated toetuvad hüpoteetilistele situatsioonidele (Roche ja Berg, 2015). Üha enam tajutakse laborite kohustust otsida ja tagasisidestada informatsiooni, mis võib olla elupäästev (Turbitt jt., 2014), kuna oleks ebaeetiline jätta kasutamata potentsiaalselt kättesaadav informatsioon, mis võimaldab haigusi ennetada (Middleton jt., 2015).

Vähestes biopankades on võimalik oma geneetilistele andmetele ligi pääseda, kuna puudub sellekohane riiklik seadusandlus ning vastav biopanga ülesehitus (Budin-Ljøsne jt., 2016). Eesti inimgeeniuringute seaduse kohaselt on geenidonoril õigus saada teavet enda kohta säilitatavatest andmetest, samuti on Eesti geenivaramu üheks eesmärgiks rahvatervise edendamine (<https://www.riigiteataja.ee/akt/72581>). Seega oleks võimalik Eesti geenidonoritel neil esinevate leidude kohta teavet saada.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Bakalaureusetöö on üks pilootprojekte Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) geenidoonorite meditsiinilist sekkumist vajavatest geenivariantidest teavitamisel, mille eesmärgiks on anda võimalus uuritavatel teha tervisealaseid otsuseid ning soovi korral suunata neid personaliseeritud käsitlemiseks tervishoiusüsteemi.

Käesoleva töö eesmärgiks on genotüübiinfo alusel sekkumistõhusaid mutatsioone kandvate isikute tuvastamine, milleks tuleb ekspertpaneelide koostatud ACMG geeninimekirja alusel Eesti Geenivaramu geenidoonoritel leida patogeenseid ja eeldatavalt patogeenseid geenivariante.

2.2. Materjal ja meetoodika

2.2.1. Valim

Bakalaureusetöös kasutati TÜ EGV 2244 ülegenoomselt sekveneeritud geenidoonori andmeid (WGS 2244 kohort). Kohorti kuuluvad vähemalt 18-aastased geenidoonorid juhusliku valiku alusel üle Eesti. Lõputöös otsiti andmed isikutelt, kellel leidis ACMG nimekirjas toodud geenides teadaolevalt või eeldatavalt patogeenseid eeldatavat funktsioonikadu põhjustavaid geenivariante (enneaegset stoppkoodonit tekitavaid punktmutatsioone, raaminihet tekitavaid insertioone või deletsioone, muutusi kanoonilistes splaiss-saitides). Loetletud mutatsioonid põhjustavad eeldatavalt vastava geeni normaalse funktsiooni kadumise, mis omakorda võib viia vastava päriliku haiguse tekkeni.

2.2.2. Töö etapid

Tööd alustati 2244 uuritava ACMG nimekirja geenides leitud eelnevalt annoteeritud geenivariantide tekstitabelitega, mis saadi töögrupi liikmete käest.

Sellest järgnevalt:

1. Selekteeriti vastavate geenide ja valkude eeldatavad funktsioonikadu põhjustavad variandid;
2. Kontrolliti ja täiendati Human Genome Variation Society (HGVS) tähiseid;

3. Hinnati variantide patogeensust HGMD, ClinVar, LOVD ja lookusspetsiifiliste (BIC, InSiGHT) andmebaaside põhjal;
4. Disainiti sekveneerimise teostamiseks praimerid;
5. Kontrolliti sekveneerimisandmete põhjal mutatsioonide esinemist vastavatel isikutel.

2.2.3. Geenivariantide HGVS tähiste kontroll

Andmebaaside otsingu teostamiseks leiti geenivariantidele tähised HGVS loodud nomenklatuuri alusel (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), mis on üldtunnustatud viis geenivariantide kirjeldamiseks. Osadel juhtudel olid annotatsioonifailides andmebaaside ja ennustuste kaudu tähised juba olemas. Et annotatsioonid on osalt positsiooni-, mitte variandipõhised, tuli neil juhtudel kontrollida tähiste tõesust.

- Esmalt leiti California Santa Cruzi Ülikooli (UCSC) Human GRCh37/hg19 geeni brauseri (<http://genome.ucsc.edu/>) abil muutunud alusega külgnev järjestus vähemalt 10 nukleotiidi ulatuses, kasutades vastavat kromosoomi numbrit ning muutunud aluse positsiooni, mis saadi algandmetest.
- Kasutades algandmetest saadud „ENST“ numbrit, leiti Ensembl GRCh37.p13 genoomi brauserist (http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) vastava geeni cDNA referentsjärjestus. Referentsjärjestuselt leiti UCSC brauseriga saadud järjestuse abil muutuse cDNA- ja valgupositsioon.
- Alternatiivse ahelaga järjestuse puhul leiti esmalt komplementaarne järjestus kasutades Reverse Complement programmi (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) ning alles seejärel leiti vastav cDNA- ja valgupositsioon kasutades Ensembl brauserit
- Referentsjärjestust võrreldi muutusega vastavas cDNA- ja valgupositsioonis algandmetest saadud alternatiivse järjestusega ning muutus kirjeldati HGVS tähise abil.

Geenivariantidele leiti tähised cDNA põhjal ning, välja arvatud introonsetele variantidele, ka valgu põhjal. Geenivariantide tähistes esinev „c.“ osutab cDNA alusel leitud tähisele ning „p.“ valgupõhisele tähisele. Võimalike töös esinevate tüüp tähiste tähendused on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Näiteid tähistest koos tähendustega

Tähis	Tähendus
c.780G>A	„>“ viitab ühenukleotiidsele asendusele. Antud juhul on guaniin positsioonis 780 asendunud adenosiiniga.
c.610_611insTAGG	„ins“ viitab insertioonile. Positsioonide 610 ja 611 vahele on lisandunud lõik TAGG.
c.861_864delACAG	„del“ viitab deletsioonile. Positsioonis 861 kuni 864 on toimunud lõigu ACAG deletsioon.
c.5329dupC	„dup“ viitab duplikatsioonile. Tsütosiin positsioonis 5329 on duplitseerunud, uus Tsütosiin asub positsioonis 5330.
c.1348-1delG	„-“ viitab muutusele eksonile eelnevas intronis. 1348 on intronile järgneva eksoni esimese nukleotiidi number, „-1“ tähendab muutust introni esimeses positsioonis alustades lugemist pärast eksoni esimest nukleotiidi, eksonile eelneva introni suunas.
c.1681+2T>C	„+“ viitab muutusele eksonile järgnevas intronis. 1681 on intronile eelneva eksoni viimase nukleotiidi number. „+2“ tähendab muutust introni teises positsioonis alustades lugemist pärast eksoni viimast nukleotiidi.
p.Arg863*	„*“ viitab stoppkoodonile. Positsioonis 863 on Arginiin asendunud stoppkoodoniga.
p.Gln1777fs*	„fs“ viitab insertiooni või deletsiooni tagajärjel toimunud raamnihkele, Glutamiin positsioonis 1777 on esimene raamnihkest mõjutatud aminohape. „*“ tähistab variandi põhjustatud enneaegse stoppkoodoni teket

2.2.4. Geenivariantide patogeensuse hindamine

Geenivariantide patogeensuse hindamisel kasutati andmebaasides olevat infot. Töös kasutati ClinVar, HGMD, LOVD 2.0, BIC ja InSIGHT andmebaase. Otsing teostati HGVS tähiste alusel.

Variandid klassifitseeriti nelja kriteeriumi alusel:

- tõenäoliselt healoomulised, kui andmebaasis oli vastav märges või kui geenivariantide esinemissagedus oli kõrge;
- ebamäärase tähendusega, kui ei olnud võimalik patogeensusele hinnangut anda;
- teadaolevalt patogeenne, kui variant oli esindatud andmebaasis ning klassifitseeritud patogeenseks;
- eeldatavalt patogeenne, kui varianti ei esinenud andmebaasis, kuid oli alust kahtlustada patogeensust.

Tulemuste osas esitletakse ainult kahele viimasele kriteeriumile vastavaid geenivariante.

2.2.5. Geenivariantide esinemise kontrollimine

Patogeensetele BRCA1 ja BRCA2 geenivariantidele teostati Eesti Biokeskuse tuumiklaboris mutatsioonide olemasolu kontrollimiseks sekveneerimine Sangeri meetodil. Selleks disainiti praimerid (tabel 5) ennustatud sulamistemperatuuri (T_m) järgi ning nende sobivust kontrolliti UCSC *in silico* analüüsi programmiga. Sekveneerimisel saadud sekvensid joondati BioEdit v7.0.4 programmiga. Sekventse võrreldi vastava referentsjärjestusega Ensembl genoomi brauseris.

Tabel 5. Kasutatud praimerid

Praimeri nimetus	Pärisuunalise praimeri järjestus
BRCA1_ex12_F	5' CCATACTAGGTGATTTCAATTCCTGT 3'
BRCA1_ex10.3_F	5' TGAGAAAAATCCTAACCCAATAGAA 3'
BRCA1_ex20_F	5' TGACGTGTCTGCTCCACTTC 3'
BRCA1_ex10.4_F	5' GTTGCTACCGAGTGTCTG TCT 3'
BRCA2_ex20_F	5' CAAGTAGCTGAGCCACCACA 3'
BRCA2_ex5-6_F	5' TGTGAGTACATATGTGTTGGCAT 3'
BRCA2_ex23_F	5' CCCACAAAGAGATAATATAAAAGAGGA 3'
	Vastassuunalise praimeri järjestus
BRCA1_ex12_R	5' GACAAGAACCAAGGCTCCAT 3'
BRCA1_ex10.3_R	5' GAGTGCCATAATCAGTACCAGGTA 3'
BRCA1_ex20_R	5' GGTGGGATGGAAGAGTGAA 3'
BRCA1_ex10.4_R	5' CGTCCTAGCTGTGTGAAGGA 3'
BRCA2_ex20_R	5' CAGGCATAATAACACATGAAAGCT 3'
BRCA2_ex5-6_R	5' TGCCTGTATGAGGCAGAATG 3'
BRCA2_ex23_R	5' TGCCAAGTGGTAGCTCCAAC 3'

2.3. Tulemused

Antud töö eesmärgiks oli tuvastada geenidonoritel esinevaid teadaolevalt (TP) või eeldatavalt patogeenseid (EP) variante geenides, mis on välja toodud ACMG 56 meditsiinilist sekkumist vajava geeni miinimumnimekirjas. Antud töö käigus analüüsiti punktmutatsioone, insertioone ja deletsioone sisaldavaid geenivariante, mis võivad eeldatavalt põhjustada geeni funktsiooni kadu. 17 ACMG nimekirja geenid leiti 28 kriteeriumitele vastavat geenivarianti, millele vastab teoreetiliselt vähemalt 12 erinevat haigusseisundit. 28-st geenivariandist 10 olid andmebaasides klassifitseeritud patogeenseks. Ülejäänud geenivariante andmebaasides ei esinenud ning need klassifitseeriti eeldatavalt patogeenseks, kuna nende esinemissagedus populatsioonis oli väike ning nende ennustatud mõju kõrge. Kokku leiti TP ja EP geenivariante 41 uuritavaal. Neist 16 isikul esines TP või EP geenivariant perekondliku rinna- ja munasarjavähiga seotud BRCA1 ja BRCA2 geenides. Tulemused on esitatud tabelis 6.

Tabel 6. Geenivariandid patogeensuse järgi

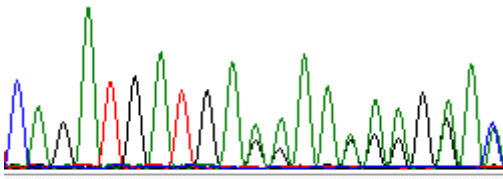
Haigus	Geen	cDNA tähis	Valgu tähis	Patogeensus	Isikute arv
Pärilik rinna- ja munasarjavähk	BRCA1	c.4258C>T	p.Gln1420*	TP	1
	BRCA1	c.1840A>T	p.Lys614*	TP	1
	BRCA1	c.5329dupC	p.Gln1756fs*	TP	4
	BRCA1	c.4035delA	p.Glu1345fs*	TP	6
	BRCA2	c.8572C>T	p.Gln2858*	TP	2
	BRCA2	c.467_468insT	p.Lys157*	EP	1
	BRCA2	c.9097_9098insT	p.Thr303fs*	EP	1
Lynchi sündroom	MSH2	c.2131C>T	p.Arg711*	TP	1
	MSH6	c.1095G>A	p.Trp365*	EP	1
	PMS2	c.1144+1G>A	—	TP	1
	PMS2	c.943C>T	p.Arg315*	TP	1
	PMS2	c.861_864delACAG	p.Arg287fs*	TP	1
Perekondlik adenomatoosne polüpoos	APC	c.610_611insTAGG	p.Thr206fs*	EP	1
Perekondlik adenomatoosne polüpoos, tüüp 2	MUTYH	c.780G>A	p.Trp260*	EP	1

Von Hippel Lindau sündroom	VHL	c.8_9ins18	p.Ala11fs*	EP	1
Neurofibromatoos tüüp I	NF2	c.1702_1703delAG	p.Arg568fs*	EP	1
Ehlersi-Danlos sündroom	COL3A1	c.1348-1delG	—	EP	1
Hüpertroofiline kardiomiopaatia	MYH7	c.1257+1G>A	—	EP	1
Polümorfne ventrikulaarne tahhükardia	RYR2	c.13493_13494delAC	p.Asn4498fs*	EP	1
Arütmogeenne parema vatsakese kardiomiopaatia	PKP2	c.2300-2A>T	—	EP	3
	DSG2	c.1652-1G>A	—	EP	2
Pika QT sündroom	KCNH2	c.2587C>T	p.Arg863*	TP	1
	SCN5A	c.655C>T	p.Arg219*	EP	1
	SCN5A	c.393-1C>T	—	EP	2
Pahaloomulise hüpertermia vastuvõtlikkus	RYR1	c.14385G>A	p.Trp4795*	EP	1
	RYR1	c.6100delT	p.His2035fs*	EP	1
	CACNA1S	c.2707C>T	p.Arg903*	EP	1
	CACNA1S	c.611delT	p.Leu204fs*	EP	1

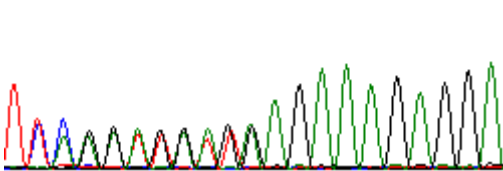
TP- teadaolevalt patogeenne, EP- eeldatavalt patogeenne
— - introonsetel variantidel valgu tähis puudub

Kuna tulevikus soovitakse hakata Eesti Geenivaramus patogeensete geenivariantide kohta geenidoonoritele tagasisidet andma, kontrolliti mutatsioonide olemasolu isikutel Sangeri sekveneerimisega. Eialgu teostati kontroll ainult BRCA1 ja BRCA2 geenivariantidele. Kokku teostati kontroll 16 isikule. Tulemustest selgus, et kõigil 16 isikul esinesid neil varem kirjeldatud BRCA1 või BRCA2 geenivariandid. Tulemuste näiteid on esitatud joonistel 2A, B, C, D.

260 270
CAGATGATGAAAAAAAAAGGAC

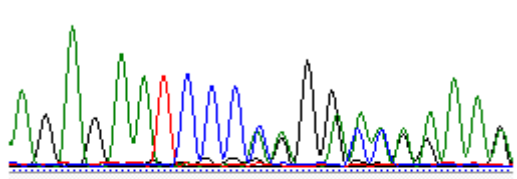


580 590
TTCGGAGGAGAAAGAAAGAGGA

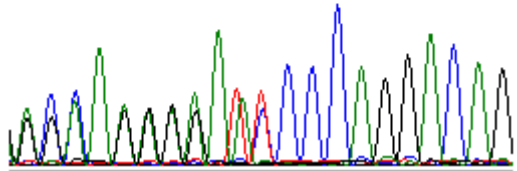


Joonis 2A. Isik 1, c.4035delA

110 120
AGAGAATCCCCAGGACAAAAG

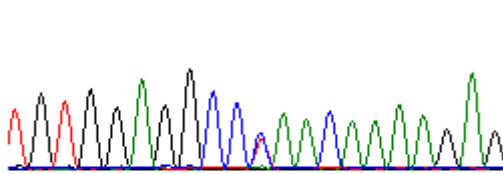


470 480
ACCAAGGAAATCCCAGGACAG

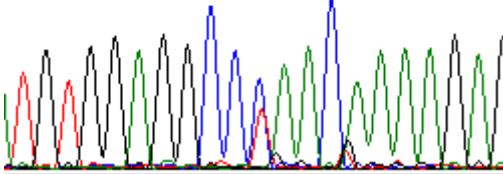


B. Isik 2, c.5329dupC

270 280
TGTGGAGGCCCAACAAAAGAG

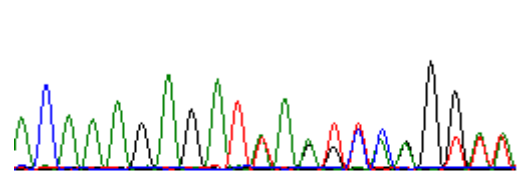


780 790
TGTGGAGGCCCAACAAAAGAC

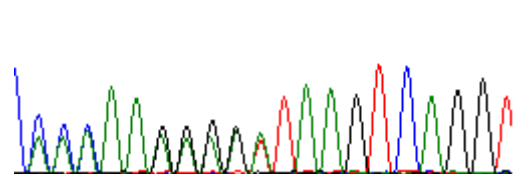


C. Isik 3, c.8572C>T

220 230
ACAAAGAGATAAGTTCAGGAA



630 640
CCCAAGGGGATAAGTTCAGGT



D. Isik 4, c.467_468insT

Joonistel 2A.-D. on välja toodud isikule vastav mutatsioon nii päri- kui vastassuunalisel sekvensil ning sellele eelnev ja järgnev järjestus 10 nukleotiidi ulatuses.

2.4. Arutelu

Töös analüüsiti 2244 Eesti Geenivaramu ülegenoomselt sekveneeritud geenidoonori andmeid ACMG geeninimekirja alusel. Kuigi ACMG nimekiri on mõeldud kasutamiseks kliinilises praktikas, kohendati soovitusi teaduspraktikas kasutamiseks. Nimekirjas esindatud geenid on seotud harvaesinevate pärilike haigustega, mis on peamiselt autosoom-dominantselt päranduvad. Uuringus leiti teadaolevalt või eeldatavalt patogeenseid geenivariante 41 isikul, kokku 17 ACMG nimekirja geenis, millest 16 geeni on seotud autosoom-dominantselt päranduvate haigustega ning 1 geen (MUTYH) autosoom-retsessiivselt päranduva haigusega. Teadaolevalt ja eeldatavalt patogeensed geenivariandid esinesid 1,8 % uuritavatest. Eelnevalt on hinnatud, et sarnaseid leide võiks olla vähemalt 1% uuritavatel (Green jt., 2014). Teistes uuringutes on sarnaseid variante leitud 1-2% uuritavatel (Amendola jt., 2015, Olfson jt., 2015). Erinevused võivad olla tingitud nii valimist, klassifitseerimise erinevustest, kui kasutatavast uuringumetoodikast. Antud töös toodud tulemused moodustavad esmavalimi uuritavate geenivariantidest, kuna esimeses järgus otsiti vaid raaminihkest, *nonsense* mutatsioonidest ja splaiss-saitide kahjustusest tingitud geenide funktsioonikadu põhjustavaid variante. Järgmises etapis plaanitakse analüüsida aminohappe asendusi põhjustavaid *missense* mutatsioone. Kuna eesmärgiks on anda tagasisidet terviseriskide osas, tuleb kriitiliselt hinnata tulemuste tabelis välja toodud eeldatavalt patogeenseid geenivariante. Üheks võimaluseks on seda teha uuritavate terviseandmestikus või pereanamneesis esinevate haiguste esinemise kaudu. Võimalik, et teatud juhtudel peaks viima läbi näiteks segregatsioonianalüüsi pereliikmetel.

Töös leitud 41-st patogeensete geenivariantidega isikust 16 isikul esines pärilikku rinna- või munasarjavähki põhjustavad BRCA1 või BRCA2 geenivariandid, mis on märkimisväärselt suur osa. 14 isikul seejuures oli teadaolevalt patogeenne geenivariant. BRCA1 ja BRCA2 on kaks kõige sagedamini vähi eelsoodumuse tuvastamiseks uuritud geeni (Brookes jt., 2015), seetõttu on ka andmebaasides BRCA1 ja 2 geenide teadaolevate variantide esinemine suurem. Antud töös kinnitati BRCA1 ja 2 geenivariantide esinemist iskulel kontrollsekveneerimise teostamisega. Vastavaid geenivariante kontrolliti esmajärjekorras, kuna need on tagasisides üheks prioriteetidest. TÜ EGV spetsialistidel on eriarstidega olemas eelnev kokkulepe onkoloogiliseks nõustamiseks. Samuti on hiljuti saadud TÜ Inimuuringute eetika komiteest luba uuritavate korduvaks väljakutseks.

Kuna uuringutest on selgunud, et suur osa uuritavatest soovib saada tagasisidet oma terviseriskide kohta, peaks soovijatele potentsiaalset kasulikku informatsiooni võimaldama.

Eelnevalt peab kindel olema, et uuritavatele on antud põhjalik ülevaade nii tagasisidega kaasneda võivatest kasudest kui riskidest, et saaks vastu võtta võimalikult teadliku otsuse tagasisidega nõustuda või sellest keelduda. Tähtis on, et edastatava informatsiooniga saaks uuritav tervise edendamiseks astuda järgmisi samme, kuna teadmine haigusriskist ilma praktilise väärtuseta oleks koormav. Et uuritav ei jääks edastatud informatsiooniga üksi, tuleks koheselt tagada ka suunamine edasistele uuringutele või anda nõu, milliseid abinõusid tervise edendamiseks saaks kasutusele võtta.

KOKKUVÕTE

Antud töö käigus otsiti Eesti Geenivaramu geenidonoritel meditsiinilist sekkumist vajavaid geenivariante ACMG geeninimekirjas olevas 56 geenis, mis on seotud pärilike haigustega, kus varane meditsiiniline sekkumine võimaldaks kas haigust ennetada, varem avastada või millel on olemas efektiivne ravi ning selle kaudu parandada uuritavate hilisemat terviseseisundit. Uuringus tuvastati 2244 ülegenoomselt sekveneeritud geenidonoril teadaolevalt või eeldatavalt patogeenseid geenivariante ACMG nimekirjas toodud geenides. Patogeensust hinnati geenivariantide eeldatava mõju kaudu valgu struktuurile ja funktsioonile ning andmebaaside, sealhulgas lookuspõhiste andmebaaside ja kirjanduse abil. Tulemusena leiti 17 erinevas geenis kokku 28 erinevat geenivarianti, millest 10 olid teadaolevalt ning 18 eeldatavalt patogeensed. Vastavad geenivariandid esinesid kokku 41 isikul, kellest 16 isikul esines BRCA1 ja BRCA2 geenivariant, mis on seotud päriliku rinna- ja munasarjavähiga. Kuna Eesti Geenivaramus on plaanis tulevikus hakata edastama uuritavatele infot terviseriskide kohta, teostati neile 16 isikule kontrollsekveneerimine, et kinnitada neil mutatsiooni esinemine. Kuna antud töö käigus saadud tulemused ei ole lõplikud, ei anna need selget ülevaadet kõikidel uuritavatel isikutel esinevate meditsiiniliselt oluliste geenivariantide kohta. Enne tagasisidet tuleks kontrollida sekveneerimisega kõikide mutatsioonide esinemine vastavatel isikutel. Samuti tuleks jätkata patogeensete geenivariantide otsimist geenidonoritel, et võimaldada neil tulevikus haigusi ennetada või varakult avastada. Enne tagasisidet peaks geenidonoritele põhjalikult selgitama kaasneda võivatest riskidest ja kasudest, et nad saaksid vastu võtta võimalikult teadliku otsuse tagasisidet saada või sellest keelduda.

SUMMARY

Identifying medically actionable mutations in gene donors of Estonian Genome Center

Karmen Vaiküll

With whole genome and exome sequencing being more available in clinical and research practice, the question arises how to act with the mutations found in sequencing that are not related to the aim of the study but yet has a medical significance, causing a disorder that can be prevented or where there is a treatment available. The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) has published recommendations with 56 genes related to the most common monogenic disorders to report those findings to the sequencing participants.

As providing feedback about medically actionable gene variants is one of the aims of Estonian Genome Center, the aim of this study is to identify known and expected pathogenic gene variants in whole genome sequencing gene donors of Estonian Genome Center. Pathogenicity of the variants was evaluated according to the gene variant databases.

In result it is found that 10 variants of 28 clinically significant variants in 2244 gene donors was known pathogenic and that was represented in databases, the other 18 was evaluated as expected pathogenic. 41 individuals together carry known or expected pathogenic variants, in which 16 of them carry the BRCA1 or BRCA2 gene mutation related to the hereditary breast and ovarian cancer. However these are not the final results and as there is no missense mutations involved, the additional research is necessary.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Smith, H. E., Fabritius, A. S., Jaramillo-lambert, A. and Golden, A. (2016). Mapping Challenging Mutations by Whole-Genome Sequencing. *G3* (Bethesda). 1–31. doi:10.1534/g3.116.028316

Goddard, K. A. B., Whitlock, E. P., Berg, J. S., Williams, M. S., Webber, E. M., Webster, J. A., Jennifer, S., Schrader, K. A. and Campos-Outcalt, D. (2014). Description and Pilot Results from a Novel Method for Evaluating Return of Incidental Findings from Next Generation Sequencing Technologies. *Genet. Med.* 15:721–728.

Altshuler, D., Lander, E. and Ambrogio, L. (2010). A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature.* 476:1061–1073.

McCarthy, M. I., Abecasis, G. R., Cardon, L. R., Goldstein, D. B., Little, J., Ioannidis, J. P. A. and Hirschhorn, J. N. (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature.* 9:356–369.

Green, R. C., Berg, J. S., Grody W.W., Kalia, S.S., Korf, B. R., Martin, C. L., McGuire, A., Nussbaum, R.L., O'Daniel, J. M., Ormond, K. E., Rehm, Heidi L., Watson, M. S., Williams, M. S. and Biesecker, L. G. (2014). ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. *Genet. Med.* 15:565–574.

Olfson, E., Cottrell, C. E., Davidson, N. O., Gurnett, C. A., Heusel, J. W., Stitzel, N. O., Chen, L. S., Hartz, S., Nagarajan, R., Saccone, N.L. and Bierut, L. J. (2015). Identification of medically actionable secondary findings in the 1000 genomes. *PLoS One.*10:1–18.

Budin-Ljøsne, I. Mascalzoni, D., Soini, S., Machado, H., Kaye, J., Bentzen, H. B., Rial-Sebbag, E., D'Abramo, F., Witt, M., Schamps, G., Katić, V., Krajnovic, D. and Harris, J. R.. (2016). Feedback of Individual Genetic Results to Research Participants: Is it Feasible in Europe? *Biopreserv. Biobank.* 00:bio.2015.0115.

Cassa, C. A., Savage, S. K., Taylor, P. L., Green, R. C., McGuire, A. L. and Mandl, K. D. (2012). Disclosing pathogenic genetic variants to research participants: quantifying an emerging ethical responsibility. *Genome Res.* 22:421–8.

- Lohn, Z., Adam, S., Birch, P. H. and Friedman, J. M. (2014). Incidental Findings from Clinical Genome-Wide Sequencing: A Review. *J. Genet. Couns.* 23:463–473.
- Knoppers, B. M., Zawati, M. H. and Sénécal, K. (2015). Return of genetic testing results in the era of whole-genome sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 16:553–559.
- Hofmann, B. (2016). Incidental findings of uncertain significance: To know or not to know - that is not the question. *BMC Med. Ethics.* 17:13.
- Roche, M. I. and Berg, J. S. (2015). Incidental Findings with Genomic Testing: Implications for Genetic Counseling Practice. *Curr. Genet. Med. Rep.* 3:166–176.
- Hegde, M., Bale, S., Bayrak-Toydemir, P., Gibson, J., Bone Jeng, L. J., Joseph, L., Laser, J., Lubin, I.M., Miller, C.E., Ross, L. F., Rothberg, P.G., Tanner, A. K., Vitazka, P. and Mao, R. (2015). Reporting incidental findings in genomic scale clinical sequencing - A clinical laboratory perspective: A report of the Association for Molecular Pathology. *J. Mol. Diagnostics.* 17:107–117.
- Strong, K. A., Zusevics, K. L., Bick, D. P. and Veith, R. (2014). Views of nonmedical, health system professionals regarding the return of whole genome sequencing incidental findings. *WMJ.* 113:179–84.
- Shkedi-Rafid, S., Dheensa, S., Crawford, G., Fenwick, A. and Lucassen, A. (2014). Defining and managing incidental findings in genetic and genomic practice. *J. Med. Genet.* 51:715–23.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K. and Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 17:405–423.
- Goldfeder, R., Priest, J. R., Zook, J. M., Grove, M. E., Waggott, D., Wheeler, M. T., Salit, M. and Ashley, E. A. (2015). Medical implications of technical accuracy in clinical genome sequencing. *Genome Med.* 1–12. doi:10.1186/s13073-016-0269-0
- Berg, J., Adams, M., Nassar, N., Bizon, C., Lee, K., Schmitt, C. P., Wilhelmsen, K. C. and Evans, J. P. (2012). An informatics approach to analyzing the incidentalome. *Genet. Med.* 15:1–8.

Landrum, M. J., Lee, J.M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Hoover, J., Jang, W., Katz, K., Ovetsky, M., Riley, G., Sethi, A., Tully, R., Villamarin-Salomon, R., Rubinstein, W. and Maglott, D. R. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 44: D862–8.

Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A. D. and Cooper, D. N. (2014). The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* 133:1–9.

Fokkema, I. F. A. C., Taschner, P. E. M., Schaafsma, G. C. P., Celli, J., Laros, J. F. J. and Den Dunnen, J. T. (2011). LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* 32:557–563.

Plazzer, J. P., Sijmons, R. H., Woods, M. O., Peltomäki, P., Thompson, B., Den Dunnen, J. T. and MacRae, F. (2013). The InSiGHT database: Utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Fam. Cancer* 12:175–180.

Dal-Ré, R., Katsanis, N., Katsanis, S., Parker, L. S. and Ayuso, C. (2014). Managing Incidental Genomic Findings in Clinical Trials: Fulfillment of the Principle of Justice. *PLoS Med.* 11: e1001584.

Wolf, S. M. Crock, B. N., Van Ness, B., Lawrenz, F., Kahn, J. P., Beskow, L. M., Cho, M. K., Christman, M. F., Green, R. C., Hall, R., Illes, J., Keane, M., Knoppers, B. M., Koenig, B. A., Kohane, I. S., LeRoy, B., Maschke, K. J., McGeeveran, W., Ossorio, P., Parker, L. S., Petersen, G. M., Richardson, H. S., Scott, J. A., Terry, S. F., Wilfond, B. S. and Wolf, W. A. (2012). Managing incidental findings and research results in genomic research involving biobanks and archived data sets. *Genet. Med.* 14:361–384.

Blackburn, H. L., Schroeder, B., Turner, C., Shriver, C. D., Ellsworth, D. L. and Ellsworth, R. E. (2015). Management of Incidental Findings in the Era of Next-generation Sequencing. *Curr. Genomics.* 16:159–74.

Yu, J. H., Harrell, T. M., Jamal, S. M., Tabor, H. K. and Bamshad, M. J. (2014). Attitudes of genetics professionals toward the return of incidental results from Exome and whole-genome sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 95:77–84.

Turbitt, E., Wiest, M. M., Halliday, J. L., Amor, D. J. and Metcalfe, S. a. (2014). Availability of treatment drives decisions of genetic health professionals about disclosure of incidental findings. *Eur. J. Hum. Genet.* 22:1225–1228.

Middleton, A., Morley, K. I., Bragin, E., Firth, H. V., Hurles, M. E., Wright, C. F. and Parker, M. (2015). Attitudes of nearly 7000 health professionals, genomic researchers and publics toward the return of incidental results from sequencing research. *Eur. J. Hum. Genet.* 24:1–9.

Amendola, L. M., Dorschner, M. O., Robertson, P. D., Salama, J. S., Hart, R., Shirts, B. H., Murray, M. L., Tokita, M. J., Gallego, C. J., Kim, D. S., Bennett, J. T., Crosslin, D. R., Ranchalis, J., Jones, K. L., Rosenthal, E. A., Jarvik, E. R., Itsara, A., Turner, E. H., Herman, D. S., Schleit, J., Burt, A., Jamal, S. M., Abrudan, J. L., Johnson, A. D., Conlin, L.K., Dulik, M. C., Santani, A., Metterville, D. R., Kelly, M., Foreman, A. K. M., Lee, K., Taylor, K. D., Guo, X., Crooks, K., Kiedrowski, L.A., Raffel, L. J., Gordon, O., Machini, K., Desnick, R. J., Biesecker, L. G., Lubitz, S. A., Mulchandani, S., Cooper, G. M., Joffe, S., Richards, C. S., Yang, Y., Rotter, J. I., Rich, S. S., O'Donnell, C. J., Berg, J. S., Spinner, N. B., Evans, J. P., Fullerton, S. M., Leppig, K. A., Bennett, R. L., Bird, T., Sybert, V. P., Grady, W.M., Tabor, H. K., Kim, Jerry H., Bamshad, M. J., Wilfond, B., Motulsky, A. G., Scott, C. R., Pritchard, C. C., Walsh, T. D., Burke, W., Raskind, W. H., Byers, P., Hisama, F. M., Rehm, H., Nickerson, D.A. and Jarvik, G. P. (2015). Actionable exomic incidental findings in 6503 participants: Challenges of variant classification. *Genome Res.* 25:305–315.

Brookes, C., Lai, S., Doherty, E. and Love, D. R. (2015). Predicting the Pathogenic Potential of BRCA1 and BRCA2 Gene Variants Identified in Clinical Genetic Testing. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 15:e218–25.

B) Raamat

Mikelsaar, A. V., Aula, P., Kääriäinen, H., Palotie, A. 2010. Pärilikkusmeditsiin, p. 60-67, 84-100, 174-175. AS Medicina, Tallinn.

Heinaru, A. 2012. Geneetika, p. 92-93, 358, 674. Tartu Ülikooli Kirjastus.

Turnpenny, E. and Ellard, S. 2012. Emery's Elements of Medical Genetics, 14th ed., p. 23-25, 113, 143. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, P. A.

Strachan, T., Goodship, J. and Chinnery, P. 2015. Genetics and genomics in medicine, p. 134, 190, 237, 247. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, N.Y., Abingdon, O. X.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/images/stories/Saatelehed/Eksoomi_sekvenerimine_nousoleku_vorm.pdf

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

<https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/application.cgi>

<http://www.lovd.nl/>

<https://research.nhgri.nih.gov/bic/>

<http://insight-group.org/variants/classifications/>

<http://www.hgvs.org/mutnomen/>

<http://genome.ucsc.edu/>

http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

<https://www.riigiteataja.ee/akt/72581>

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid Neeme Tõnissoni ja Liis Leitsalu, kelle abil sai selle töö valmimine võimalikuks. Samuti soovin tänada kõiki teisi, kelle käest saadud andmeid sain töö valmimiseks kasutada.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karmen Vaiküll (20.05.1994)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Meditiinilist sekkumist vajavate geenivariantide leidmine Eesti Geenivaramu geenidoonoritel,

mille juhendajad on Neeme Tõnisson ja Liis Leitsalu,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016