

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
RAKU-JA MOLEKULAARBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
PATOÜSIOLOOGIA OSAKOND

Ivo Kändla

**Eesti ja Vietnami *Osteogenesis Imperfecta* patsientide *COL1A1* ja *COL1A2* geenide
mutatsioonianalüüs**

Magistritöö

Juhendajad: MSc Lidiia Zhytnik
PhD Raivo Raid

Tartu 2016

INFOLEHT

Eesti ja Vietnami *Osteogenesis Imperfecta* patsientide *COL1A1* ja *COL1A2* geenide mutatsioonianalüüs

Kokkuvõte

Antud magistritöö peamine eesmärk on tuvastada OI mutatsioone Eesti ja Vietnami päritolu patsientide *COL1A1/2* geenides. Vietnami populatsioonis oli 59% ja Eesti 88% patsiente *COL1A1/2* gmutatsioonidega. Kõige sagedasemad mutatsioonide tekkemehhanismid oli Eesti OI populatsioonis splaiss-saitide muteerumine ja Vietnami OI populatsioonis missenss-mutatsioonid.

Conclusion

In our study we analysed 91 Vietnamese ja 26 Estonian OI patients for mutations in *COL1A1/2* genes. We found that 59% of Vietnamese and 88% of Estonian patients collagen I mutations. In Vietnamese patients we discovered mainly missense mutations which cause severe OI forms. In Estonian population we found mostly splice site mutations giving a rise to milder OI.

Märksõnad: Kollageen I, *Osteogenesis Imperfecta*, Sangeri sekveneerimine

CERCS: B600 – Kirurgia, ortopeedia, traumatoloogia

B790 – Kliiniline geneetika

B580 – Skeleti ja lihassüsteemi haigused

SISUKORD

Kasutatud lühendid	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. <i>Osteogenesis Imperfecta</i> ülevaade	8
1.2. <i>Osteogenesis Imperfecta</i> klassifikatsioon	9
1.2.1. OI Tüüp I	10
1.2.2. OI Tüüp II	11
1.2.3. OI Tüüp III	12
1.2.4. OI Tüüp IV	13
1.2.5. OI Tüüp V	14
1.3. <i>Osteogenesis Imperfecta</i> geneetika	14
1.4. <i>COL1A1/2</i> geenid	16
1.5. Kollageen tüüp I	17
1.5.1. Kollageeni I biosüntees	18
1.5.2. Kollageeni struktuursed domeenid	20
1.5.3. Kollageeni mutatsiooni mehhanismid	21
1.6. OI geneetiline diagnostika	23
1.7. Sangeri sekveneerimine	24
1.7.1. Sangeri sekveneerimise töövoog	24
1.7.2. Sangeri sekveneerimine värviterminaatoriga	25
1.7.3. Kapillaar geelelektroforeesi meetodiga sekveneerimine	26
2. PRAKTILINE OSA	28
2.1. Uuringu eesmärk	28
2.2. Materjal ja meetodika	28
2.2.1. Materjal ja patsientide valik	28
2.2.2. Proovide kogumine ja DNA eraldamine	29
2.2.3. DNA amplifitseerimine polümeraasi ahelreaktsiooniga	29
2.2.4. Sangeri sekveneerimine ja bioinformaatiline analüüs	29
2.3. Tulemused	30
2.3.1. Vietnami populatsioon	30
2.3.2. Eesti populatsioon	31
3. Arutelu	33

3.1. COL1A1/2 mutatsioonide tasemete varieerumine	33
3.2. COL1A1/2 mutatsioonide tüübid	33
3.3. Sama mutatsiooni juhuslik tekke mittesugulastel patsientidel	35
3.4. Topelt mutatsioonid	35
3.5. Uued mutatsioonid	36
3.6. Mutatsioonide nn “kuumad kohad”	37
3.7. Uuringu piirangud	38
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40
TÄNUAVALDUSED.....	42
Kirjandus.....	43
LISAD	55
Lisa 1. OI geneetiline klassifikatsioon.....	55
Lisa 2. COL1A1/2 mutatsioonid Eesti OI patsientides	57
Lisa 3. COL1A1/2 mutatsioonid Vietnami OI patsientides	58
Lisa 4. DNA eraldamine verest protokoll.....	61
Lisa 5. PCR programm amplifikatsiooni reaktsioonil.....	62
Lihtlitsents	63

Kasutatud lühendid

AD	Autosomaalne-Dominantne
AR	Autosomaalne-Retsessiivne
BMP1	Luu morfogeneetiline valk 1 (inglise k. <i>Bone Morphogenetic Protein 1</i>)
BS	Brucki sündroom (inglise k. <i>Bruck Syndrome</i>)
COMP	Kõhre maatriksi oligomeerse valk (inglise k. <i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
CRTAP	Kõhre seotud valk (inglise k. <i>Cartilage-Associated Protein</i>)
CyPB	Tsüklofiilin B (inglise k. <i>Cyclophilin B</i>)
DDR-2	Diskoidiin domeeni retseptor 2- <i>Discoidin</i> domain-containing receptor 2
DI	<i>Dentinogenesis Imperfecta</i>
FKBP10/ FKBP65	FK 506 siduv valk 10 (inglise k. <i>FK506 Binding Protein 10</i>)
HSP47	Kuuma šoki valk 47 (inglise k. <i>Heat Shock Protein 47</i>)
IFITM5	Interferooni poolt indutseeritud transmembraanne valk 5 (inglise k. <i>interferon Induced Transmembrane Protein 5</i>)
LEPRE1/P3H1	Prolüül-3 hüdroksülaas 1 (inglise k. <i>Prolyl 3-Hydroxylase 1</i>)
MLBR	Peamine ligande siduv piirkond (inglise k. <i>Major Ligand Binding Region</i>)
MMP	Maatriksmetalloproteinaas (inglise k. <i>Matrix Metalloproteinase</i>)
NGS	Järgmise generatsiooni sekveneerimine-(inglise k. <i>Next Generation Sequencing</i>)
OI	<i>Osteogenesis Imperfecta</i>
OSX/SP7	Sp7 transkriptsioonifaktor/Osterix (inglise k. <i>Osterix</i>)
PAAG	Polüakrüülamiidgeelektroforees
PDI	Proteiin disulfiid isomeraas (inglise k. <i>Protein Disulfide Isomerase</i>)
PEDF/ SERPINF1	Pigment epiteeli faktori (inglise k. <i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>)

PG	Proteoglükaan (inglise k. <i>Proteoglycan</i>)
PLOD2	Prokollageen-lüsiin, 2 oksoglutaraat 5 dioksügenaas (inglise k. <i>Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2</i>)
PLS3	Plastiin 3 (inglise k. <i>Plastin 3</i>)
PIIB	Peptidüülprolüül Isomeraas B (inglise k. <i>Peptidylprolyl Isomerase B</i>)
P4HB	Prolüül 4 hüdroksülaas (inglise k. prolyl 4-hydroxylase subunit beta)
rER	Kareda pinnaline endoplasmaatiline retiikulum
SEC24D	SEC24 valk (inglise k. <i>SEC24 family member D</i>)
SPARC	Antiadhesiivne protein SPARC (inglise k. <i>Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine</i>)
TMEM38B	Transmembraanne valk 38B (inglise k. <i>Transmembrane Protein 38B</i>)

SISSEJUHATUS

Osteogenesis Imperfecta on haruldane haigus, mille kõige iseloomulik tunnus on haprad luud. Haigus on levinud üle-maailmselt ja selle esinemise vormid on väga erinevad varieerudes alates tõsistest letaalsetest vormidest, kus surm võib saabuda juba enne sündi või esimeste päevade jooksul kuni vormini kus haigusekandja isegi ei tea, et selline häire nende perekonnas üldse esineb. Käesoleval ajal on *Osteogenesis Imperfecta* diagnoosimine ning klassifitseerimine küllaltki keerukas, paljuski tuleb lähtuda patsientide individuaalsest iseärasustest, tihti esinevad erinevad haigust iseloomustavad karakteristikud ka ühe perekonna siseselt väga erinevalt.

Peamiseks OI põhjustajaks on siiski mutatsioonid kollageeni tüüp I geenides. Sõltuvalt mutatsiooni iseloomust ja asukohast geenis võib patsientidel, kellel on mutatsioon kollagen tüüp I-s areneda välja väga erinev fenotüüp, mis ulatub letaalsetest vormidest kergemate vormideni. Sellega on kaasa tulnud probleem, genotüüp-fenotüüp korrelatsioone ei ole veel leitud.

Osteogenesis Imperfecta geneetiline taust on vaatamata kollageeni häirete domineerimisele OI tekkimise põhjustajana, siiski väga mitmekülge. Tänapäevaks on lisaks I kollageeni geenidele teada veel 17 erinevat geeni, mis seda haigust põhjustavad, peamiselt on need geenid seotud luude arengu ja homöostaasiga.

Osteogenesis Imperfecta patsientide elukvaliteet on küllaltki halb, sest ühtegi ravimit mis toimiks kõigile patsientidele, veel leitud ei ole. Seetõttu ongi oluline kokku koguda infot geneetiliste ja fenotüübiliste muutuste kohta, et arusaada molekulaarsetest mehhanismidest ja fenotüüp-genotüüp suhtest antud haiguse puhul, seda kõike selleks, et leida efektiivne ravim.

Antud magistritöö peamine eesmärk on tuvastada OI mutatsioone Eesti ja Vietnami päritolu patsientide *COL1A1* ja *COL1A2* geenides. Antud uuringu tulemused laiendavad meie teadmisi fenotüübilisi-genotüübilisi korrelatsioonist, OI geneetikast ja annavad infot Eesti ja Vietnami OI populatsioonide geneetilise epidemioloogia kohta.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Osteogenesis Imperfecta* ülevaade

Osteogenesis Imperfecta (OI) on kaasasündinud geneetiline haigus, mis avaldub läbi ebatäieliku luutekke. Haigust kirjeldas esimesena rootsi teadlane Olof Jakob Ekman 1788 aastal, kes jälgis haiguse kulgu ühes peres kolme põlvkonna vältel (Peltier 1981, Baljet 2002). Sellest ajast alates on OI-le omistatud üle 40 eri nimetuse, ent esimesena võttis OI kui meditsiinilise termini kasutusele hollandi professor Willem Vrolik 1849 aastal (Baljet 1984).

OI on geneetiliselt heterogeenne haigus, mille pärandumismuster on kas autosomaalne dominantne (AD) või autosomaalne retsessiivne (AR). Tänapäevaks on tuvastatud üle paari tuhande mutatsiooni 19 erinevas geenis¹. Umbes 90% OI patsientidest on kvalitatiivsed või kvantitatiivsed dominantsed mutatsioonid *COL1A1* ja *COL1A2* geenides, mis kodeerivad kollageen I pro $\alpha 1$ ja pro $\alpha 2$ ahelat (Byers ja Pyott 2012, Bodian *et al.*, 2009), või *IFITM5* geenis (Lazarus *et al.*, 2014). Ülejäänud isikud on OI pärinud retsessiivsel kujul läbi mitte-kollageensete geenide häirumise tõttu (Van Dijk ja Silence 2014).

Kollageeni I geenide mutatsioonide tulemuseks on fenotüübilt ja geneetiliselt erinevad häired. Defektid esinevad peamiselt kudedes kus kollageeni I on peamine esindaja ekstratsellulaarse matriksi valguline esindaja (luudes, hammastes, silma sarvkestas, kõõlustes). Fenotüübilt on haiguse vormid küllaltki varieeruvad ulatudes perinataalselt surmavast vormist kerge osteopeeniani (Basel *et al.*, 2009 Kocher *et al.*, 1998).

Luude hapruse kõrval on OI-le väga iseloomulikud tunnused ka patsiendi lühike kasv (Ben Amor *et al.*, 2011), ning sagedased on ka luustiku deformatsioonid (skolioosi ja küfoosi esinemine). Skeletivälised tunnused on tavaliselt üsnagi individuaalsed, üks tüüpilisemaid on silma sarvkesta erinev värvus, mis võib varieeruda normaalsest valgest kuni halli või hele/tume sinise värvini. Sinine sarvkest esineb ligi 50% OI vormidest ja see on ilmselt seotud õhukese sarvkesta paksenemisega, (Evereklioglu *et al.*, 2002, Dimasi *et al.*, 2010), sellega omakorda arvatakse kaasnevat ka glaukoomi teket (Dimasi *et al.*, 2010, Wallace 2014). Lisaks on kirjeldatud ka kae tekkimist, silmaläätse ektoopiat ja presbüopiat (Chau *et al.*, 2014).

¹ <https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>

Dentinogenesis Imperfecta (DI) esineb OI tüüp III puhul enamikel haigusekandjatest, tulemuseks ebanormaalne hambumus. Ligi 50% üle 50 aastastest OI patsientidest esineb kuulmislangus (Santos *et al.*, 2012, Paterson *et al.*, 2001). Kuulmislangus võib olla konkreetne, sensorineuraalne või segatüüpi, ent molekulaarsed uurimused on näidanud, et kuulmiskadu ei ole otseselt seotud OI tüüpidega ega mutatsioonidega *COL1A1* ja *COL1A2* geenides (Hartikka *et al.*, 2004).

Kuna tüüp I kollageen on peamine ekstratsellulaarse maatriksi valguline komponent südameveresoontkonna kudedes, on OI patsientidel suurenenud oht mitraal- ja trikuspidaalklapi haigustele (Bonita *et al.*, 2010). OI-ga seostatakse veel väga kergelt tekkivaid verevalumeid ja songa tekkega (Hansen ja Jemec 2002). Halb kopsude talitlus võib olla veel üks morbiiduse allikaks. Kui skolioos ning selgroo ja rinnaku luumurrud süvenevad, tekib suurem tõenäosus kopsupõletiku tekkele, samuti soodustab lühike rindkere respiratoortrakti infektsioonide tekkimist (Marini *et al.*, 2000, LoMauro *et al.*, 2012).

Kõige sagedasem on üldises demograafilises jaotuses OI tüüp I 16 juhtumiga miljoni elaniku kohta. Sellest erineb Lõuna-Aafrika regioon, kus tüüp III on kõige sagedasem (Beighton ja Versfeld 1985). OI juhtumeid on esinenud igal pool ümber maailma, rassist ja soost sõltumatult. Hinnanguliselt on Osteogenesis Imperfecta 0,008% ehk ligi poolel miljonil inimesel maailma populatsioonist. (Shapiro *et al.*, 2014). Viimaste andmete põhjal on OI üldine esinemissagedus 1:10000-20000 (Stevenson *et al.*, 2012).

1.2 Osteogenesis Imperfecta klassifikatsioon

OI klassifitseerimine on komplitseeritud erinevate heterogeensete fenotüüpide ja patogeensete mehhanismide geneetilise laialtlevikuse tõttu. Fenotüübilised erinevused võivad juba ühe tüübi ulatuses olla väga erinevad nii perekondade siseselt kui perekondade vaheliselt (Basel *et al.*, 2009).

1979. aastal defineeris Silence OI nelja kategooriasse (numeratsioon tulenes kirjeldamise järjekorrast), mis põhines luumurdude sagedusel ja deformatsioonide arvul, silma sarvkesta värvusel, pärandumismustril ning kuulmislanguse olemasolul või puudumisel, aga ka kliinilise, radioloogilise ja geneetilise analüüsi põhjal (Silence, 1979) (Tabel 1). Ehkki seda klassifikatsiooni kasutatakse üpris laialdaselt on see väga subjektiivne ja sõltub kättesaadava info

iseloomust ning diagnostikat läbiviiva arsti kompetentsidest. Ka tänapäeval kasutatakse OI kategoriseermiseks Sillence süsteemi, mis 2000. aastal täienes OI tüüp V vormiga (Glorieux *et al.*, 2000). Tüüp V OI on samuti autosomaalse dominantse päritavusega, mida iseloomustab kollageeni tootmise häirumine, tingides ebataavalises luude mineraliseerumise (Shapiro *et al.*, 2013).

Tabel 1. OI nomenklatuur (*International Nomenclature Group for Constitutional Disorders of the Skeleton*, INCCDS) 2010

OI vormi nimetus	OI numbriline tüüp
Klassikaline mitte-deformeeruv OI sinise sarvkestaga	I
Perinataalselt letaalne OI	II
Progresseeruvalt deformeeruv OI tavalise või sinise sarvkestaga	III
Varieeruv OI tavalise sarvkestaga	IV
OI <i>interosseus</i> membraanide kaltsifitseerumisega	V

1.2.1. OI Tüüp I

OI I tüüpi korral kollageen on normaalse kvaliteediga, aga seda toodetakse ebapiisavas koguses, kõige kergem ja sagedasem OI vorm, mille tulemuseks muutused *COL1A1* või *COL1A2* geenides (raamnihke-, nonsenss- ja splaiss-saidi mutatsioonid), mis viivad mRNA ebastabiilsuseni ja haplopuudulikusele (Marini *et al.*, 2007) vahest harva ka kogu *COL1A1/2* geeni deletsioonini (Van Dijk *et al.*, 2010).

OI tüüp I on kõige sagedasem europiidide hulgas ja selle esinemissagedus sünnil on 1:25000 (Steiner *et al.*, 2013). I tüüpi OI individid on tavaliselt natuke alla normaalset kasvu. Esimesed luumuurud kaasnevad kas sünnituse või mähkmete vahetamisega, sagedamini aga siis kui imik hakkab käima ja kukkuma. Luumurdude tekke sagedus väheneb peale puberteeti ja hakkab taas suurenema peale 50 eluaastat, seda on täheldatud just menopausi järgselt naistel ja meestel kes on ületanud 50 eluaasta künnise. Haiguse mõjul võib patsiendil olla luumurde paarist kuni üle saja, aga need paranevad tavaliselt normaalselt kui kasutada ortopeedilist abi. Liigete hüpermobiilsus võib põhjustada varajast liigete degeneratsooni põhjustades osteoartriiti ja kroonilist liigete valu

(Basel *et al.*, 2009). Kuulmiskadu algab vanusest 25 eluaastat ja peale, patsientidel on kas konduktiivne või sensorineuraalne kuulmiskadu, hiljem segatüüpi kuulmislangus (Kuurila *et al.*, 2002, Swinnen *et al.*, 2011).

Täheldatud on ka teisi sümptomeid: kerge selgroo kõverdust, kehva lihastoonust, silmade sarvkest ei ole valge, vaid sinakas-hall ja silmad on kergelt väljaulatuvad (Evereklioglu *et al.*, 2002). Oodatav eluiga sarnane üldpopulatsioonile, surm tuleneb üldjuhul OI-ga mitteseotud põhjustest. (Freemont 1996)

IA ja IB variandid erinevad üksteisest *Dentinogenesis Imperfecta* olemasolust/puudumisest (IB vormil olemas). IB tüübi patsientide puhul on näidatud suuremat murdude arvu, lühemat kasv ja suuremat arvu skeleti deformatsioone. Mõlemal alamgrupil on sarnane sagedus liigete hüpermobiilsuse, sinikate, kurtuse ja liigete dislokatsiooni suhtes (Paterson *et al.*, 1983).

1.2.2. OI Tüüp II

OI II tüüp on letaalne vorm. Kollageeni ei toodeta piisavas koguses ega ka normaalse kvaliteediga. Enamikel juhtudel sureb patsient esimese eluaasta jooksul hingamispuudulikkusesse või ajusise verejooksu tõttu. 60% imikutest sureb esimesel päeval, ülejäänust sureb 80% esimese nädala jooksul.(Byers *et al.*, 1988). Kui üldine levimus OI puhul on hinnanguliselt 1:10000-20000 siis levimus OI tüüp II on teadmata. Sillence hinnagute kohaselt on esinemissagedus 1-2:100000 (Sillence *et al.*, 1979).

Defektid on jälgitavad juba sünnitusele eelnevas ultraheliuuringus. Loote kaal ja pikkus on väga väiksed võrreldes loote normaalse arenguga. Silma sarvkest on tavaliselt tumesinine, kolju on võrreldes kehaga suur ja vähese mineralisatsiooni tõttu kompimisel pehme (tegemist on nn “nahkpeaga”). Esinevad intrauteriinsed, skeleti deformatsioonid, lühenenud jäsemed, lühike kasv, väike mass ja murrud üle keha (Basel *et al.*, 2009).

OI tüüp II on üldjuhul autosomaalse dominantse pärandumisega, ent kirjeldatud on ka iduliini rakkudes mosaiiksust antud haiguse suhtes. Mitmed uued avastatud OI vormid on näidanud ülekatvust seoses teiste retsessiivsete mutatsiooni vormidega, mis samuti tingivad OI tüüp II sarnaseid sümptomeid. (Basel *et al.*, 2009). Autosomaalsed retsessiivsed mutatsioonid geenides, mis on seotud kollageen tüüp I posttranslatsioonilise modifikatsiooni, voltimise, transpordi,

osteoblastide proliferatsiooni ja raku signaalidega võivad samuti põhjustada OI tüüp II-le sarnast fenotüüpi. (Basel *et al.*, 2009, Marini *et al.*, 2007)

Tüüp II saab samuti jagada alamgruppideks A, B ja C, mida eristatakse radiograafiliste hinnangutega pikkadele luudele ja ribidele. IIA laiad ja lühikesed toruluud ja õhukesed ribid. IIB- I on toruluud laiad ja lühikesed, ent ribid on õhukesed, nn “akordioni sarnased”. Tüüp IIC- I õhukesed ning pikemad pikemad toruluud ja akordioni sarnased ribid. (Sillence *et al.*, 1984)

1.2.3. OI Tüüp III

Kõige raskem vorm OI-st, patsientide eluiga on normaalne või veidi lühem, mis on tingitud siseorganite defektidest või eluohtlikkest luumurdudest. Kollageen on ebakorrapäraselt formeerunud, seda toodetakse küll piisavalt, aga see on defektne. Diagnoosi on sageli võimalik kinnitada juba sünnil, sest murrud esinevad ainuüksi imikuga tegeldes. Siiski surm esimeste elunädalate jooksul on haruldane. Antud häiret tuntakse ka kui progressiivselt deformeerivat vormi OI-st, kus patsientidel võib olla ühtekokku 200 luumurdu elu jooksul ja sinna hulka muid erinevaid progressiivsid deformatsioone, mis võivad edasi areneda, olles isegi mitteseotud mõne OI-st tingitud luumurruga (Basel *et al.*, 2009). Sillence andmete kohaselt on OI tüüp III esinemissagedus sama mis tüüp II puhul ehk 1-2:100000 (Sillence *et al.*, 1979), hiljuti läbiviidud uurimuses saadi Rootsis sageduseks 0,89:100000 (Lindahl *et al.*, 2015). OI tüüp III põhjustavad *de novo* autosomaalsed dominantsed mutatsioonid *COL1A1* ja *COL1A2* geenides ja autosomaalsed retsessiivsed mutatsioonid geenides, mis on seotud kollageeni moditseerimise ning transpordiga, aga seotud ka signaalide radadega luukudedes.

Enamik antud haigusvormiga patsiente ei suuda iseseisvalt püsti seista ja kasutavad liikumiseks ratastooli. Kasvukiirus on neil vähenenud, täiskasvanud on tavaliselt väga lühikesed, mõned ei ületagi 1 meetrit pikkuses (Joonis 1). Intellekt on normaalse tasemega, kui varasemalt ei ole esinenud koljusiseseid verejookse (Basel *et al.*, 2009).

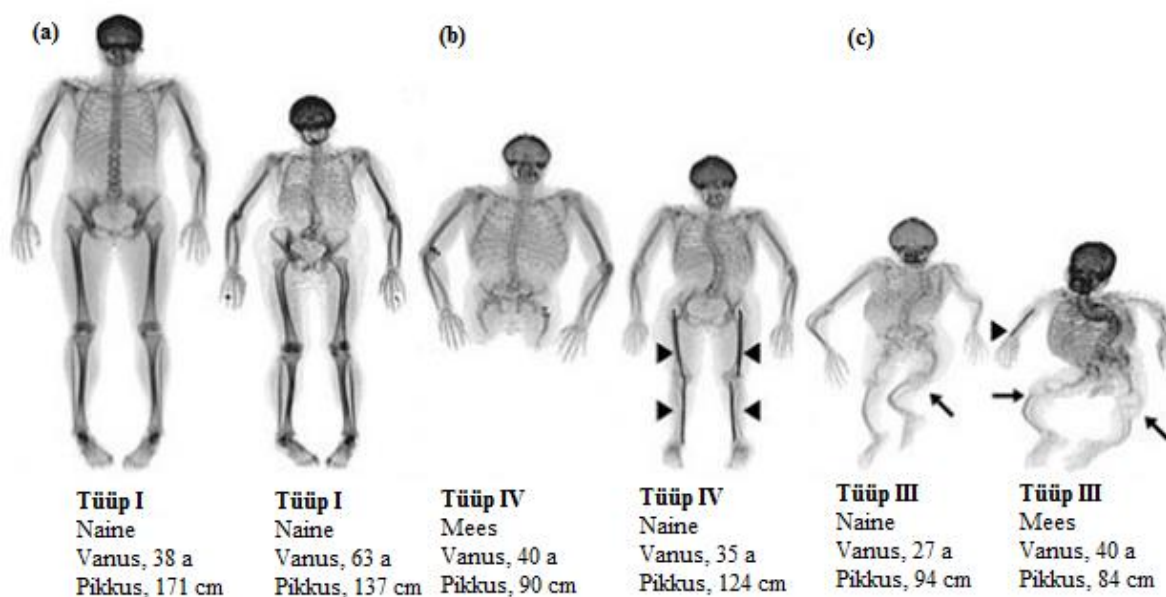
Ka OI tüüp III esineb teatav heterogeensus kliinilisel tasemel. Sümptomite esinemine on individuaalne ja sageli erinevad need isegi ühe ja sama mutatsiooni kandjate vahel. Esineb variatsioon hambumuse osas st on nii normaalse hambumusega indiviide, aga esineb ka DI. Lühike kasvu kõrval esineb sageli ka, kõver selgsus, küfoskolioos, iseloomlik on tünnikujuline rinnakorv ja täheldatud on ka kolmnurkset näokuju. Silma sarvkest võib sündmisel olla sinakas

aga vanuse kasvades sinakus kaob (Sillence *et al.*, 1979). Kuulmiskadu algab tavaliselt teismelise eas (Basel *et al.*, 2009).

1.2.4. OI Tüüp IV

Kollageeni sünteesitakse piisavalt, aga selle kvaliteet on madal. Tüüp IV on kõige varieeruvam OI vorm, mille sümptomid võivad ulatuda kergetest rasketeni. Varieeruvus on ka üks peamisi faktoreid mis eristab seda tüüp I-st, olles sellest veidi raskema loomuga. Korduvad luumurrud, osteoporoos ja erineva astmega toruluude ning selgroo deformatsioon, ent normaalne silma sarvkest on selle tüübi patsientide tüüpilisemad sümptomid. Kuulmiskadu esineb harva. (Basel *et al.*, 2009)

Rootsis läbiviidud uurimuse järgi on levimus hinnanguliselt 1,35:100000 (Lindhahl *et al.*, 2015) Sarnaselt tüüp I-le saab tüüp IV jagada IV A ja IV B alamgruppi *Dentinogenesis Imperfecta* puudumise järgi (IVA) või olemasolule (IVB). Haiguse pärandumismuster on enamasti autosomaal dominantne aga on täheldatud ka autosomaal retsessiivset pärandumist (van Dijk *et al.*, 2010). Antud vormi tõsidus on erinev, ka ühe perekonna sees võib kergemate vormi kandjate kõrval olla ka tõsisemat sümptomitega indiviide (Seedorff 1949).



Joonis 1. Röntgen ülesvõtte täiskasvanud OI tüüp I (a), III (c), IV(b) patsientidest. (Reeder ja Orwell, 2006; modifitseeritud joonis)

1.2.5. OI Tüüp V

2000. aastal kirjeldas Glorieux kaasautoritega esmakordselt autosomaalset dominantset vormi OI-st, mis sarnanes Sillence süsteemis OI tüüp IV, ent oli siiski erinevate kliiniliste, histoloogiliste ja molekulaarsete karakteristikutega (Glorieux *et al.*, 2000). Erinevalt tüüpidest I-IV on tüüp V tingitud mutatsioonist interferooni poolt indutseeritud transmembraanse valgu 5 (*IFITM5*) geenis (Shapiro *et al.*, 2013), mis paikneb 5' transleerimata regioonis (*IFITM5* c.-14C > T). Ehkki enamikul OI V vormi kandjatel on sarnane fenotüüp, siis mutatsioonidel *IFITM5* geeni kodeerival alal on fenotüübiliselt laiem varieeruvus. Täpne levimus antud tüübi puhul on teadmata, ent arvatakse OI tüüp V esineb kuni 5 protsendil OI patsientidest. (Basel *et al.*, 2009). OI tüüp V viib kahe küünarvarre luudevahetile (*membrana interossea antebrachii*) lupjumiseni, mis muudab keeruliseks randmete pööramise. Teine sümptom on ebanormaalselt suur kogus hüperplastilist kallust paraneva luumurru piirkonnas. Sümptomite hulgas on veel ka radiaalne pea dislokatsioon, toruluude kumerdumine ja segatüüpi kuulmislangus (Shapiro *et al.*, 2013, Marini ja Blissett 2013).

1.3. Osteogenesis Imperfecta geneetika

Tänaseks päevaks on leitud 19 geeni, mille mutatsioonid on seotud OI kujunemisega, enamiku puhul on tegu just retsessiivse vormi tekkega. (LISA Tabel 1). Iga uus haiguse põhjustanud geen, mis tuvastati, sai omale erineva OI tüübi geneetilises klassifikatsioonis ja oma numbri OMIM andmebaasis. Kollageen tüüp I kodeerivate *COL1A1/2* kõrval on seal geene, mis on seotud kollageeni I post-translatsiooniliste modifikatsioonidega (*CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SPARC*, *PLOD2*), (Ishikawa *et al.*, 2009, Barnes *et al.*, 2006, Marini *et al.*, 2010b, Pyott *et al.*, 2011, Cabral *et al.*, 2007, Willaert *et al.*, 2009, Van Dijk *et al.*, 2009, Ha-vinh *et al.*, 2004, Van der Slot *et al.*, 2003) voltimisega ja transportiga (*SERPINH1*, *FKBP10*, *SEC24D*) (Alanay *et al.*, 2010, Shaheen *et al.*, 2010, Kelley *et al.*, 2011, Christiansen *et al.*, 2010), geenide transkriptsiooniga osteoblastides ja osteoblastide proliferatsiooniga (*OSX*, *CREB3L1*) (Lapunzina *et al.*, 2010, Symoens *et al.*, 2013), luukoe mineralisatsiooniga (*SERPINF1*, *IFITM5*) (Becker *et al.*, 2011, Cho *et al.*, 2012) ja raku signalisatsiooniga (*WNT1*, *TMEM38B*) (Fahiminiya *et al.*, 2013, Keupp *et al.*, 2013, Laine *et al.*, 2013, Shaheen *et al.*, 2012).

Sangeri sekveneerimise, reaalkaaja polümeraas ahelreaktsiooni, aheldus analüüsiga, homosügootide analüüsi ja teise generatsiooni sekveneerimisega (*Next Generation Sequencing*, NGS) on

tuvastatud 14 OI-d põhjustavad geeni. Mõningate OI patsientide puhul ei leita haiguse põhjuseid seni üldteada põhjustajate geenide hulgast, mis omakorda sunnib teadlasi tegema suuremaid jõupingutusi nende vormide üles leidmiseks. Mõningad uued OI-d tekitavad geenid on suudetud identifitseerida eksoomi sekveneerimisel. Nende hulgas *SERPINF1* (Becker *et al.*, 2011), *WNT1* (Pyott *et al.*, 2013), *IFITM5* (Cho *et al.*, 2012), ja *PLOD2* koos BS/OI ülekatvuse fenotüübiga (Puig-Hervás *et al.*, 2012).

Tabel 2. *Osteogenesis Imperfecta*'ga seotud geenid.

Geen	Valk, valgu funktsioon	Pärandumismuster
<i>BMP1</i>	Luu morfogeneetiline proteiin 1, metalloproteaas.	AR
<i>COL1A1</i>	I kollageni $\alpha 1$ ahel. Sidekudede struktuurne valk.	AD, AR
<i>COL1A2</i>	I kollageni $\alpha 2$ ahel. Sidekudede struktuurne valk	AD, AR
<i>CREB3L1</i>	OASIS (<i>Old Astrocyte Specifically Induced Substance</i>), endoplasmaatilise retiikulumi stressi transdutsiooniv proteiin	AR
<i>CRTAP</i>	Kõhrega seostunud proteiin, heterotrimeerse prolül-3-hüdroksüülsatsiooni kompleksi abiproteiin.	AR
<i>FKBP10</i>	Kodeerib FKBP65 valku, šaperoon, mis osaleb I prokollageni voltimisel.	AR
<i>IFITM5</i>	Interferooniga indutseeritud transmembrane protein 5, kodeerib BRIL valku (<i>bone-restricted Ifitm-like protein</i>). Kaasatud kollageeni mineralisatsiooni.	AD
<i>LEPRE1</i>	Leprekaan (P3H1) proteiin. Prolül-3-hüdroksüülsatsiooni kompleksi komponent, ensümaatilise aktiivsusega.	AR
<i>OSX/SP7</i>	Osteriks, transkriptsiooni faktor	AR
<i>P4HB</i>	Kodeerib valk disulfiid isomeraasi(PDI)	AR
<i>PLOD2</i>	Kodeerib lüsüül hüdroksülaas-2, mis vastutab Tüüp I kollageeni telopeptiidi lüsiinijäägi hüdroksüülsatsiooni eest	AR
<i>PLS3</i>	Asub X kromosoomis ja kodeerib valku plastiin-3(T-plastiin), osaleb aktiini tsütoskeleti kokkupanekul ja lahti võtmisel	AR
<i>PP1B</i>	Peptidüül-prolüül tsis-trans isomüraas B, tsüklofiliin B, CyPB. Prolül-3-hüdroksüülsatsiooni kompleksi komponent.	AR
<i>SEC24D</i>	COPII kompleksi komponent, kaasatud prokollageeni transpordimises endoplasmaatilisest retikulumist	AR
<i>SERPINF1</i>	Serpiin peptidaas inhibiitor, F (<i>pigment epithelium-derived factor</i> , PEDF). Kaasatud matriksi remodulleerimisse, luu homöostaasi.	AR

<i>SERPINH1</i>	Serpiin peptidaas inhibiitor, H. Prokollageeni šaperoon valk.	AR
<i>SPARC</i>	Sekreteeritud happeline tsüsteiini rikkas proteiin (osteonektiin), glükoproteiin. Seondub I kollageniga ekstratsellulaar maatriksis.	AR
<i>TMEM38B</i>	Transmembraanne proteiin 38B, kaltsiumi transmembraannse kanali komponent.	AR
<i>WNT1</i>	WNT1 (<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>) on sekreteeritud signalproteiin	AR

1.4. *COL1A1/2* geenid

COL1A1 ulatus on 18 kb ja koosneb see 51 eksonist, normaalsetes tingimustes sünteesitakse selle pealt 1464 aminohappega produkt, 2 pro $\alpha 1$ ahelat tüüp I kollageenile.

COL1A2 ulatus on umbes 38 kb ja see koosneb 52 eksonist. Tavatingimustes sünteesitakse sellelt 1366 aminohapest koosnev pro $\alpha 2$ ahel kollageen 1-le.

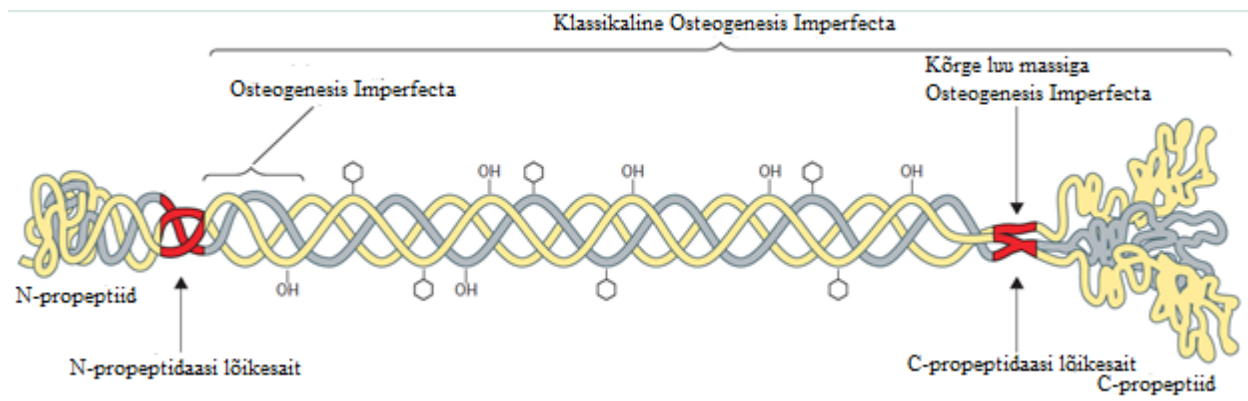
Mutatsioonid *COL1A1* ahelas on kahjulikumad kui *COL1A2*, sest A1 kompleks moodustab igast kollageeni fibrill kompleksist kaks kolmandikku (Van Dijk ja Sillence 2014, Harrington *et al.*, 2014).

Kaks peamist tagajärge mutatsioonile *COL1A1* geenis on kas tüüp I kollageeni produkti koguse vähenemine või ebanormaalse prokollageeni tootmine. Valdaval enamikul juhtudest on klassikaline mitte-deformeeriv OI (tüüp I) on seotud mutatsioonidega *COL1A1* geenis, mille tulemuseks on enneaegsed terminatsiooni koodonid. Enamik neist mutatsioonidest on väikese arvu koodonite deletsioonid või insertsioonid. Need mutatsioonid ja mõned splaiss-ingu saidi mutatsioonid, mille tulemusel tekivad krüpteeritud saidid ja raamivälised transkriptid, viivad kõik enneaegsete terminatsiooni koodoniteni. Enneaegse terminatsiooni koodoni kohalolu, mis on eraldunud ühest või rohkemast intronist geenis toob kaasa mutantsest alleelist tuleneva mRNA ebastabiilsuse. Selle tulemusel on *COL1A1* mRNA kogus vähenenud poole võrra normaalsest. Enamik *COL1A1* mutatsioonidest on glütsiini vahetuse tulemus kolmikhelikaalses domeenis pro α ahelas, tagajärjeks kas sünnituseelselt surmav OI II, progressiivselt deformeeriv OI III ja üldiselt muutlik OI IV (Van Dijk, 2014).

1.5. Kollageen tüüp I

Kokku on olemas 19 erinevat tüüpi kollageene, mis kõik erinevad üksteisest primaarstruktuuri poolest. Tüüp I kollageen on kõige külluslikumalt esinev valk kõikides selgroogsetes. See koondub kiududesse, mis moodustavad erineva struktuuri ja mehaanikaga luude, naha, veresoonte seinte, kõõluste, silma sarvkesta ja teiste sidekudede maatriksi. Kollageen tüüp I struktuur koosneb kahest alfa 1 ahelast ja ühest alfa 2 ahelast, mis on kodeeritud *COL1A1* ja *COL1A2* geenide poolt. Inimese tüüp I kollageen kolmikheeliksi koosneb 338 häirumata Gly-X-Y kordusest kõigis kolmes ahelas. Pro haarab hõlmab 1/3 X positsioonidest, 4-Hyp hõlmab 1/3 Y positsioonidest ja Arg hõlmab 1/8 Y positsioonidest.

COL1A1/2 geenide produktid koosnevad: signaalpeptiidist, N terminaalset propeptiidist ja kollageen alfa I/II kolmikahela domeenist ja C-terminaalset propeptiidist (Joonis 2). C-terminaalne propeptiid omab kontrolli prokollageeni rakusisese ja kollageeni fibrillide ekstratsellulaarse kokkupaneku eest. Propeptiidid on vajalikud pro-alfa ahela assotsieerumiseks ja kolmikheeliksi formeerimiseks, mis omakorda ulatub tõmbluku laadselt karboksüterminuse propeptiidist aminoterminaalset propeptiidini (Ben Amor *et al.*, 2011).



Joonis 2. Mutatsioonid tüüp I prokollagenis põhjustavad erinevaid kliinilisi fenotüüpe. Mutatsioonid mis mõjutavad alfa ahelate heeliksi regiooni ja C propeptiidi domeeni on tavaliselt OI põhjustajaks. Molekulaarsed defektid N propeptiidide lõikesaidis põhjustavad suure luumassiga OI. Kuusnurgad esindavad suhkrumolekule mis on seotud hüdroksüleeritud lüsiini jääkidega. OH hüdroksüül grupp mis seotud Pro või Lys jääkidega. (Forlino ja Marini 2016, modifitseeritud joonis)

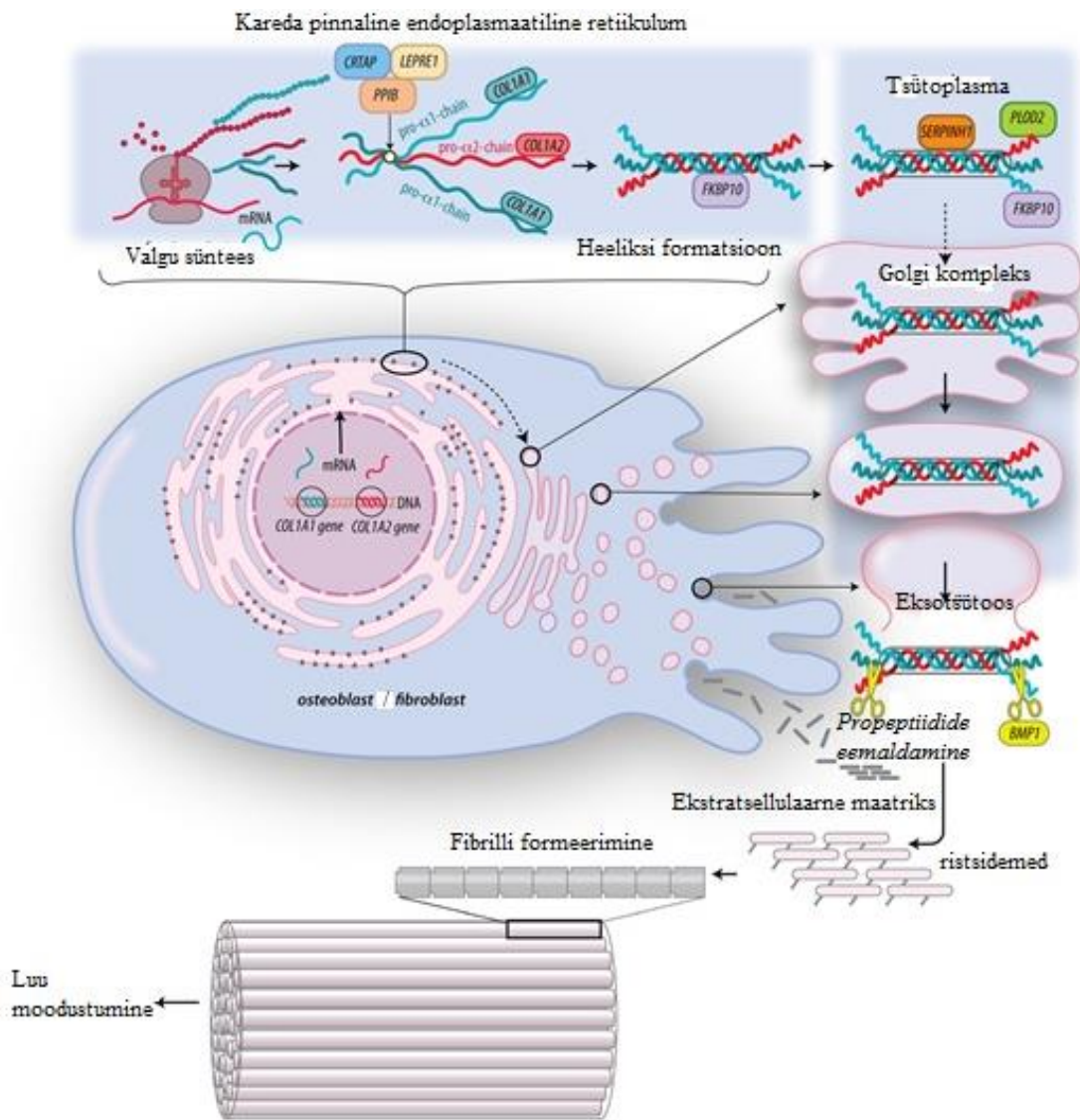
1.5.1. Kollageeni I biosüntees

Kollageen tüüp I sünteesitakse kareda pinnaga endoplasmaatiline retiikulum (rER) prokollageeni heterotrimeerina (Joonis 3). Kollageeni kolmikheeliks Gly-X-Y aminohappeline järjestus on Glütsiini (Gly) ja Prolüüni (Pro) jääkide rikas. rER ribosoomide mRNA-st transleeritakse preprokollageen, mille N ja C terminaalsete otses on signaal propeptiidid, mis eemaldatakse signaal peptidaaside poolt, kui preprokollageen siseneb rER lumenisse (Boedtke *et al.*, 1983; Cundy, 2012).

Moodustunud prokollageen läbib Pro ja Lüsiini(Lys) aminohapete jääkide hüdroksülatsiooni. Pro modifitseeritakse propüül-4 hüdroksülaasi ja propüül-3 hüdroksülaasi abil hüdroksüproliiniks ja Y positsioonil olev Lys hüdroksüleeritakse lüüülhüdroksülaas-1-ga hüdroksülüsiiniks. Spetsiifilistele hüdroksülüsiinidele lisatakse hüdroksüül glükosüültransferaasi ka hüdroksüül galaktosüültransferaasi abil glükoos ja galaktoos (Prockop ja Kivirikko 1995, Gelse 2003; Cundy, 2012; Currey, 2012). Hüdroksülatsioon on vajalik rakusisese ristsidemete stabiilse struktuuri loomiseks, vastutades luukoe tugevuse eest.

Pärast neid modifikatsioone transporditakse prokollageeni molekulid Golgi kompleksi, kus need pakitakse vesiikulitesse ja sekreteeritakse rakust (Joonis 3). Pärast sekreteerimist mittekollageensed propeptiidid eemaldatakse prokollageen peptidaaside poolt. Töödeldud kollageeni molekulid assotsieeruvad üldiselt paralleelselt järk-järguliselt, põhjustades lindi taoliste fibrillide tekkimise, mis on nähtavad ka elektronmikroskoobiga. Post-translatsioonilised modifikatsioonid ja teiste maatriksi elementide sidumine nagu näiteks leutsiini-rikkad proteoglükaanid (PG) mõjutavad oluliselt seda protsessi. Kollageeni fibrilli formeerumist stabiliseerib lüüüloksidaaside ja kollageenide vaheliste ristsidemete teke. (Prockop ja Kivirikko 1995)

Kõige sagedamini toimuvad muutused kollageeni struktuuris kui toimub glütsiini vahetus mõne suurema aminohappe vastu, mis omakorda häirib kollageeni voltimise protsessi. Asendus väljendub ebanormaalse inhibeeritud voltumisega kollageeni moodustumises. Ebanormaalne kollageen toimib negatiiv-dominantselt häirides tüüp I kollageeni heeliksi kokkupanekut, nõrgestades sellega ekstratsellulaarset maatriksit (Van Dijk *et al.*, 2014, Harrington *et al.*, 2014).



Joonis 3. Kollageen tüüp I biosüntees. Pärast translatsiooni, pro alfa 1 ahelad ja pro alfa 2 ahelad töödeldakse karedapinnalises endoplasmaatilises retiikulumis (rER). Voltimise protsessi jooksul viiakse läbi post-translatsioonilisi modifikatsioone läbi spetsiifiliste valkude. Geenid mis on seotud posttranslatsioonilise modifikatsiooniga ja on näidatud OI põhjustajatena on antud pildil ära toodud. Pärast prokollageen tüüp I transporti Golgi kompleksi ja sellele järgnevat eksotsütoosi ekstratsellulaarsesse maatriksisse, C ja N-propeptiidide lõikamise tulemusena saadaksegi kollageen tüüp I. Järgnevalt ristsidemed kollageen tüüp I molekulide vahel, viib fibrillide tekkeni. Mitmed kollageen tüüp I fibrillid moodustavad kollageeni kiu, mis on luukoostises äärmiselt vajalik (Van Dijk et al., 2014, modifitseeritud joonis).

1.5.2. Kollageeni struktuursed domeenid

Kollageeni fibril koosneb kahest domeenist, esimene korraldab rakk-kollageen interaktsioone, teine vastutab struktuursete ülesannete eest. Raku interaktsiooni domeenis seovad kollageen tüüp I rakuga molekulid nagu integriinid, PG-d, diskoidiini domeeni retseptorid, molekulid mis ulatuvad raku pinnale ja ekstratsellulaarsesse maatriksisse, nagu fibronectiin ja SPARC (eritatud valk, happeline ja tsüsteiini rikas). Integriinide sidumine on üks rakk-kollageeni olulisemaid elemente. Integriinide $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ ja $\alpha 11\beta 1$ retseptorid seovad kollageen tüüp I. (Sweeney *et al.*, 2008)

Integriinide siduvaid saite on kollageenis 10, üks olulisem neist on *GFPGER* (Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg) mis omab kriitilist rolli integriinide sidumisel. Integriinid on heterodimeersed retseptorid mis asuvad raku pinnal ja seovad ekstratsellulaarses maatriksis olevaid molekule mängides olulist rolli koe morfogeneesis, maatriksi kokkupanekul ja raku signaalides. *GFPGER* järjestus seob $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$ integriine, toetab angiogeneesi, endoteelset aktivatsiooni, osteoblastide diferentseerumist ja raku adhesiooni. *GFPGER* järjestus paikneb suurima PG-dest vabas tsoonis keskmises ja *GFPGER* järjestuses on leitud väga vähe mutatsioone. (Sweeney *et al.*, 2008)

Ligand-siduvad saitide jaotus kollageen tüüp I on järgmine N terminaalises osas MLBR1 (80-200) ja ülejäänud on kaks C terminaalises osas MLBR2 (680-830) ja MLBR3 (920-helikaalse regiooni lõpuni). Enamik ligandide siduvaid saite asub kollageeni ahela C terminaalises osas. OI-le iseloomulikud tagajärjed on tingitud pigem muutustest kollageeni voltimisel ja stabiilsusel, kui ligand-fibrill interaktsioonidel. Kollageeni heeliksi voltimine toimub C terminaalset otsast N suunas, mutatsioonid C terminuses poolses otsas mõjutavad kollageeni modifitseerumist ja kokkupanekut mõjusamalt, põhjustades tõsisemaid tagajärgi (Byers *et al.*, 1992). Ent sellele on leitud ka erandeid alfa 2 ahelas langevad OI letaalsed mutatsioonid kokku proteoglykaanide PG-fibrill interaktsioonidega. (Marini *et al.*, 2007)

Maatriksi interaktsiooni domeen koosneb fibrilli ristseondumise regioonidest ja struktuursete valkude sidumiskohtadest, "vahe" regioonides on seondumissaidid hüdroksüapatiidile. Antud domeeni ülesanne on kontrollida koe mineraliseerumist (Sweeney *et al.*, 2008).

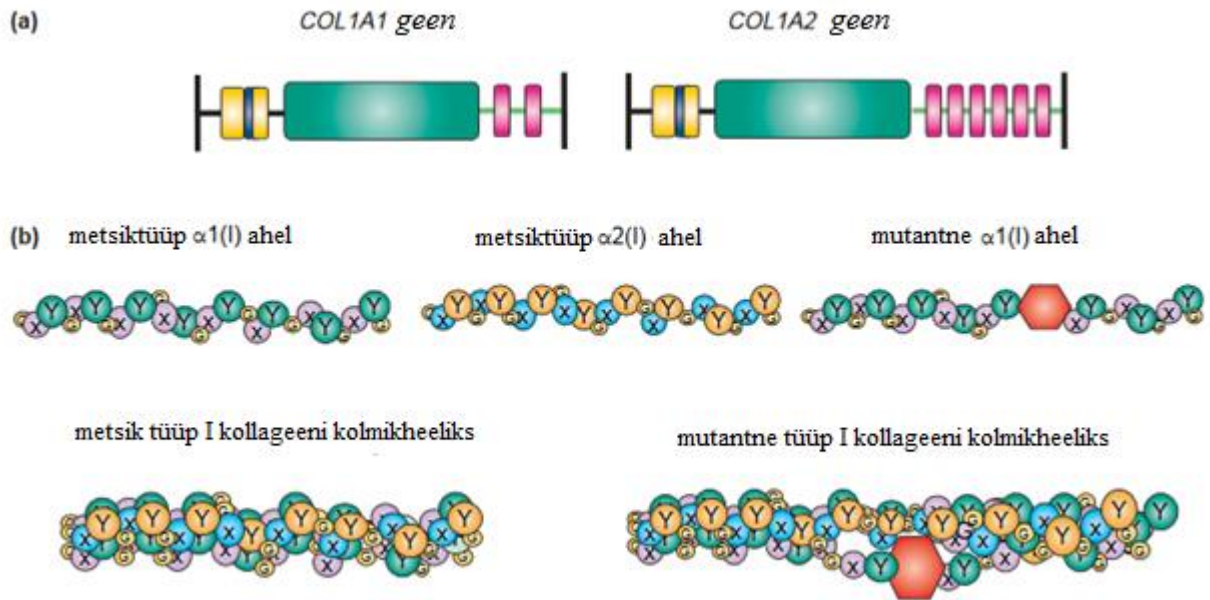
1.5.3. Kollageeni mutatsiooni mehhanismid

Kaks peamist klassi mutatsioone kollageen tüüp I on seotud OI-ga. Esimene klass mutatsioone on kvantitatiivsed haplopuudulikkusele viivad mutatsioonid, mis avalduvad tavaliselt kergema OI tüüp I vormina (Byers 2000). Haplopuudulikkus on tavaliselt nonsenss või raamnihke mutatsiooni tagajärg, mille tulemusel on ühes *COL1A1* kodeerivas ahelas enneaegne terminatsiooni koodon, mis initseerib mRNA lagunemise (Byers 2002, Marini ja Blissett 2013).

Mõned splaiss-saidi mutatsioonid ja C-propeptiidi mutatsioonid *COL1A1* geenis võivad samuti viia haplopuudulikkusele (van Dijk *et al.*, 2012). Splaiss-saidi mutatsiooni tagajärg on krüptiline splaiss-sait, mis seisneb eksoni välja lõikamises või introni kaasamises. Nende mutatsioonide tulemuseks on kvantitatiivne defekt kollageeni tüüp I-s, mille tulemusel sünteesitud valk on normaalse struktuuriga, aga mutatsiooni tõttu sünteesitakse ainult pool normaalsest valgu kogusest. Ülejäänud osa ekstratsellulaarsest maatriksist koosneb struktuurilt korrektsetest kollageeni fibrillidest, kus ahelatelt süntees toimub häirumata pro- $\alpha 1$ ja pro- $\alpha 2$ ahelatelt. Vähenenud kollageeni fibrillide arv ekstratsellulaarses maatriksis, põhjustab selle struktuuri muutumist ja terviklikkuse vähenemist.

Teine klass mutatsioone seisneb järjestuse ebakorrapärasustes, mis viivad struktuursete mutatsioonideni kollageen tüüp I, põhjustades OI tüüpe II-IV. Need sisaldavad spiraalseid glütsiini mutatsioone, mis on kõige tavapärasem OI mutatsioonitüüp. Sellise mutatsiooni puhul asendatakse glütsiini Gly-X-Y järjestuses teise aminohappega, selle tulemuseks on kahjustatud kollageen. Sellised mutatsioonid kahjustavad kolmikheeliksi teket, stabiilsust ja interaktsioone ekstratsellulaarse maatriksiga. Multimeeride struktuuri häirimiseks piisab vähestest mutantsetest monomeeridest pro- $\alpha 1$ ja pro- $\alpha 2$ ahelates (Joonis 4). Glütsiini mutatsioonid kollageen tüüp I põhjustavad dominantset negatiivset efekti (Ben Amor *et al.*, 2011).

Enamik Põhja-Ameerikas ja Euroopas esinevatest OI tüüp II-IV vormidest on tingitud heterosügootsete geenide *COL1A1/2* mutatsioonidest, täpsemalt glütsiini asendustest. OI tüüp II-IV põhjustajaks on 80% juhtudest glütsiini asendused, sest glütsiini asendused häirivad heeliksi korrapärasest volitumist, mis viib translatsiooni järgse ümbermodifitseerimiseni (Marini *et al.*, 2007, Raghunath *et al.*, 1994)



Joonis 4. Skemaatiline esitus *COL1A1/2* geenidest (a) promootor(kollane), TATA-järjestus(sinine) 52 eksonit ja intronit (roheline) polü a signaali ala (roosa) 3'UTR transleerimata region (*untranslated region* UTR)(roheline joon) (b) Tüüp I kollageeni kolmikheeliks koosneb kahest alfa 1 ja ühest alfa 2 ahelast. Kolmikheeliksi formeerumine ja stabiilsus sõltub G-X-Y aminohapete kordustest ahelates (G-glütsiin, X tihti proliin ja Y-hüdroksüproliin). Glütsiini asendus mis pildil on välja toodud punase kuusnurgaga, häirib heeliksi formeerimist ja stabiilsust ning on ilmselt ka OI tekke aluseks. (Millington-Ward 2005 modifitseeritud joonis)

Glütsiin, mis on väikseim aminohape, peab olema kolmandal positsioonil, et tagada korrektne ahela voltimine. Välja vahetatuna lükkub kolmikheeliksi paljundamine edasi, toimub lisa post-translatsiooniline modifitseerimine ja mõningaid seotud trimeere ei eritata kunagi. Glütsiinid (Gly) on äärmiselt vajalikud kolmikheeliksi formeerimiseks. Gly asendus keset kolmikheeliksit teise aminohaptega ei võimalda Gly NH grupil luua ahelatvahelist vesiniksidet naaberahela CO-grupiga, häirides heeliksi teket ja selle stabiilsust (Engel ja Prockop 1991, Engel ja Bachinger 2005, Marini *et al.*, 2007 Harrington *et al.*, 2014).

X ja Y positsioonid Gly-X-Y ahelas on hõivatud erinevate aminohapete poolt ja varieeruvad üle kolmikheeliksi. Uurimused on näidanud, et kollageeni kolmikheeliksist stabiliseerivad 4-hüdroksüproliin (4-Hyp) ja arginiin (Arg) Y positsioonis, aga ka proliin (Pro) X positsioonis (Engel ja Bachinger 2005, Brodsky *et al.*, 2008, Shoulders ja Raines 2009). Stabiilsus on omakorda väga vajalik prokollageeni korrektseks voltimiseks. Näiteks Y positsioonis paikneva Pro puudlik hüdrokülatsoon 4-Hyp-iks kollageen proliin 4-hüdroksülaasi poolt askorbiinhape

puudumisel välistab normaalse prokollageeni sünteesi ja voltumise (Gorres ja Raines 2010, Myllyharju 2008).

1/3 Gly asendustest pro- α 1 ahelas ja 1/5 Gly asendustest pro- α 2 on letaalsed, kui vahetus toimub mittepolaarse või laetud aminohappe vastu (Glu, Arg, Asp, Val) (Marini *et al.*, 2007). OI raskusaste on vastavalt vahetuse teinud aminohappele järgnev - Ala \leq Ser < Cys < Arg < Val < Glu \leq Asp (Beck *et al.*, 2000). Mida suurem aminohape Gly välja vahetab seda ebakorrapärasemaks muutuvad kollageeni fibrillid, selle tulemusena on ka luud nõrgemad.

Letaalsed Gly mutatsioonid paiknevad pro α 1 MLBR2 ja MLBR3 saitides (Makareeva *et al.*, 2008). Pro- α 2 ahelas asuvad letaalse tagajärjega asendused proteglükaane siduvates saitides. On täheldatud ka seda, et sarnase positsioonil toimunud Gly vahetus võib omada erinevat tagajärge näiteks p.Gly1088Glu põhjustas OI tüüp I ja p.Gly1088Ala letaalset OI tüüp II (Xia *et al.*, 2014) Harvemini esinevad mutatsioonid on splaiss-saidi muudatused, insertioonid, deletsioonid ja duplikatsioonid, mis viivad raamisiseste muutusteni (Van Dijk *et al.*, 2012). Säärased heterosügootsed mutatsioonid häirivad tüüp I kollageeni polüpeptiididel kolmikheeliksi formeerumist, mille tulemuseks on pro kollageen tüüp I ületöötlemine posttranslatsioonilise modifikatsiooni teostavate valkude poolt ning tagajärjeks on ebanormaalsne kollageen tüüp I.

COL1A1 geeni deletsiooni tulemuseks on haplopuudlikuus ja väljendub see OI tüüp I kujul. Multiekson deletsioonid *COL1A1* positsioonidel 23 kuni 25 (Barsh *et al.*, 1985; Chu *et al.*, 1985) ja 39 kuni 39 kuni 48 (Bodian *et al.*, 2009) ning *COL1A2* positsioonidel 34 kuni 40 (Willing *et al.*, 1988) on näidatud põhjustavat OI tüüp II. Kollageeni splaiss-saidi mutatsiooni tulemuseks on eksonite vahele jätmise, introni kaasalugemine, introni või eksoni krüptilise splaiss-saidi aktivatsioon, mille tagajärjeks on kergemat sorti OI vormid. (Marini *et al.*, 2007)

1.6. OI geneetiline diagnostika

OI-d iseloomustab suur ja lai valik erinevaid häireid, nt luumurrud, DI ja kuulmiskadu on vaid jäämäe tipp, tänaseks päevaks on selge, et OI kujutab endast kliinilist kontinuumi perinataalselt letaalsusest peaaegu puuduvate sümptomiteni. Patogeneetiline lähenemine OI-le on muutunud uute haigust põhjustavate geenide tõttu. Mutatsioonid kõikides teistes hiljuti avastatud geenides peale OI V tüübi põhjustavad retsessiivselt päritud OI-d.

Geneetiliselt testitakse *COL1A1* ja *COL1A2* geene, kuna liigikaudu 85-90% OI juhtumitest on seotud mutatsioonidega kollageeni geenides (Van Dijk *et al.*, 2011).

Indiviidil kellel kahtlustatakse OI-d viiakse läbi järgnevad protsessid:

1. *COL1A1/2* sekveneerimine.
2. Kui haigust tekitavat mutatsiooni ei leita *COL1A1/2* sekventsianalüüsil, siis tuleb läbi viia deletsiooni/duplikatsiooni analüüs.
3. Kui endiselt ühtegi põhjustavat *COL1A1/2* vormi välja ei ilmu, siis tuleb uuesti üle vaadata kliinilised andmed. Kindlate tõendite puhul mis viitavad OI, mõõdukast kuni raske faasini, tuleb jätkata analüüsidega non-*COL1A1/2*- seotud geneetiliste ebakorrapärasustega.

Kollageeni I sekveneerimine on laborites erinev, ühed kasutavad ekson haaval amplifikatsiooni millele järgneb jada määramine, teised multiekson substraati. Kui õigesti valideerida annavad mõlemad sama eduka mutatsiooni tabamise tõenäosuse. Splaisivariantide identifitseerimiseks tuleb PCR reaktsioonil praimerite disainida nii et intron-ekson piir oleks kaugel, et analüüsil saaks detekteerida mutatsioonid ka intronites (van Dijk *et al.*, 2012).

Deletsioon ja duplikatsioonianalüüs on testid, mis identifitseerivad genoomse DNA kodeerivatelt ja külgnevatelt intronite regioonidelt deletsioone ning duplikatsioone sekventsianalüüsides.

1.7. Sangeri sekveneerimine

Didesoksü sekveneerimise meetod, mida tuntakse tänapäeval Sangeri meetodina põhineb Atkinsoni leiul, mis kirjeldas kuidas 2',3'-dideoksütümidiin-5'-trifosfaat (ddTTP) suudab DNA polümeraasi aktiivsuse inhibeerida, kui see ühineb deoksüadenüül-tümidiil happega (dT) oligonukleotiidi pikendamisel, sest ddT pole 3'-hüdrosüül gruppi (Sanger 1977, Atkinson 1969). Meetod põhineb *in vitro* DNA sünteesil radioaktiivselt märgistatud nukleotiidide ja spetsiifiliste DNA-ahela terminaatornukleotiidide juuresolekul. Välja töötamisest alates on Sangeri sekveneerimise ehk ahela termineerimise meetodika olnud põhilisemaid DNA sekveneerimise meetodeid (leides laialdast kasutust tänapäevalgi). Selle meetodiga on sekveneeritud suurem osa erinevate liikide genome, sealhulgas ka inimese oma.

1.7.1. Sangeri sekveneerimise töövoog

Sangeri meetod ehk ahela terminatsiooni meetod vajab üheaheelalist DNAd, DNA praimerit, polümeraasi, vastavaid desoksüribonukleotiidtrifosfaate (dNTP) ja ahela terminaatoritena kasutatakse enamasti 2',3'-didesoksüribonukleosiidtrifosfaate e ddNTP-sid, kus puudub 3',5'-fosfodiestersideme moodustamiseks ja DNA polümeraasi tööks hädavajalik nukleotiidi 3'-OH ots

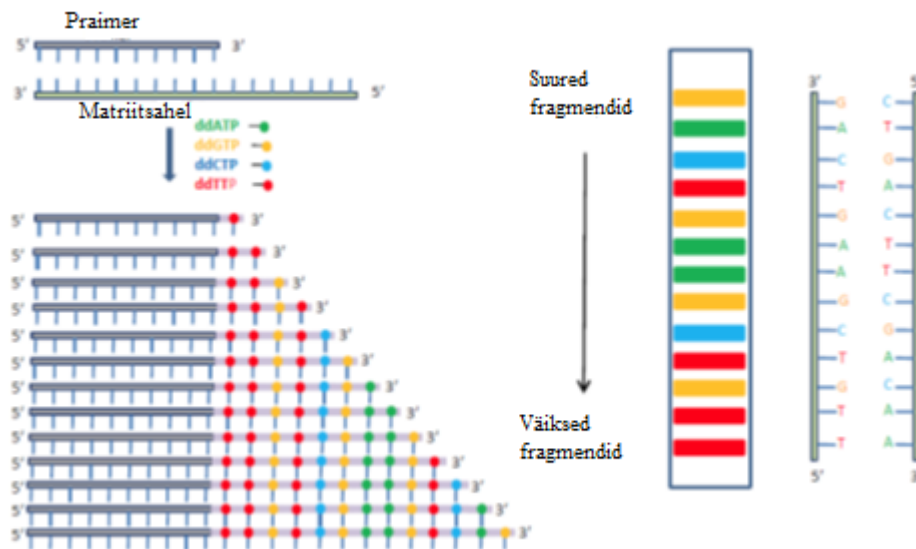
(selle asemel on H). Neli reaktsioonisegu sisaldavad kas 2',3' -didesoksütümidintriifosfaati (ddTTP), 2',3' -didesoksütüidiin-5'-trifosfaati (ddCTP), 2'3' -didesoksüadenosiin-5'-trifosfaati (ddATP) või 2'3' -didesoksüguanosiin-5'-trifosfaati (ddGTP). DNA ahela süntees terminerub vaid juhul, kui sünteesitavasse ahelasse lülitatakse didesoksünukleotiidi.

Esiteks liituvad DNA praimerid DNA maatriksmolekuliga spetsiifilise järjestusega kohaga, seejärel seondub sinna DNA polümeraas. Edasine põhimõte seisneb algsele üheaheelalisele DNA molekulile komplementaarse vastasahela sünteesis sel moel, et vastasahela süntees katkeks juhuslikul hetkel, kuid kindlat tüüpi nukleotiidi (kas siis A, T, C või G) juures.

Kuivõrd reaktsioonisegudes on dXTP: ddXTP (kus X on üks neljast N alusest) suhe 1:100, põhjustab see ahela terminatsiooni tõenäosuse kindlas DNA punktis pärast vastavat nukleotiidi suhtes 1/100. See fakt võimaldab saada uuritavast DNA-lõigust suure parve erineva pikkusega DNA-fragmente, sest DNA sünteesi terminatsioon võib toimuda võrdse tõenäosusega igas võimalikus DNA ahela punktis. Järgnevalt eraldatakse uuesti sünteesitud DNA ahel matriitsahelast denaturatsioonil ja üksikahelalised DNA fragmendid eraldatakse suuruse ja terminaalse ddNTP järgi 3'-terminuses polüakrüülamiidgeelektroforeesil (PAAG). Fragmendi koht geelis detekteeriti algselt autoradiograafia meetodiga. Kui kasutada foreesil paralleelselt nelja rada, igahel ühte reaktsioonisegu neljast, siis saadakse DNA fragmentide jäljed foreesigeelil redelina.

1.7.2. Sangeri sekveneerimine värviterminaatoriga

1986 aastal sai Leroy Hood koostöös Applied Biosystems-ga (ABI) hakkama esmakordselt DNA automatiseeritud sekveneerimisega, mis oli värviterminaatoriga variant Sangeri sekveneerimisest (Joonis 5). Selle meetodi puhul antakse igale neljast ddNTP-st oma värv võimaldades sekveneerimist varasema nelja reaktsioonisegu asemel ühes. Kui DNA matriitsahel, märgistusega primer, dNTP-d, neli fluorestseeruvat värvitud ddNTP-d ja DNA polümeraas on kokku segatud, siis selle tulemusel saadakse erineva pikkusega fluorestseeruvaid DNA fragmente. Iga ddNTP omab erinevat värvi, seega kõik ddNTP-dega determineeritud fragmendid omavad 3'-otstes kindlat värvi. Näiteks, kui A on roheline ja peale mitut tsüklit on DNA fragmendid, mis fluorestseeruvad roheliselt, omavad ilmselt A-d kui termineerivat nukleotiidi.



Joonis 5, Värvitud terminaatorpositsiooniga Sangeri sekveneerimine. Lühike oligonukleotiid mis käitub nagu praimer uute DNA ahelate sünteesil, mis on komplementaarsed matriiisahelaga. Neli erinevat ddNTP-d (igauks markeeritud erineva fluorestsent värviga). Ahela elongatsioon lõpeb ddNTP lisamisega. Tekib segu erineva pikkusega DNA ahelatest, millele järgneb erineva suurusega ahelate eraldamine geel elektroforeesil. DNA sekvents dekodeeritakse saadud nukleotiidide järjestuse värvimustri põhjal. (Fei 2014, modifitseeritud joonis)

Juhuslikult vabalt hõljuvad nukleotiidid ja fluorestseeruvalt värvitud terminaatornukleotiidid garanteerivad, et iga uus sünteesitud DNA lõik on lõpetatud erineva koha pealt. Sel viisil on reaktsiooni tulem kogum fluorestseeruvaid DNA fragmente, mis erinevad pikkuses üksteisest ainult 1 nukleotiidi võrra. See võimaldab erineva pikkusega ahelate eristamise geelil. Iga DNA fragmendi läbimisel detektorist geeli otsas, saab selle värvust salvestada, saadud värvimustrit saab tuletada nukleotiidide järjestuse DNA-s (Smith *et al.*, 1986, Prober *et al.*, 1987).

1.7.3. Kapillaar geelelektroforeesi meetodiga sekveneerimine

Järjestikused arengud vahetasid geelplaadi elektroforeesi välja kapillaar geelelektroforeesi vastu, mis võimaldab suurema elektrivälja rakendamist eraldamiseks maatriksis. Selle arengu üks peamisi efekte oli see, et kiirenes oluliselt fragmentide eristamine (Cohen *et al.*, 1988). Kapillaarelektroforeesi võimsus kasvas kapillaaride massiivide tulekuga veelgi, sest see võimaldas nüüd proovide paralleelset analüüsi (Huang *et al.*, 1992). Lisaks neile saavutustele toimus arenguid ka biokeemias, töötati välja lineaarne polüakrüülamiid- (Ruiz-Martinez *et al.*, 1993) ja polüdimetüülakrüülamiidgeel (Madabhushi 1998), mis võimaldavad kapillaare kasutada mitme tsükli jooksul, suurendades sekveneerimise tõhusust.

Kommertsiaalselt tuli revolutsioon 1996. aastal avalikkusele tutvustatud ABI PRISM 310 *genetic analyser*'ga, mis vahetaski välja geeliplaadi kapillaarelektroforeesi vastu. Geeliplaadil tuli DNA sekveneerimise produkte eralada kasutades polüakrüülamiid geeli, mida pidi manuaalselt haldama ning oli seetõttu väga aja- ja töömahukas. Kapillaarelektroforeesis DNA sekveneerimise produktid sisenevad kapillaari elektrokineetilise süstiga. Lühidalt, sekveneerimise reaktsioonipuhver lükkab kõrgpinge laenguga negatiivselt laetud fragmendid kapillaaridesse. DNA sekveneerimise produktid eraldatakse laengu põhised. Geelile laadimise asendamine kapillaarelektroforeesiga muutis töövoolu kiiremaks ja tõhusamaks. 1998. aasta tuli turule ABI Prism 3700, millel oli 96 kapillaari, võimaldades 900000 aluspaari analüüsi päeva kohta. Sangeri tehnoloogia võimaldas kahel teadusgrupil paralleelselt sekveneerida inimese genoom 2001-ndal aastal (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Sangeri sekveneerimine, kus saadud järjestuse pikkus oli 1000 aluspaari kasutades värviterminaatoreid, oli domineerivaks sekveneerimise tehnikaks, kuni tuli järgmise generatsiooni sekveneerimise tehnika (NGS) pealetung 2005. aastal.

Kuna otsisime OI patsientidelt mutatsioone *COLIA1* ja *COLIA2* geenidest, kasutasime oma uurimuses Sangeri sekveneerimise meetodikat. Sangeri meetodi eeliseks on meetodi täpsus, nimetatakse sekveneerimise “kuldseks standardiks”, see võimaldab sekveneerida splaiss-saite, mis on mitmete OI juhtumite põhjuseks. Kui sihtmärk regioone on vähem kui 100 ja on võimalus tulemusi suuremate sekveneerimisuurimustega kõrvutada on Sangeri meetod efektiivselt. Sangeri sekveneerimise protsess ühele proovile kestab umbes 5 tundi ja maksab ainult mõned dollarid.

2. PRAKTILINE OSA

2.1. Uuringu eesmärk

Uurimuse eesmärgiks oli *COL1A1* ja *COL1A2* geenide mutatsiooni analüüs Sangeri sekveneerimise meetodiga patsientidel, kellel eelnevalt oli kliiniselt *Osteogenesis Imperfecta* diagnoos kinnitatud.

Uuringu etapid:

1. Perekondades OI haigusnähtude ajaloo fülogeneetiline analüüs.
2. Haiguse kandjate fenotüüpide kirjeldus.
3. OI-d põhjustavate mutatsioonide tuvastamine *COL1A1* ja *COL1A2* geenides.

2.2. Materjal ja meetodika

Uurimus viidi läbi kooskõlas Helsingi deklaratsiooniga ja sai heaks kiidu Hue Ülikooli haigla eetikakomisjoni poolt (heakskiit Nr. 75/CN-BVYD) ja Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt (luba № 221/M-34). Uurimus viidi läbi Biomedikumis Tartu Ülikoolis.

2.2.1. Materjal ja patsientide valik

Osteogenesis Imperfecta patsiendid geneetiliseks analüüsiks olid valitud Tartu Ülikooli Traumatoloogia ja Ortopeedia Kliiniku OI andmebaasis, kus oli kokku kogutud bioloogiline materjal, fülogeneetiline ja fenotüübiline info OI patsientidelt umbes 100 perekonnast Eesti ja Vietnami populatsioonidest.

Uurimuse jaoks andmebaasist olid valitud 26 Eesti päritolu ja 91 Vietnami päritoluga patsienti. Patsientidelt või nende legaalselt esindajatelt võeti enne uuringuid kirjalik nõusolek uurimuses osalemiseks. Dr. Katre Maasalu ja Dr. Binh Ho Duy kontakteerusid patsientidega, et läbi viia intervjuu, kliiniline ülevaatus ja koguda vereproove patsientidelt ja nende suglastelt. Kõik patsiendid olid klassifitseeritud vastavalt Sillence klassifikatsioonile. Perekondade fülogeneetilised puud olid koostatud ja OI pärandumismuster perekondades oli tuvastatud.

2.2.2. Proovide kogumine ja DNA eraldamine

Genoomne DNA eraldati EDTA-s säilitatud verest, vastavalt kõrge soolsusega sadestus meetodile ja säilitati -80 °C ning analüüsiti Biomedikumis, Tartu Ülikool.

DNA verest eraldamise protokoll on toodud lisas (Lisa 4).

2.2.3. DNA amplifitseerimine polümeraasi ahelreaktsiooniga

DNA proovid amplifitseeriti kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) kus 25 spetsiaalselt disainitud praimeride paari katsid 5'UTR, 3'UTR regiooneid ja *COL1A1* 51 eksonit ning 36 praimeride paariga kaeti *COL1A2* geenis 5'UTR, 3'UTR regiooneid and 52 eksonit. PCR reaktsioon viidi läbi 20 µl lõppkogusega, millesse kuulusid 4 µl 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load with 7.5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Eesti), 1 µl nii *forward* kui *reverse* praimerit (5 pmol) ja 1 µl gDNA (50 ng). PCR reaktsioon viidi läbi a Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) PCR masinaga.

Täpne PCR programm, mida kasutati amplifikatsiooni reaktsioonil, on toodud lisas (Lisa 5).

2.2.4. Sangeri sekveneerimine ja bioinformaatiline analüüs

Amplifitseeritud PCR produktid kanti 1,5% agarose geelile ja nende liikuvust analüüsiti geelelektroforeesil. PCR produktid puhastati eksonukleas I ja krevetit aluselise fosfataasiga (Thermo Fisher Scientific, USA). Puhastatud PCR fragmentidega viidi läbi Sangeri sekveneerimine kasutades BigDye® Terminator v3.1 tsükelsekveneerimise komplekti (Applied Biosystems, USA) Reaktsioonid viidi ABI3730xl instrumendil.

Sekveneerimise tulemusi analüüsiti Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) ja joondati inimese referents-genoomiga kohalikust referents-genoomi järjestusest (LGR_1, LGR_2)². Sekveneerimise analüüs ja mutatsioonide identifitseerimine viidi läbi *Mutation Surveyor DNA variant analysis software of Softgenetics* (USA)³. Mutatsioonide patogeensuse analüüsimist võimaldas *Alamut Visual software of Interactive Biosoftware* (Prantusmaa).

² <http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/>

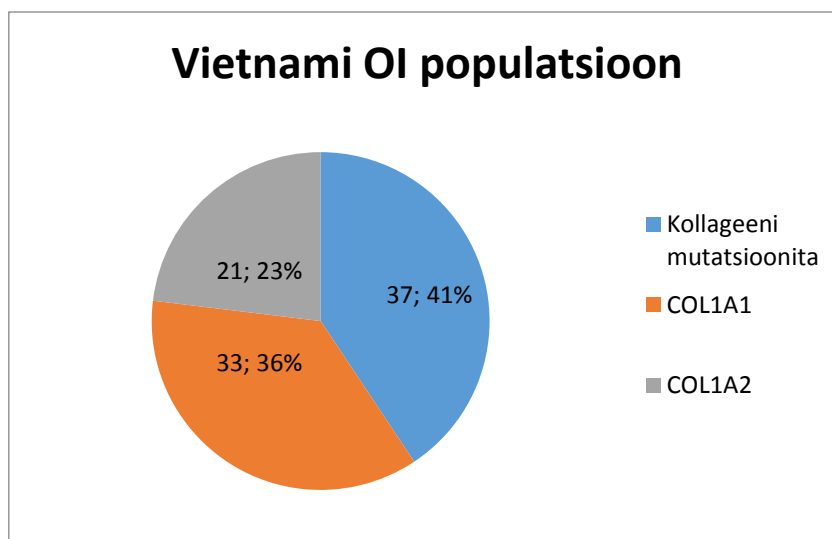
³ <http://www.softgenetics.com/>

Kõik variandid võrreldi läbi ka *Osteogenesis Imperfecta* mutatsioonide andmebaasiga. Patogeensust hinnati SIFT skooriga⁴.

2.3. Tulemused

2.3.1 Vietnami populatsioon

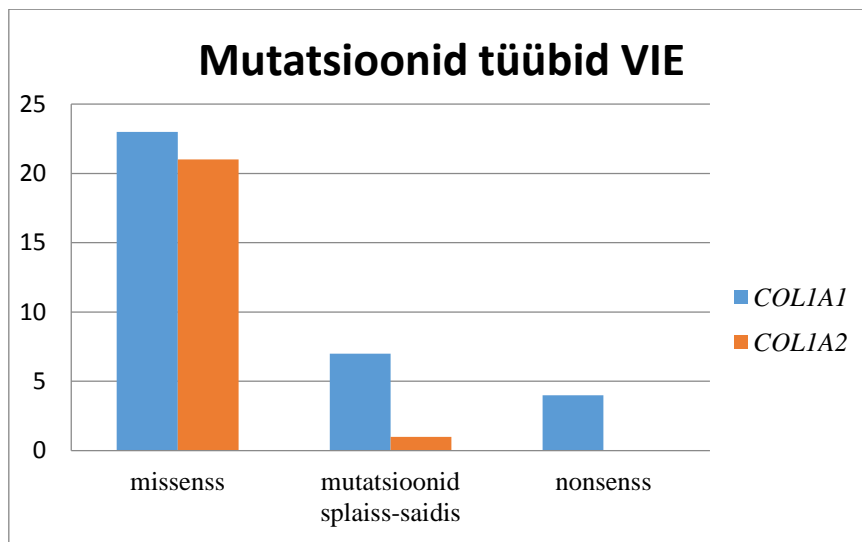
Uuringus osales 91 patsienti Vietnamist, kellel oli varasemalt OI kliiniliselt identifitseeritud. Vietnami valimis oli 91 patsiendist kollageen tüüp I mutatsioone 54 inimesel (59,34%), ülejäänud 37 patsiendil oli OI tingitud häiretest muudes geenides. Kokku leiti 54 inimeselt 56 kollageeni geenide mutatsiooni (Lisa 3). Mutatsioonide jaotus geenides oli järgmine, *COL1A1*-s esines mutatsioone (34/91; 37,36%) ja *COL1A2* puhul (22/91; 24,17%) (Joonis 6.).



Joonis 6. Kollageen I mutatsioonid Vietnami populatsioonis

Mutatsioonide tüübid jaotusid järgnevalt: 34 mutatsiooni *COL1A1* geenis (missenssmutatsioone-23 (nendest 17 oli Gly asendused), nonsenssmutatsioone 4, splaiissingusaidimuatsioone 7) ja 22 *COL1A2* geenis (missenssmutatsioone 21 (nendest 19 Gly asendused), spalissaidimutatsioone 1) (Joonis 7). Missensmutatsioonid tingisid enamasti raskemad OI tüübid III –IV Vietnami populatsioonis.

⁴ <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>



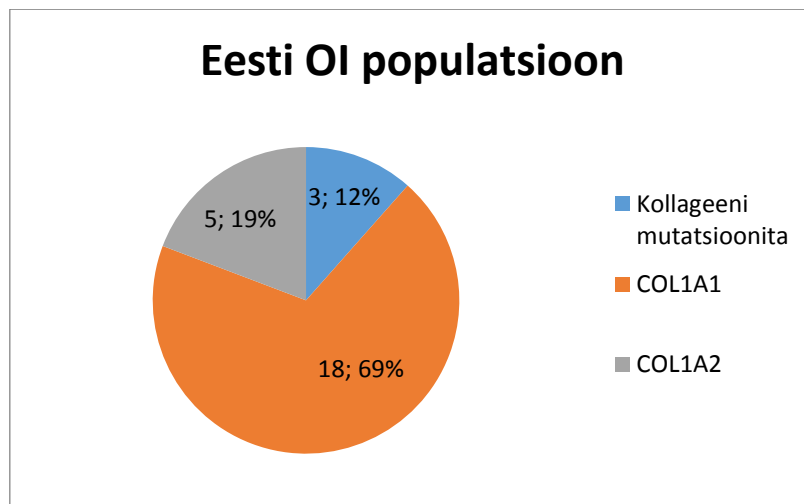
Joonis 7. Mutatsioonimehhanismid Vietnami populatsioonis

Vietnamlaste valimis moodustasid valdava enamuse häireid missenssmutatsioonid 74% (23 *COL1A1* ja 21 *COL1A2*), vähem esines splaissingusaidimutatsioone 14 % (7 *COL1A1* ja 1 *COL1A2*), nonsenssmutatsioone 7% (4 *COL1A1*). Uusi kollageeni mutatsioone leiti Vietnami valimist (*COL1A1* 17/34 50% ning *COL1A2* 10/22; 45,45%). Vietnamlaste valimis oli Gly mutatsioonide esinemise sagedus kõrge 36/56 moodustades 64,28% mutatsioonidest.

2.3.2 Eesti populatsioon

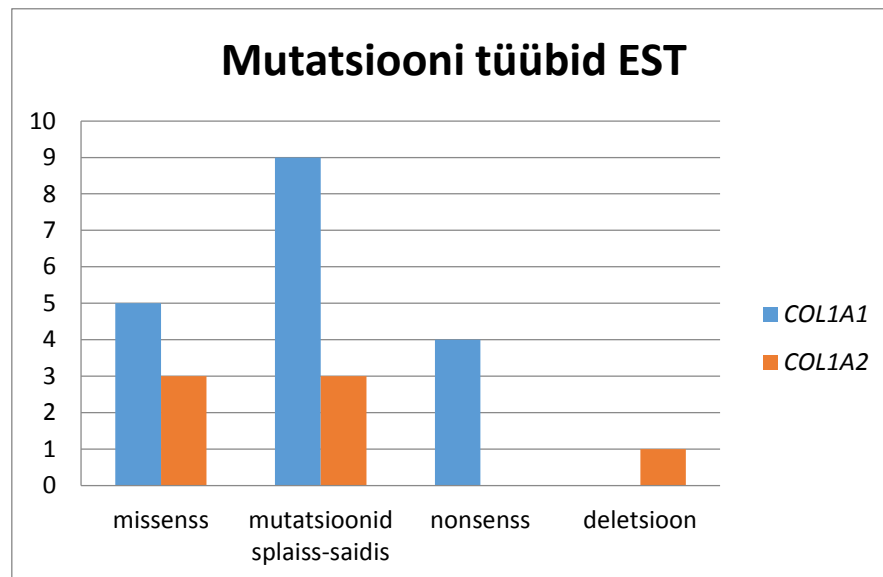
Eestlaste valimis oli 26 patsiendil 23(88,46%) OI tingitud mutatsioonist kollageeni geenis ja kolme patsiendi puhul oli OI tingitud mõne teise geeni häirumisest (LISA 2.). Kõige sagedasem oli eesti populatsioonis muutus *COL1A1* geenis (18/26; 69,23%), vähem esines muutusi *COL1A2* (5/26; 19,23%) (Joonis 8). Muutused *COL1A2* geenis omasid ka tõsisemat väljundit fenotüübis, põhjustades enamikul juhtudel OI tüüp III. Kokku oli Eesti populatsioonis 23 OI patsiendil 25 mutatsiooni kollageeni geenides.

Eestlaste populatsioonis leiti *COL1A1* geenis 18 mutatsiooni (missenss- 5, splaissingusaidi- 9 nonsenss- 4) ja *COL1A2* geenis 7 mutatsiooni (splaissingusaidi- 3, missenss- 3 ja deletsioone- 1).



Joonis 8. Kollageen I mutatsioonid Eesti OI populatsioonis

Eestlaste seas oli sagedaseim häire splaiissingusaidimutatsioon, mis esines kokku 12 korral (9 *COL1A1* ja 3 *COL1A2*) (48%). Nonsenss- ja missenssmutatsioone oli eestlaste valimis vastavalt 5 (5 *COL1A1*) ja 7 juhtu (4 *COL1A1* ja 3 *COL1A2*), nende kõrval esines ka üks raamnihkedeletsioon (joonis 9).



Joonis 9. Mutatsioonimehhanismid Eesti OI patsientides

Antud uurimuse käigus leiti ka palju uusi mutatsioone eestlaste valimis. 25 mutatsioonist 12 (*COL1A1* 10/18 55,56% ning *COL1A2* 2/7; 28,57%) olid seni kirjeldamata.

Gly mutatsioone, mis teatavasti on üks peamisi põhjuseid OI tekkimisel, oli eestlaste valimis 5/25 (*COL1A1* 2 ja *COL1A2* 3) moodustades 20% mutatsioonidest.

3. Arutelu

Meie uurimuses viidi läbi mutatsioonianalüüs 117 inimesele (91 Vietnamist ja 26 Eestist), kellel oli varasemalt *Osteogenesis Imperfecta* (OI) kliiniliselt diagnoositud. Vietnami patsientidest 33-l esines kokku 34 mutatsiooni *COL1A1* geenis ja 22-l patsiendil kokku 23 mutatsiooni *COL1A2* geenis. Eesti patsientidest 17-l oli 17 mutatsiooni *COL1A1* geenis ja 5-l patsiendil 6 mutatsiooni *COL1A2* geenis ning ühel indiviidil olid mutatsioonid mõlemas geenis. Kõik analüüsitud mutatsioonid olid väga patogeense iseloomuga paiknedes kõrgelt konserveerunud genoomi piirkondades (SIFT skooriga enamasti 0.0 ja harva ka 0.1).

3.1. *COL1A1/2* mutatsioonide tasemete varieerumine

Varasemate uurimuste põhjal on teada, et ligi 90% juhtudest on OI põhjuseks mutatsiooni ilmumine *COL1A1/2* geenides. (Pollitt *et al.*, 2006, Shaker *et al.*, 2015) Aasia populatsioonides *COL1A1/2* mutatsioonidega OI patsientide osakaal aga varieerub suuresti 51% kuni 96%-ni (Lee *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2015, Stephen *et al.*, 2014). Varasemate uuringute tulemuste varieerumine võib sõltuda valimi suurusest ja uuritud populatsioonist. Meie uurimuses saadud tulemus näitab, et Vietnami valim omas heterogeenset mutatsioonimustrit, kus 59,34% patsiendid on OI tingitud muutustest kollageen tüüp I geenides, mis sattub Aasia OI populatsioonide mutatsioonide osakaalu alampiirile ja viitab mittekollageensete OI mutatsioonide levikule.

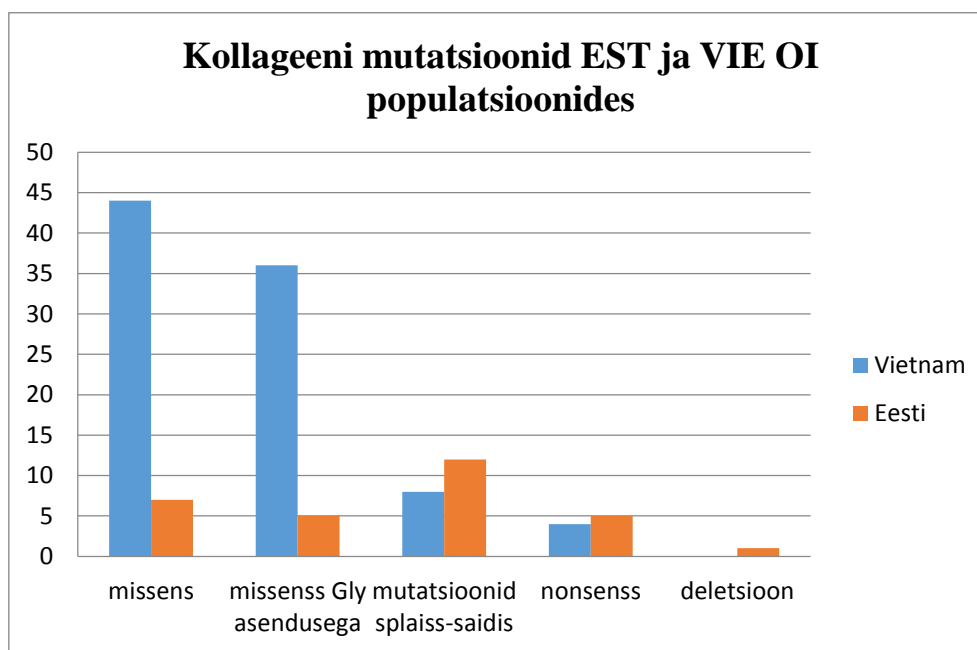
Kollageeni geenide mutatsioonist tingitud OI tase oli Eesti OI populatsioonis väga kõrge (88,46%). Põhja-Euroopa OI populatsioonide uuringud on raporteerinud kollageeni I mutatsioonide osakaalu 80-90% (Lindahl *et al.*, 2015, Hartikka *et al.*, 2004). Need tulemused näitavad seda, et Põhja-Euroopas, sealhulgas Eestis on OI tingitud enamasti kollageeni tüüp I häirumisest.

3.2. *COL1A1/2* mutatsioonide tüübid

Vietnami populatsioonis oli kõige sagedasem OI põhjustaja missenssmutatsioon, mida esines 44 korral. 36 korral 44-st oli missenssmutatsioon seotud Gly asendusega. Eesti OI populatsioonis on kõige sagedasem haiguse tekke põhjus mutatsioonid splaissaitides, mis põhjustasid 25 mutatsioonist Eesti OI populatsioonis 12. Vietnamis populatsioonis enamiku mutatsioone tekitanud missenssmutatsiooni mehhanism oli Eesti populatsioonis sageduselt teisel kohal OI

tekitajana (7 juhtumiga, millest 5 olid põhjustatud Gly asendustest). Vietnami OI populatsioonis olid splaiss-saidi mutatsioonid OI põhjustajana teisel kohal põhjustades 8 patsiendil OI. Mõlemas populatsioonis on nonsenssmutatsioonid OI põhjustajana kolmandal kohal. Vaatama populatsioonide suuruste erinevusele on mutatsioonide arvud üpris sarnased (4-VIE vs 5 EST) (Joonis 10). Erinevate mutatsioonitüüpide tingitud fenotüübid olid pehmemad Eesti populatsioonis, kus OI kõige kergemat OI tüüp I vormi esines pooltel OI patsientidest (48 %). Vietnami populatsioonis olid erinevate fenotüüpide esinemissagedused üpris sarnased (kõik OI vorme (I, III, IV) oli üle 30%), kõige rohkem esines OI tüüp IV 36%.

Meie andmed on kooskõlas varem publitseeritud uuringute tulemustega, kus Aasia populatsioonides on rohkem missenssmutatsioone tingivaid Gly asendusi (70-80%), ning Põhja-Euroopa populatsioonides suurim osa mutatsioonide on splaissaitide mutatsioonid (Stephen *et al.*, 2014, Marini *et al.*, 2007).



Joonis 10. Eesti ja Vietnami OI patsientides esinenud mutatsiooni mehhanismide võrdlus

Samuti leidsime, et kõige sagedamini esines vietnamlaste valimis Gly asendus Seriin (Ser) vastu 63,9% (23/36), vähem oli asendusi valiini 11,1%(4/36) ning tsüsteiini ja asparagiinhappe vastu, mõlemat 8,3% (3/36). Marini *et al.*, on täheldanud, et kõige raskemad OI fenotüüblised tagajärjed olid tingitud Gly vahetustest valiini, asparagiinhappe ja arginiini vastu. Ühtlasi moodustavad just need aminohapped 2/3 Gly asendustest (Marini *et al.*, 2007). Kooskõlas meie poolt läbi viidud

uurimusele Vietnami populatsioonis, leidus teistes Aasia populatsioonides sarnaseid mustreid, näiteks Hiina OI patsientide uurimuses moodustasid enamiku (72%) Gly asendustest seriini vastu (Zhang *et al.*, 2012) ja Taivani OI patsientidel 40% asendustest asparagiinhappe vastu (Lin *et al.*, 2015).

Eesti OI valimis oli kokku 12 splaiss-saidi mutatsiooni, millest $\frac{3}{4}$ asusid *COL1A1* geenis ning pea pooltel kordadest põhjustasid OI tüüp I, mis on sarnane Marini *et al.*, (2007) uurimuses leitud, kus ta kirjeldas, et üle poolte splaiss-saidi mutatsioonide tagajärjeks on OI tüüp I. Nonsenss- ja splaiss-saidi mutatsioonid on mõlemad haplopuudulikkuse tekitajad, mille tagajärjeks on kollageen tüüp I kvantitatiivne häire (Marini *et al.*, 2014).

3.3. Sama mutatsiooni juhuslik tekke mittesugulastel patsientidel

Vietnami valimis oli OI patsientidel VN013012, VN344012, VN403012 ja VN493012 *COL1A1* 37 eksonis kõigil sama mutatsiooni c.2461G>A (p.Gly821Ser) ning patsiendid omasid kliiniliselt sarnaseid omadusi OI tüüp I ja IV. Varasemad uurimused aga kirjeldavad c.2461G>A mutatsiooniga patsiente väga erinevate kliiniliste omadustega. Vietnami valimis oli kahel perekonnal VN883012 ja VN 893012 sarnane mutatsioon *COL1A1* geeni 30 eksonis c.2005G>A (p.Ala669Thr), mis tingis mõlemal OI tüüp IV. Sarnaseid mutatsioone omavaid, suguluses mitteolevaid juhtumeid, on ka varem kirjeldatud, näiteks Lee *et al.*, uurimuses, kus 5 patsienti kandsid c.982G>A (p.Gly328Ser) *COL1A2* geenis (Lee *et al.*, 2005). Antud mutatsioonid paiknesid geenide mutatsiooni “kuumades” regioonides. Mutatsioonide seos kergete fenotüüpidega viitab vähem konserveerunud geeni alale, mis taluvad kergemini muutumist.

Eesti valimis oli kolmel patsiendil (34012, 123012, 204012) mutatsioon *COL1A2* 18 intronis c.937-3C>T mis mõjutab splaissaiti, varasemates uurimustes on seda käsitletud kui patogeenset mutatsiooni. Kahel perekonnal Eesti valimist 214012 ja 224012 omasid *COL1A1* geenis 46 eksonis nonsens mutatsiooni, mis tingisid vastavalt OI tüüp IV ja I. Varasemalt on teada, et nonsens mutatsioon on haplopuudulikkuse tekke põhjuseks, tuues kaas enneaegse terminatsiooni koodoni tekke ja sellega mRNA lagunemise initsieerimise (Marini ja Blissett 2013)

3.4. Topelt mutatsioonid

Meie uurimuses olid nii Vietnami kui Eesti valimites mõlemas 2 isikut, kellel analüüs leidis 2 mutatsiooni. Vietnami populatsioonis oli patsiendil VN013012 kliiniliselt identifitseeritud OI

tüüp I. Geneetiline analüüs leidis aga kaks mutatsiooni *COL1A1* geenis ekson 37-ndas c.2461G>A (p.Gly821Ser) ja ekson 30-ndas c.2005G>A (p.Ala669Thr). Huvitav on siinjuures see, et sarnaseid mutatsioone omasid meie vietnamlaste valimis suguluses mitteolevad patsiendid. Patsient VN474012 oli kaks mutatsiooni *COL1A2* geenis eksonis 46, c.3034G>GA (p.Gly1012Ser) ja eksonis 41, c.2569C>CA (p.Pro857Thr). Topelt mutatsioone on OI seotud kirjanduses üldjuhul presenteeritud vähe, näiteks Takagi *et al.*, raporteeris juhusest, kus väga tõsise OI tüüp II-III oli patsiendil, kellel esines kaks Gly vahetusega mutatsiooni *COL1A2* geeni samas alleelis (p.Gly208Glu and p.Gly235Asp) (Takagi *et al.*, 2015). Meie uurimuses oli Vietnami valimis mõlemal patsiendil Gly mutatsioon *COL1A1* geenis, mille tõttu VN474012 omas IV tüüpi OI ja VN013012 I tüüpi OI.

Eestlaste valimis oli patsiendil 34012 mutatsioon nii *COL1A1* geenis 26-ndas eksonis c.1897G>GT (nonsens) kui ka *COL1A2* 18-ndas intronis c.937-3C>T (splaiss-saidi mutatsioon). Kliiniliselt oli patsiendile diagnoositud OI tüüp IV. Teisel patsiendil Eesti valimist 204012 oli mõlemad mutatsioonid *COL1A2* geenis 23-ndas eksonis c.1268_1269delGT (raamnihe/deletsioon) ja 18-ndas intronis c.937-3C>T. Kliiniliselt oli patsient OI tüüp I kandja. Huvitav antud leidude juures Eesti populatsioonis on see, et mõlemad topelt mutatsioone omanud isikud omasid kumbki üht sarnast mutatsiooni omamata sugulust.

3.5. Uued mutatsioonid

Meie uurimusest vietnamlastelt leitud 56 mutatsioonist 27 (17 *COL1A1* ja 10 *COL1A2*) olid varasemalt Dalgleishi OI mutatsioonide andmebaasis kirjeldamata. Uute leitud mutatsiooni variantide protsent (48%) on kõrgem kui mitmes muus Aasias läbi viidud uurimuses (Stephen *et al.*, 2014, Lin *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2011) ja sarnaselt Taivani (Lin *et al.*, 2015) OI populatsiooni uurimusega on leitud, et kollageen I häirumisega otseselt mitteseotud retsessiivset OI vormi põhjustavate mutatsioonide protsent on mõlemas valimis suhteliselt sarnane (40% Vietnam vs 49% Taivan). See näitab meile seda, et aasialaste puhul on OI epidemioloogia mitmekülgsem ja fenotüüp-genotüüp korrelatsioonid Aasia OI populatsioonis vajavad põhjalikumat uurimist. Eestlaste valimis oli 25 mutatsioonist 12 (52%) varem kirjeldamata, ent näiteks soomlaste 2004 aastal läbiviidud uurimusele olid 49 mutatsioonist 41 (84%) uued. (Hartikka *et al.*, 2004).

3.6. Mutatsioonide nn “kuumad kohad”

Mutatsiooni “kuumad” kohad ehk kohad kollageeni ahelas kus esines OI-d põhjustavaid mutatsioone kõige rohkem oli vietnamlaste valimis *COL1A1* geenis intron 1, eksonites 8, 14-15, 17-18, 30, 33/34, 37 ja *COL1A2* geenis eksonid 17-18, 37, 40-41, 43.

Eestlaste valimis olid mutatsiooni “kuumad” kohad *COL1A1* geenis eksonites 26 ja 45-46 ning *COL1A2* geenis 18-ndas intronis.

Eestlaste valimis olid mutatsiooni “kuumad kohad” *COL1A1* geenis eksonites 26 ja 45-46, *COL1A2* geenis 18 intronis.

Antud mutatsioonide kuumad kohad on seotud järgmiste saitidega *COL1A1* ja *COL1A2* geenides.

- Kõhre maatriksi oligomeerse valgu siduv sait (*cartilage oligomeric matrix protein* COMP) paikneb MLBR sees ja on ligande siduv sait (Rosenberg *et al.*, 1998). COMP on kõhre iseloomustav marker, seda esineb suurtes kogustes fibrootiliste armide ja süsteemse skleroosi korral (Halper ja Kjaer 2014)
- HSP 47(*heat shock protein 47*) HSP47 on *SERPINH1* geenilt kodeeritud prokollageeni tšaperon, mille peamine eesmärk on vältida liiga varast kollageeni voltimist (Ishida and Nagata, 2011) Kollageen I suutmatust HSP47 tšaperone siduda võib lõppeda prokollageeni enneaegse voltimise ja raske OI-ga.
- ENDO 180 – kollageeni siduv faktor, Endo180 on oluline komponent kollageen-raku vahelisel interaktsioonil ja edendab fibroplast-kollageen adhesiooni (Engelholm *et al.*, 2003)
- $\alpha1\beta1/\alpha2\beta1$ integriine siduv sait. Integriinid on peamised raku retseptorid valgu ekstratsellulaarses maatriksis, koosnedes transmembraansetest alamühikutest α ja β , mis on ühendatud mittekovalentse sidemega. $\alpha1\beta1$ funktsioonide hulka kuuluvad: fibroplastide proliferatsioon, kollageeni sünteesi regulatsioon ja MMP ekspressioon. $\alpha2\beta1$ integriin funktsiooniks.
- SPARC-iga (eritatud valk, happeline ja tsüsteiini rikas) raku interaktsiooni domeen. Defektne SPARC võib põhjustada probleeme Ca^{2+} sidumisel kollageeniga (Yiu *et al.*, 2001).
- Diskoidiin domeeni retseptor 2- (DDR-2). DDR2 toimib kui ekstratsellulaarse maatriksi sensor, mis kontrollib raku proliferatsiooni (Labrador *et al.*, 2001)
- Fibronektiin on integriine siduv glükoproteiin kollageeni ekstratsellulaarne maatriksis (Fedarko 2014). Fibronektiin siduvate saitide kaotus võib mõjutada fibrillide ristsidemete

loomist (Kadler *et al.*, 2008). Fibronektiin seondub kollageenile ja ka teistele maatriks valkudele ning võib mõjutada osteoblastide diferentseerumist (Salaszyk *et al.*, 2004). Muutused eelmainitud saitides toovad endaga kaasa, kollageeni valesti modifitseerimise, häireid kollageenide vaheliste ristsidemetega fibrillide loomisel, rakk-ligand suhete häirumise. Nendest häiretest tuleneb omakorda erineva astmega luude haprus.

3.7. Uuringu piirangud

Mutatsioonide hotspotid antud katses asuvad regioonides, mis võimaldavad aminohapete vahetusi, mille tulemuseks on teistsugune valk, ent organism suudab vaatamata sellele ellu jääda. Mutatsiooni hotspotide vahele jäävad alad aga võivad olla seotud regioonidega millede funktsioon võib olla otsustav ja selle muutmisel võivad olla letaalsed tagajärjed. (Marini *et al.*, 2007, Sweeney *et al.*, 2008)

Antud uurimuses tuleb arvestada ka sellega et Sangeri meetodi täpsus on 99,9% lubades identifitseerida splaissiite, raamnihke, missens ja nonsense mutatsioone *COL1A1/2* geenides, ent esinevad ka teatud piirangud. Sangeri sekveneerimine ei suuda identifitseerida kogu geeni või eksoni duplikatsiooni või deletsiooni, seetõttu võivad *COL1A1/2* esinenud mutatsioonide arv jääda alahinnatuks

Teiseks suuremaks piiranguna tuleb arvestada, et kollageeni põhjustatud mutatsioonid erinevad *Osteogenesis Imperfecta* uurimustes, sageli on põhjuseks erinev valimi suurus, samas ei saa täiesti välistada, et erinevalt Eesti valimist, kus antud uurimuse põhjal võib väita, et kollageenist tingitud OI on kõige sagedasem vorm, võibki vietnami populatsioon heterogeensem antud haiguse suhtes.

KOKKUVÕTE

Osteogenesis Imperfecta(OI), mida tuntakse ka kui habraste luude haigus tingib patsientidel sagedased luumurrud, skeleti deformatsioone ja silma sarvkesta värvi muutuse. Sümptomite nimekirja kuuluvad veel ka vähenenud luude mass(osteoporoos või osteopeenia), Dentinogenesis Imperfecta(DI), kasvupeetus, kuulmiskadu, liigeste lõtvus, ning võib esineda ka skolioosi. OI st tulenevad fenotüübid on individuaalsed, erinedes sageli sama mutatsiooni kandjate vahel ning isegi sama perekonna sees. Väga heterogeense haigusena esineb vorme perinataalselt letaalsusest kuni kerge osteopeeniani.

OI-d põhjustavad teadaolevalt 19 erinevat geeni, sealhulgas ligikaudu 90% juhtudest on OI tekke põhjus mutatsioon kollageeni I $\alpha 1$ ja $\alpha 2$ ahelates (*COL1A1*, *COL1A2* geenid). OI esinemissagedust on kajastatud erinevalt, ent üldine esinemissagedus arvatakse jääma 1/10000-20000.

Käesoleva töö eesmärgiks oli läbi viia Sangeri sekveneerimine 91 OI patsiendile Vietnamist ning 26 OI patsiendile Eestist ja tuvastada OI-d põhjustavaid mutatsioone *COL1A1* ja *COL1A2* geenides.

Vietnami populatsioonis oli 54 patsiendil OI tingitud mutatsioonidest *COL1A1/2* geenides, mis moodustab 59,3% kõist juhtudest. Kõige sagedasem mutatsioonide tekkemehhanism oli glütsiini missens mutatsioonid mis antud populatsioonis põhjustas 79% mutatsioonidest, põhjustades enamasti OI tüüp III-IV. Eesti populatsioonis oli 26-st OI patsiendist 23 puhul haigus tingitud mutatsioonidest *COL1A1/2* geenides. Kõige sagedasem mutatsioonide tekkemehhanism Eesti OI populatsioonis oli splaiss-saitide muteerumine, mille tagajärgedeks on enamasti OI tüüp I. Tähelepanuväärne oli ka fakt, et Vietnami populatsioonis oli kollageen tüüp I häirumisest tingitud OI 59% OI patsientidest, Eesti populatsioonis aga 88% OI patsientides, siit võib järeldada, et Vietnami populatsioonis on OI tekke põhjused heterogeensemamad kui Eesti populatsioonis. Antud uurimuses tuleb arvestada ka Sangeri sekveneerimise iseärasuste ja erinevate populatsioonide suurustega. Järgmises sammuks antud uurimuse juures oleks läbi viia eksoomianalüüs kollageen tüüp I suhtes negatiivsete OI patsientide puhul, et leida mutatsioone teistes geenides.

SUMMARY

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a genetic disorder characterized by bones that break easily, often from little or no apparent cause. Previously, the disorder was thought to be an autosomal dominant bone dysplasia caused by defects in type I collagen, but in the past 10 years discoveries of novel (mainly recessive) causative genes have lent support to a predominantly collagen-related pathophysiology and have contributed to an improved understanding of normal bone development.

Defects in proteins with very different functions, ranging from structural to enzymatic and from intracellular transport to chaperones, have been described in patients with *Osteogenesis Imperfecta*. The characteristic features of OI vary greatly from person to person, even among people with the same type of OI, and even within the same family. The classic symptoms are blue sclera, multiple bone fractures and early hearing loss. Because type I collagen is also found in ligaments, persons with OI often have loose joints (hypermobility) and flat feet. Some types of OI also lead to the development of poor teeth.

The overall prevalence of OI is estimated to be 1 per 10,000-20,000 live births. Four types of osteogenesis imperfecta were originally described by Sillence in 1979, and are now used broadly as the Sillence Criteria.

In 85-90% of cases, the gene mutation occurs in the region where the exon and intron splice sites are sequenced. All current mutations for type 1 collagen and their associated phenotypes can be found in the Human Type 1 Collagen Mutation Database.

The gene sequence coding for the triple-helix domain has a repeating motif of (Gly-X-Y)_n, where X is commonly hydroxyproline and Y is commonly hydroxylysine. Glycine, being the smallest of all amino acids, fits into the core of the superhelix when the chains wind around each other; therefore, glycine plays an important role in the superhelix formation.

There is not a perfect correlation between genotype and phenotype, but a few observations have been made. First, generally speaking mutations in the *COL1A1* gene will tend to be more severe than a mutation in the *COL1A2* gene, likely due to the fact that that two alpha 1 chains and only one alpha 2 chain are required to make the procollagen I heterotrimer.

Collagen gene mutations are divided into two types – quantitative and qualitative defects. In the case of quantitative defect, haploinsufficiency (caused by frameshift, nonsense, and splice-site mutations) takes place. Collagen structure is normal but there is a lack of collagen in bone matrix. Mild OI is usually caused by quantitative collagen defects, whereas severe OI is caused by qualitative collagen defects.

In our study we analysed 91 Vietnamese ja 26 Estonian OI patients for mutations in *COL1A1/2* genes. After sequencing the *COL1A1/2* genes, we found 56 mutations in 54 OI patients. Main mutation mechanism was missense mutation that occurred 44 times, out of those 44 mutations 36 were Gly substitutions. Missensmutations led mostly to severe OI types III-IV in Vietnamese population. In among Estonian population we found 25 mutations in *COL1A1/2* genes in 23 patients, half of those mutations were splice site mutations giving a rise to mildest type of OI.

It must be taken into consideration, that the percentage of collagenous mutations in Osteogenesis Imperfecta varies from study to study due to very different sample sizes of the studies. However, we cannot exclude probability, that Vietnamese population indeed has decreased rates of collagenous OI mutations and unique OI mutational profile with higher level of rare non-collagenous mutations compared to other populations.

TÄNUAVALDUSED

Esimesed tänusõnad on suunatud professor Sulev Kõksile, kes mind oma laborisse eksterniks vastu võttis ja minu jaoks väga huvitava projekti välja pakkus.

Teisena tahan tänada Ele Pransi, kelle õpetused ja asjalikud nõuanded aitasid laboritöös palju kaasa.

Kõige suurem tänu läheb Lidiia Zhytnikule, minu põhijuhendajale, kes on mind antud töös väga palju aidanud ja palju kasulikku nõu andnud nii laboris katseid tehes, analüüsi läbiviimisel kui ka antud magistritöö kokku kirjutamisel.

Olulise tänu võlgnen ka kaasjuhendajale Raivo Raidile, kelle täpsed kommentaarid ja nõuanded magistritöö kirjutamisel on olnud hindamatud.

Kirjandus

Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, *et al.* Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive *Osteogenesis Imperfecta*. *Am J Hum Genet* 2010;87(4):572–3.

Baljet B: Aspects of the history of *Osteogenesis Imperfecta* (Vrolik's syndrome). *Ann Anat* 184: 1–7 (2002).

Baljet B: Willem Vrolik as a teratologist [in Dutch]. *Ned Tijdschr Geneesk* 128: 1530–1534 (1984).

Barnes AM, Chang W, Morello R *et al.*: Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal *Osteogenesis Imperfecta*. *N Engl JMed* 2006; 355: 2757–2764.

Barsh, G.S., Roush, C.L., Bonadio, J., Byers, P.H., Gelinis, R.E. (1985). Intron-mediated recombination may cause a deletion in an alpha 1 type I collagen chain in a lethal form of *Osteogenesis Imperfecta*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(9):2870-2874.

Basel, D., Steiner, R.D. (2009). *Osteogenesis Imperfecta*: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genet Med.* 11(6):375-385

Becker, J., Semler, O., Gilissen, C., Li, Y., Bolz, H.J., Giunta, C., Bergmann, C., Rohrbach, M., Koerber, F., Zimmermann, K., de Vries, P., Wirth, B., Schoenau, E., Wollnik, B., Veltman, J.A., Hoischen, A., Netzer, C. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive *Osteogenesis Imperfecta*. *Am J Hum Genet.* 88(3):362-371.

Beighton P and Versfeld G.A.. On the paradoxically high relative prevalence of *Osteogenesis Imperfecta* type III in the black population of South Africa. *Clin Genet.* 1985 Apr;27(4):398-401.

Ben Amor IM, Glorieux FH, Rauch F. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant *Osteogenesis Imperfecta*. *J Osteoporos.* 2011;2011:540178

Beck, K., Chan, V.C., Shenoy, N., Kirkpatrick, A., Ramshaw, J.A., Brodsky, B. (2000). Destabilization of *Osteogenesis Imperfecta* collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(8):4273-4278

Boedtke, H., Fuller, F., Tate, V. (1983). The structure of collagen genes. *Int Rev Connect Tissue Res.* 10:1-63.

Bodian DL, Chan T-F, Poon A, Schwarze U, Yang K, Byers PH, *et al.*. Mutation and polymorphism spectrum in *Osteogenesis Imperfecta* type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):463–71.

Bonita RE, Cohen IS, Berko BA. Valvular heart disease in *Osteogenesis Imperfecta*: presentation of a case and review of the literature. *Echocardiography.* 2010;27(1):69–73.

Brodsky B, Thiagarajan G, Madhan B, Kar K. Triple-helical peptides: an approach to collagen conformation, stability, and self-association. *Biopolymers* 2008;89(5):345–53.

Byers PH, Pyott SM. 2012. Recessively inherited forms of *Osteogenesis Imperfecta*. *Annu Rev Genet* 46:475–497.

Byers, PH. “Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 109, no. 1, pp. 3–6, 2002.

Byers PH, “Collagens: building blocks at the end of the development line,” *Clinical Genetics*, vol. 58, no. 4, pp. 270–279, 2000.

Byers PH, Steiner RD: *Osteogenesis Imperfecta*. *Annu Rev Med* 1992;43: 269-282.

Byers PH, Bonadio JF, Cohn DH, Starman BJ, Wenstrup RJ, Willing MC: *Osteogenesis Imperfecta*: the molecular basis of clinical heterogeneity. *Ann NY Acad Sci* 543: 117–128 (1988).

Cabral, W.A., Chang, W., Barnes, A.M., Weis, M., Scott, M.A., Leikin, S., Makareeva, E., Kuznetsova, N.V., Rosenbaum, K.N., Tifft, C.J., Bulas, D.I., Kozma, C., Smith, P.A., Eyre, D.R., Marini, J.C. (2007). Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe *Osteogenesis Imperfecta*. *Nat Genet*. 39(3):359-365

Chau FY, Wallace D, Vajaranant T, Herndon L, Lee P, Challa P, *et al.*, Chapter 31—*Osteogenesis Imperfecta* and the eye. In: Sponseller JRSHBHG, editor. *Osteogenesis Imperfecta*. San Diego: Academic; 2014. p. 289–303.

Cho, T.J., Lee, K.E., Lee, S.K., Song, S.J., Kim, K.J., Jeon, D., Lee, G., Kim, H.N., Lee, H.R., Eom, H.H., Lee, Z.H., Kim, O.H., Park, W.Y., Park, S.S., Ikegawa, S., Yoo, W.J., Choi, I.H., Kim, J.W. (2012). A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes *Osteogenesis Imperfecta* type V. *Am J Hum Genet*. 91(2):343-348.

Christiansen, H.E., Schwarze, U., Pyott, S.M., AlSwaid, A., Al Balwi, M., Alrasheed, S., Pepin, M.G., Weis, M.A., Eyre, D.R., Byers, P.H. (2010). Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive *Osteogenesis Imperfecta*. *Am J Hum Genet*. 86(3):389-398.

Chu, M.L., Gargiulo, V., Williams, C.J., Ramirez, F. (1985). Multiexon deletion in an *Osteogenesis Imperfecta* variant with increased type III collagen mRNA. *J Biol Chem*. 260(2):691-694.

Cohen, A. S., Najarian, D. R., Paulus, A., Guttman, A., Smith, J. A., & Karger, B. L. (1988). Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9660–9663.

Cundy, T. (2012). Recent advances in *Osteogenesis Imperfecta*. *Calcif Tissue Int*. 90(6):439-449.

Currey, J.D. (2012). The structure and mechanics of bone. *J Mater Sci*. 47:41-54.

Dimasi D, Chen J, Hewitt A, Klebe S, Davey R, Stirling J, *et al.*. Novel quantitative trait loci for central corneal thickness identified by candidate gene analysis of *Osteogenesis Imperfecta* genes. *Hum Genet.* (2010);127(1):33–44.

Engel J, Bachinger HP. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Top Curr Chem* 2005;247:7–33.

Engel J, Prockop DJ. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1991;20:137–52.

Engelholm LH, List K, Netzel-Arnett S, Cukierman E, Mitola DJ, Aaronson H, Kjølner L, Larsen JK, Yamada KM, Strickland DK, Holmbeck K, Danø K, Birkedal-Hansen H, Behrendt N, Bugge TH. uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion. *J Cell Biol.* 2003 Mar 31;160(7):1009-15.

Evereklioglu C, Madenci E, Bayazit YA, Yılmaz K, Balat A, Bekir NA. Central corneal thickness is lower in *Osteogenesis Imperfecta* and negatively correlates with the presence of blue sclera. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2002;22(6):511–5

Fahiminiya, S., Majewski, J., Al-Jallad, H., Moffatt, P., Mort, J., Glorieux, F.H., Roschger, P., Klaushofer, K., Rauch, F. (2014). Osteoporosis Caused by Mutations in PLS3 - Clinical and Bone Tissue Characteristics. *J Bone Miner Res.*

Fedarko NS. Osteoblast/Osteoclast Development and Function in *Osteogenesis Imperfecta* *Osteogenesis Imperfecta* A Translational Approach to Brittle Bone Disease. 2014, Pages 45-56

Forlino A, Marini JC. *Osteogenesis Imperfecta*. *Lancet.* 2016 Apr 16;387(10028):1657-71

Freemont A J Research Article: The pathology of *Osteogenesis Imperfecta*. *J Clin Pathol* 1996;49:8 618-619doi:10.1136/jcp.49.8.618

Gelse K: Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003, 55:1531–1546.

Glorieux FH, Rauch F, Plotkin H, *et al.*. Type V *Osteogenesis Imperfecta*: a new form of brittle bone disease. *J Bone Miner Res.* 2000;15(9):1650–1658

Gorres KL, Raines RT. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45(2):106–24.

Ha-Vinh R, Alanay Y, Bank RA,: Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (*Osteogenesis Imperfecta* with contractures of the large joints) caused by recessive mutation in PLOD2. *Am J Med Genet* 2004; 131A: 115–120

Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:31-47

Hansen B, Jemec GB. The mechanical properties of skin in *Osteogenesis Imperfecta*. *Arch Dermatol.* 2002;138(7):909–11

Harrington J, Sochett E, Howard A. Update on the evaluation and treatment of *Osteogenesis Imperfecta*. *Pediatr Clin North Am*. 2014;61(6):1243–57.

Hartikka, H., Kuurila, K., Körkkö, J., Kaitila, I., Grénman, R., Pynnönen, S., Hyland, J. C. and Ala-Kokko, L. (2004), Lack of correlation between the type of *COL1A1* or *COL1A2* mutation and hearing loss in *Osteogenesis Imperfecta* patients. *Hum. Mutat.*, 24: 147–154. doi:10.1002/humu.20071

Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis *Anal. Chem.*, 64 (1992), pp. 2149–2154

Ishida, Y., Nagata, K. (2011). Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Methods Enzymol*. 499:167-182.

Ishikawa Y, Wirz J, Vranka JA, Nagata K, Bañchinger HP: Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1_cartilage-associated protein_cyclophilin B complex. *J Biol Chem* (2009); 284: 17641–17647

Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20(5):495–501.

Kelley, B.P.1, Malfait, F., Bonafe, L., Baldrige, D., Homan, E., Symoens, S., Willaert, A., Elcioglu, N., Van Maldergem, L., Verellen-Dumoulin, C., Gillerot, Y., Napierala, D., Krakow, D., Beighton, P., Superti-Furga, A., De Paepe, A., Lee, B. (2011). Mutations in *FKBP10* cause recessive *Osteogenesis Imperfecta* and Bruck syndrome. *J Bone Miner Res*. 26(3):666-672.

Keupp, K, Beleggia, F., Kayserili, H., Barnes, A.M., Steiner, M., Semler, O., Fischer, B., Yigit, G., Janda, C.Y., Becker, J., Breer, S., Altunoglu, U., Grünhagen, J., Krawitz, P., Hecht, J., Schinke, T., Makareeva, E., Lausch, E., Cankaya, T., Caparrós-Martín, J.A., Lapunzina, P., Temtamy, S., Aglan, M., Zabel, B., Eysel, P., Koerber, F., Leikin, S., Garcia, K.C., Netzer, C., Schönau, E., Ruiz-Perez, V.L., Mundlos, S., Amling, M., Kornak, U., Marini, J., Wollnik, B. (2013). Mutations in *WNT1* cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*. 92(4):565-574.

Kocher MS., and Shapiro F. *Osteogenesis Imperfecta*. *J Am Acad Orthop Surg* 1998;6:225-236

Kuurila K, Kaitila I, Johansson R, Grenman R.(2002). Hearing loss in Finnish adults with *Osteogenesis Imperfecta*: A nationwide survey. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111:939–946.

Labrador, J. P., Azcoitia, V., Tuckermann, J., Lin, C., Olaso, E., Manes, S., Bruckner, K., Goergen, J.-L., Lemke, G., Yancopoulos, G., Angel, P., Martinez-A, C., Klein, R. The collagen receptor *DDR2* regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism. *EMBO J*. 20: 446-452, 2001

Lapunzina, P., Aglan, M., Temtamy, S., Caparrós-Martín, J.A., Valencia, M., Letón, R., Martínez-Glez, V., Elhossini, R., Amr, K., Vilaboa, N., Ruiz-Perez, V.L. (2010). Identification of a frameshift mutation in *Osterix* in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 87(1):110-4.

Laine, C.M., Joeng, K.S., Campeau, P.M., Kiviranta, R., Tarkkonen, K., Grover, M., Lu, J.T.,

Pekkinen, M., Wessman, M., Heino, T.J., Nieminen-Pihala, V., Aronen, M., Laine, T., Kröger, H., Cole, W.G., Lehesjoki, A.E., Nevarez, L., Krakow, D., Curry, C.J., Cohn, D.H., Gibbs, R.A., Lee, B.H., Mäkitie, O. (2013). WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and *Osteogenesis Imperfecta*. *N Engl J Med*. 368(19):1809-1816.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

Lazarus, S., Moffatt, P., Duncan, E.L., Thomas, G.P. (2014). A brilliant breakthrough in OI type V. *Osteoporos Int*. 25(2):399-405.

Lee K-S, Song H-R, Cho T-J, Kim HJ, Lee T-M, Jin H-S, Park H-Y, Kang S, Jung S-C, Koo SK: Mutational spectrum of type I collagen genes in Korean patients with *Osteogenesis Imperfecta*. *Hum Mutat* 2006, 27(December 2005):599–599

Lin H-Y, Chuang C-K, Su Y-N, Chen M-R, Chiu H-C, Niu D-M, Lin S-P: Genotype and phenotype analysis of Taiwanese patients with *Osteogenesis Imperfecta*. *Orphanet J Rare Dis* 2015, 10:152.

Lindahl K, Åström E, Rubin CJ, Grigelioniene G, Malmgren B, Ljunggren Ö, Kindmark A Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with *Osteogenesis Imperfecta*. *European Journal of Human Genetics* (2015) 23, 1042–1050; doi:10.1038/ejhg.2015.81;

LoMauro A, Pochintesta S, Romei M, D'Angelo MG, Pedotti A, Turconi AC, *et al.*,. Rib cage deformities alter respiratory muscle action and chest wall function in patients with severe *Osteogenesis Imperfecta*. *PLoS ONE*. 2012;7(4), e35965

Madabhushi RS. Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions. *Electrophoresis*. 1998 Feb;19(2):224-30.

Makareeva, E., Mertz, E.L., Kuznetsova, N.V., Sutter, M.B., DeRidder, A.M., Cabral, W.A., Barnes, A.M., McBride, D.J., Marini, J.C., Leikin, S.(2008). Structural heterogeneity of type I collagen triple helix and its role in *Osteogenesis Imperfecta*. *J Biol Chem*. 283(8):4787-4798.

Marini JC, Blissett AR. New genes in bone development: what's new in *Osteogenesis Imperfecta*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(8):3095–103.

Marini JC, Cabral WA, Barnes AM: Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive *Osteogenesis Imperfecta*. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 59–70.

Marini JC, Forlino A, Cabral W a, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, Hyland JC, Körkkö J, Prockop DJ, De Paepe A, Coucke P, Symoens S, Glorieux FH, Roughley PJ, Lund AM, Kuurila-Svahn K, Hartikka H, Cohn DH, Krakow D, Mottes M, Schwarze U, Chen D, Yang K, Kuslich C, Troendle J, Dalglish R, Byers PH: Consortium for *Osteogenesis Imperfecta* mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* 2007, 28:209–21.

Marini J. *Osteogenesis Imperfecta*. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, *et al.*,., editors. *Endotext*. South Dartmouth: MDText.com, Inc.; 2000

Millington-Ward, Sophia, Helena P. McMahon, and G. Jane Farrar. "Emerging Therapeutic Approaches for *Osteogenesis Imperfecta*." *Trends in Molecular Medicine* 11.6 (2005): 299-305.

Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets. *Ann Med* 2008;40(6):402–17.

Paterson CR, Monk EA, McAllion SJ. How common is hearing impairment in *Osteogenesis Imperfecta*? *J Laryngol Otol*.2001;115(4):280–2.

Paterson CR, McAllion S, Miller R. 1983. Heterogeneity of *Osteogenesis Imperfecta* type I. *J Med Genet* 20:203–205.

Peltier LF: The classic: congenital osteomalacia. Olaus Jacob Ekman. Clin Orthop Relat Res 3–5 (1981).

Pollitt R, McMahon R, Nunn J, Bamford R, Afifi A, Bishop N, *et al.*. Mutation analysis of *COL1A1* and *COL1A2* in patients diagnosed with *Osteogenesis Imperfecta* type I–IV. Hum Mutat 2006;27(7):716.

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science. (1987) Oct 16;238(4825):336-41.

Prockop DJ, Fertala A. Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides. Demonstration that assembly is driven by specific binding sites on the monomers. (1998) J Biol Chem 273:15598–15604.

Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem. (1995);64:403-34

Puig-Hervás, M.T.1, Temtamy, S., Aglan, M., Valencia, M., Martínez-Glez, V., Ballesta-Martínez, M.J., López-González, V., Ashour, A.M., Amr, K., Pulido, V., Guillén-Navarro, E., Lapunzina, P., Caparrós-Martín, J.A., Ruiz-Perez, V.L. (2012). Mutations in *PLOD2* cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome *Osteogenesis Imperfecta* phenotypic spectrum. Hum Mutat. 33(10):1444-1449.

Pyott SM, Schwarze U, Christiansen HE *et al.*: Mutations in *PPIB* (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate *Osteogenesis Imperfecta* phenotypes. Hum Mol Genet (2011); 20: 1595–1609.

Raghunath, M., Bruckner, P. & Steinmann, B. Delayed triple helix formation of mutant collagen from patients with *Osteogenesis Imperfecta*. J. Mol. Biol. 236, 940–949 (1994).

Reeder, J., Orwell, E. (2006). Images in clinical medicine. Adults with osteogenesis imperfecta. N Engl J Med. 355(26):e28.

Rosenberg K, Olsson H, Mörgelin M, Heinegård D "Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen".(1998) The Journal of Biological Chemistry 273 (32): 20397–403

Ruiz-Martinez MC, Berka J, Belenkii A, Foret F, Miller AW, Karger BL. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection Anal. Chem., 65 (1993), pp. 2851–2858

Santos F, McCall AA, Chien W, Merchant S. Otopathology in *Osteogenesis Imperfecta*. Otol Neurotol. 2012;33(9):1562–6.

Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE (2004) Adhesion to vitronectin and collagen i promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Biomed Biotechnol 2004:24–3

Seedorff KS. *Osteogenesis Imperfecta*; a study of clinical features and heredity based on 55 Danish families comprising 180 affected members. Universitetsforlaget; 1949.

Shaheen, R.I., Alazami, A.M., Alshammari, M.J., Fageih, E., Alhashmi, N., Mousa, N., Alsinani, A., Ansari, S., Alzahrani, F., Al-Owain, M., Alzayed, Z.S., Alkuraya, F.S. (2012). Study of autosomal recessive *Osteogenesis Imperfecta* in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J Med Genet.* 49(10):630-635.

Shaheen R, Al-Owain M, Sakati N, Alzayed ZS, Alkuraya FS: FKBP10 and Bruck syndrome. Phenotypic heterogeneity or call for reclassification? *Am J Hum Genet* 2010; 87: 306–307.

Shaker JL, Albert C, Fritz J, Harris G: Recent developments in *Osteogenesis Imperfecta* [v1 ; ref status : indexed, <http://f1000r.es/5ao>] Referee Status :. 2015, 4:2–11

Shapiro JR, Lietman C, Grover M, Lu JT, Nagamani SCS, Dawson BC, *et al.*,. Phenotypic variability of *Osteogenesis Imperfecta* type V caused by an IFITM5 mutation. *J Bone Miner Res.* 2013;28(7): 1523–30.

Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 2009;78:929–58.

Sillence DO, Barlow KK, Garber AP, Hall JG, Rimoin DL. *Osteogenesis Imperfecta* type II delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. *Am J Med Genet.* 1984 Feb;17(2):407-23.

Sillence, D.O., Senn, A., Danks, D.M. (1979). Genetic heterogeneity in *Osteogenesis Imperfecta*. *J Med Genet.* 16(2):101-116.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986 Jun 12-18; 321(6071):674-9.

Stephen J, Shukla A, Dalal A, Girisha KM, Shah H, Gupta N, Kabra M, Dabadghao P, Phadke SR: Mutation spectrum of *COL1A1* and *COL1A2* genes in Indian patients with *Osteogenesis Imperfecta*. *Am J Med Genet Part A* 2014, 164(March):1482–1489.

Stevenson DA, Carey JC, Byrne JL, Srisukhumbowornchai S, Feldkamp ML. Analysis of skeletal dysplasias in the Utah population. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(5):1046–54.

Sweeney, S.M., Orgel, J.P., Fertala, A., McAuliffe, J.D., Turner, K.R., Di Lullo, G.A., Chen, S., Antipova, O., Perumal, S., Ala-Kokko, L., Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, J.C., San Antonio, J.D. (2008). Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J Biol Chem.* 283(30):21187-21197

Swinnen FK, Coucke PJ, De Paepe AM, Symoens S, Malfait F, Gentile FV, Sangiorgi L, D'Eufemia P, CelliM, Garretsen TJ, CremersCW, Dhooge IJ, De Leenheer EM. (2011). *Osteogenesis Imperfecta*: The audiological phenotype lacks correlation with the genotype. *Orphanet J Rare Dis* 6:88.

Symoens, S., Malfait, F., D'hondt, S., Callewaert, B., Dheedene, A., Steyaert, W., Bächinger, H.P., De Paepe, A., Kayserili, H., Coucke, P.J. (2013). Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive *Osteogenesis Imperfecta* in humans. *Orphanet J Rare Dis.* 8:154.

Takagi M, Kouwaki M, Kawase K, Shinohara H, Hasegawa Y, Yamada T, Fujiwara I, Sawai H, Nishimura G, Hasegawa T: Severe *Osteogenesis Imperfecta* Caused by Double Glycine Substitutions Near the Amino-Terminal Triple Helical Region in *COL1A2*. *Am J Med Genet Part A* 2015, 167(JUNE):2851–2854

Van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoel AFJ : Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem* (2003); 278: 40967–40972.

Van Dijk FS, Sillence DO. *Osteogenesis Imperfecta*: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A*. (2014);164

Van Dijk, F.S.1, Byers, P.H., Dalgleish, R., Malfait, F., Maugeri, A., Rohrbach, M., Symoens, S., Sistermans, E.A., Pals, G. (2012). EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of *Osteogenesis Imperfecta*. *Eur J Hum Genet*. 20(1):11-19.

Van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, Maugeri A, Nikkels PG, van Rijn RR, Pals G. (2011). *Osteogenesis Imperfecta*: A review with clinical examples. *Mol Syndromol* 2:1–20.

Van Dijk FS, Pals G, van Rijn RR, Nikkels PG, Cobben JM. (2010). Classification of *Osteogenesis Imperfecta* revisited. *Eur J Med Genet* 53:1–5.

Van Dijk, F.S., Nesbitt, I.M., Zwikstra, E.H., Nikkels, P.G., Piersma, S.R., Fratantoni, S.A., Jimenez, C.R., Huizer, M., Morsman, A.C., Cobben, J.M., van Roij, M.H., Elting, M.W., Verbeke, J.I., Wijnaendts L.C., Shaw, N.J., Högler, W., McKeown, C., Sistermans, E.A., Dalton, A., Meijers-Heijboer, H., Pals, G. (2009). PPIB mutations cause severe *Osteogenesis Imperfecta*. *Am J Hum Genet*. 85(4):521-527.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C,

Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooshep S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.

Willaert A, Malfait F, Symoens S Recessive *Osteogenesis Imperfecta* caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. *J Med Genet* (2009); 46: 233–241.

Willing, M.C., Cohn, D.H., Starman, B., Holbrook, K.A., Greenberg, C.R., Byers, P.H. (1988). Heterozygosity for a large deletion in the alpha 2(I) collagen gene has a dramatic effect on type I collagen secretion and produces perinatal lethal *Osteogenesis Imperfecta*. *J Biol Chem*. 263(17):8398-8404.

Xia, X.Y., Li, W.W., Li, N., Wu, Q.Y., Cui, Y.X., Li, X.J. (2014). A novel mild variant of *Osteogenesis Imperfecta* type I caused by a Gly1088Glu mutation in *COL1A1*. *Mol Med Rep*. 9(6):2187-2190.

Yang Z, Ke ZF, Zeng C, Wang Z, Shi HJ, Wang LT: Mutation characteristics in type I collagen genes in Chinese patients with *Osteogenesis Imperfecta*. *Genet Mol Res* 2011, 10:177–185.

Yiu, G.K.1, Chan, W.Y., Ng, S.W., Chan, P.S., Cheung, K.K., Berkowitz, R.S., Mok, S.C. (2001). SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol*. 159(2):609-622.

Zhang Z-L, Zhang H, Ke Y, Yue H, Xiao W-J, Yu J-B, Gu J-M, Hu W-W, Wang C, He J-W, Fu W-Z: The identification of novel mutations in *COL1A1*, *COL1A2*, and *LEPRE1* genes in Chinese patients with *Osteogenesis Imperfecta*. *J Bone Miner Metab* 2012, 30:69–77.

Kasutatud raamatud

Fei Y. DNA sequencing, sanger and next-generation sequencing. In: Ulucan K, editor. Applications of Molecular genetics in Personalized Medicine. USA: OMICS Group eBooks; 2014.

Shapiro, J.R., Byers, P.H., Glorieux, F.H., Sponseller, P.D. (2014). *Osteogenesis Imperfecta: A Translational Approach to Brittle Bone Disease*. Elsevier. Academic Press

Steiner RD, Adsit J, Basel D. 2013. *COL1A1/2-Related Osteogenesis Imperfecta*. Genereviews

Kasutatud veebiaadressid:

¹<https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>

²<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/lrgex/>

³<http://www.softgenetics.com/>

⁴<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>

LISAD

Lisa 1. OI geneetiline klassifikatsioon

OI Tüüp	Kliinilised omadused	Päritavus	Defektne geen/valk
Kollageenil põhinevad OI vormid			
I	Normaalne kasv, väheldane või puuduv deformatsus, sinine silma kõvakest, kuulmiskadu 50% perekondades. Alamtüüp A-I on normaalsed hambad, alamtüüp B-I on dentinogenesis imperfecta(DI)	AD	COL1A1/kollageen I (alfa1)
II	Perinataalselt letaalne, minimaalne kolju mineralisatsioon, toruluude deformatsioonid, kokkusurutud reieluud	AD/Mosaikism	COL1A1/kollageen I (alfa1)
III	Progressiivselt luud deformeeriv, tavaliselt sündimisel deformatsioonid mõõdukad. Kõvakest läheb vanusega heledamaks. DI on tavaline, nagu ka lühike kasv ja kuulmiskadu	AD	COL1A1/kollageen I(alfa 1) või COL1A2/kollageen I(alfa2)
IV	Kerge kuni mõõdukas luude deformatsioon, lühike kasvu varieerumine, mõnigates peredes kuulmiskadu. Valge või sinine silma kõvakest. Alamtüüp A-I on normamaalsed hambad, alamtüüp B-I on DI	AD/Mosaikism	COL1A1/kollageen I(alfa 1) või COL1A2/kollageen I(alfa2)
Kollageeniga mitte seotud OI tüübid			
Mineralisatsiooni defektid			
V	Fenotüübiliselt sarnane OI tüüp Iv, iseloomuliku histoloogiaga.	AD	IFITM5/BRIL
Retsessiivne OI			
VI	Diagnoos põhineb unikaalsetel histoloogilistel omadustel Kalasoomuste sarnane ilming: Kõrgendatud alkaliin fosfataasi aktiivsus	AR	SERPINF1/PEDF
Defektid kollageen propüül 3-hüdroksülatsiooni kompleksi komponentides			
VII	Tõsine või isegi letaalne luude düspalaasia, sarnane tüüpidele II ja III. Pea ümbermõõt väike, silma kõvakest sinine või valge, lühenenud jäsemed	AR	CRTAP
VIII	Tõsine või isegi letaalne luude düspalaasia, sarnane tüüpidele II ja III, lühenevad jäsemed, silma kõvakest valge, pea ümbermõõt väike	AR	LEPRE/P3H1
IX	Mõõdukast tõsise luude düspalaasia sarnane OI III ja IV, valge kõvakest	AR	PPIB/CyPB
Defektid kollageenid chaperonides ja foldaasides			
X	Tõsine luude düspalaasia, sinime kõvakest, makrotsefaalia, DI, üldine hüpotoonia	AR	SERPINH/Hsp47

XI	Deformeeriv düsplaasia ja küfoskolioos(mõlemad progressiivsed). Hallikad-valged kõvakestad. Normaalne kuulmine, Coxa vara, Haprad luud. Mutatsioonid FKBP10 põhjustavad ka I tüüpi Bruck sündroomi.	AR	FKBP10/FKBP65
	Defektid kollageeni töötlemisel		
XII	Mõõdukast tõsiseni. DI puudub, üldine hüpotoonia ja luude deformatsioon, liigeste hüperliikuvus, võimalik toruluude kaardumine, haprad luud, valge kõvakest	AR	BMP1/mTLD
	Defektid osteoblastide diferentseerumisel		
Klassifitseerimata tüübid	Mõõdukas kuu düsplaasia: Normaalne kuulmine ja kõvakest, haprad luud, mikrognatia, DI puudub, kerge skolioos, üldine osteoporoos	AR	SP7/Osterix
	Mõõdukast tõsiseni, progressivselt deformeeriv. Sinakas kõvakest mõnedel patsientidel, toruluude kaardumine, skolioos, selgroo murrud, haprad luud , üldine demineralisatsioon häirumine, osteopeenia, lihaste hüpotoonia	AR/AD	WNT!
	Mõõdukas luude düsplaasia. Kergelt sinakas-hallid kõvakestad, üldine osteopeenia, õhukesed ribid, mõned indiviidi lühikest kasvu, haprad luud	AR	TMEM38/TRIC-B
	Tõsine. Õhukesed ribid, mitmed murrud juba sünnieelselt ja paranemine deformatsioonidega, kaardus reie- ja õlevarreluud	AR	CREBL1/OASIS

Lisa 2. COL1A1/2 mutatsioonid Eesti OI patsientides (sinine taust – uus mutatsioon)

	Patsient ID	Geen	Mutatsiooni positsioon	Ekson	Mutatsiooni efekt	Valk	OI tüüp
1	13012	COL1A2	c.1630G>GT	Ekson 28	Missense	p.Gly544Cys	III
2	24012	COL1A1	c.1821+1G>A	Intron 26	Splice site	-	III
3	34012	COL1A1	c.1897G>GT	Ekson 26	Nonsense	p.Glu633*	IV
		COL1A2	c.937-3C>T	Intron 18	Splice site	-	IV
4	44012	COL1A1	c.750+2T>TA	Intron 10	Splice site	-	IV
5	54012	COL1A1	c.1821+1G>GA	Intron 26	Splice site	-	I
6	83012	COL1A1	c.3217G>GA	Ekson 45	Missense SIFT 0.0	p.Gly1073Ser	III
7	94012	COL1A1	c.1155+2T>TG	Intron 17	Splice site	-	I
8	104012	COL1A1	c.1128delT	Ekson 17	Nonsense	p.Gly377Alafs*164	I
9	114012	COL1A1	c.3235G>GA	Ekson 45	Missense, SIFT 0	p.Gly1079Ser	I
10	123012	COL1A2	c.937-3C>T	Intron 18	Splice site	-	III
11	134012	COL1A1	c.2089C>TC	Ekson 31	Nonsense	p.Arg697*	IV
12	153012	COL1A2	c.1009G>GA	Ekson 19	Missense	p.Gly337Ser	III
13	164012	COL1A2	c.2324G>GA	Ekson 38	Missense	p.Gly775Glu	III
14	174012	COL1A1	c.3045+1G>A,	Intron 42	Splice site	-	IV
15	184012	COL1A1	c.505G>GA	Ekson 6	Missense SIFT 0.22	p.Glu169Lys	I
16	193012	COL1A1	c.299-1G>C	Intron 3	Splice site	-	IV
17	204012	COL1A2	c.1268_1269delGT, het	Ekson 23	Deletion, Frameshift	p.Arg423Argfs*11	I
		COL1A2	c.937-3C>T	Intron 18	Splice site	-	
18	214012	COL1A1	c.3262G>GT	Ekson 46	Nonsense	p.Gly1088*	IV
19	224012	COL1A1	c.3262G>GT	Ekson 46	Nonsense	p.Gly1088*	I

20	243012	COL1A1	1767+5G>GA	Intron 25	Splice site	-	IV
21	253012	COL1A1	c.1354-2A>AG	Intron 20	Splice site	-	I
22	263012	COL1A1	c.3223G>GA	Exon 45	Missense SIFT 0.0	p.Ala1075Thr	III
23	274012	COL1A1	c.3208-1G>GA	Intron 44	Splice site	-	I

Lisa 3. COL1A1/2 mutatsioonid Vietnami OI patsientides (sinine taust – uus mutatsioon)

	Patsient ID	Geen	Mutatsiooni positsioon	Ekson	Mutatsiooniefekt	Valk	OI tüüp
1.	VN013012	COL1A1	c.2461G>GA	Exon 37	Missense, SIFT 0.0	p.Gly821Ser	I
		COL1A1	c.2005G>GA	Exon 30	Missense, SIFT 0.13	p.Ala669Thr,	
2.	VN024012	COL1A1	c.1200+1G>GT	Intron 18	Splice site	-	I
3.	VN053012	COL1A1	c.1072delC, het	Exon 17	Frameshift	p.Glu358Lysfs*26	III
4.	VN093012	COL1A2	c.3305G>GT	Exon 49	Missense	p.Gly1102>Val	I
5.	VN133012	COL1A1	c.4391T>C	Exon 52	Missense SIFT 0.01,	p.Leu1464Pro	I
6.	VN184012	COL1A1	c.103+2T>TC	Intron 1	Splice site	-	IV
7.	VN214012	COL1A1	c.4352dupA, het.	Exon 52	Nonsense	p.Asp1451Glufs*100	IV
					Frameshift		
8.	VN233012	COL1A2	c.2261G>GT	Exon 37	Missense	p.Gly754Val	I
9.	VN253012	COL1A2	c.1072G>GT	Exon 37	Missense	p.Gly358Ser	III
10.	VN263012	COL1A1	c.3226G>GA	Exon 45	Missense, SIFT 0.0	p.Gly1076Ser	IV
11.	VN294012	COL1A2	c.1630G>GA	Exon 28	Missense	p.Gly544Ser	IV
12.	VN344012	COL1A1	c.2461G>GA	Exon 37	Missense, SIFT 0.0	p.Gly821Ser,	IV
13.	VN383012	COL1A1	c.959G>GA	Exon 15	Missense SIFT 0.0	p.Gly320Asp	IV

14.	VN393012	COL1A1	c.630delG, het	Exon 8	Frameshift	p.Glu210Aspfs*3	III
15.	VN403012	COL1A1	c.2461G>GA	Exon 37	Missense, SIFT 0.0	p.Gly821Ser	IV
16.	VN413012	COL1A1	c.1102G>GA	Exon 17	Missense, SIFT 0.0	p.Gly368Ser	IV
17.	VN454012	COL1A2	c.1090G>GA	Exon 21	Missense	p.Gly364Ser	III
18.	VN474012	COL1A2	c.3034G>GA	Exon 46	Missense	p.Gly1012Ser	IV
			c.2569C>CA	Exon 41	Missense	p.Pro857Thr	
19.	VN484012	COL1A2	c.1451G>GA	Exon 25	Missense	p.Gly484Glu	IV
20.	VN493012	COL1A1	c.2461G>GA	Exon 37	Missense, SIFT 0.0	p.Gly821Ser	IV
21.	VN504012	COL1A1	c.932G>GT	Exon 14	Missense SIFT 0.0	p.Gly311Val	III
22.	VN513012	COL1A1	c.949G>GA	Exon 14	Missense SIFT 0.0	p.Gly317Ser	IV
23.	VN524012	COL1A1	c.2523delT,	Exon 37	Frameshift	p.Gly842Alafs*266	I
					Nonsense		
24.	VN564012	COL1A2	c.1729G>GA	Exon 30	Missense	p.Gly577Ser	III
25.	VN584012	COL1A1	c.2236-2A>AG	Intron 32	Splice site	-	I
26.	VN604012	COL1A2	c.1009G>GA	Exon 19	Missense	p.Gly337Ser	IV
27.	VN624012	COL1A2	c.1378G>GA	Exon 24	Missense	p.Gly460Ser	IV
28.	VN643012	COL1A2	c.1964G>GT	Exon 32	Missense	p.Gly655Val	IV
29.	VN653012	COL1A2	c.1981G>GC	Exon 33	Missense	p.Gly661Ser	III
30.	VN664012	COL1A1	c.2596G>AG	Exon 38	Missense SIFT 0.0	p.Gly866Ser	III
31.	VN684012	COL1A1	c.2299G>GA	Exon 33/34	Missense SIFT 0.0	p.Gly767Ser	I
32.	VN693012	COL1A2	c.874G>GA	Exon 17	Missense	p.Gly292Ser	III
33.	VN704012	COL1A1	c.2281G>GA	Exon	Missense SIFT 0.0	p.Gly761Ser	IV

				33/34			
34.	VN713012	COL1A1	c.1002+2T>C	Intron 15	Splice site	-	IV
35.	VN723012	COL1A1	c.1165G>GT	Exon 18	Missense SIFT 0.0	p.Gly389Cys	I
36.	VN764012	COL1A1	c.1165G>GA	Exon 18	Missense SIFT 0.0	p.Gly389Ser	III
37.	VN784012	COL1A1	c.3766G>GA	Exon 49	Missense SIFT 0.02;	p.Ala1256Thr	I
38.	VN814012	COL1A2	c.982G>GA	Exon 19	Missense	p.Gly328Ser	III
39.	VN823012	COL1A2	c.2503G>GA	Exon 40	Missense	p.Gly835Ser	III
40.	VN833012	COL1A2	c.792+1G>GA	Exon 16	Splice site	-	III
41.	VN843012	COL1A2	c.2791G>GA	Exon 43	Missense	p.Gly931Arg	IV
42.	VN854012	COL1A2	c.838G>GT	Exon 17	Missense	p.Gly280Cys	IV
43.	VN863012	COL1A1	c.977G>AG	Exon 15	Missense SIFT 0.0	p.Gly326Asp	I
44.	VN874012	COL1A2	c.2791G>GA	Exon 43	Missense	p.Gly931Arg	IV
45.	VN883012	COL1A1	c.2005G>GA	Exon 30	Missense	p.Ala669Thr	IV
					SIFT 0.13		
46.	VN893012	COL1A1	c.2005G>GA	Exon 30	Missense	p.Ala669Thr	IV
					SIFT 0.13		
47.	VN913012	COL1A1	c.1299+1G>C	Intron 19	Splice site	-	IV
48.	VN924012	COL1A1	c.2299G>GA	Exon 33/34	Missense SIFT 0.0	p.Gly767Ser	III
49.	VN954012	COL1A1	c.590G>GA	Exon 8	Missense SIFT 0.0	p.Gly197Asp	I
50.	VN964012	COL1A2	c.892G>GT	Exon 18	Missense	p.Gly298Cys	III
51.	VN974012	COL1A2	c.2538G>GT	Exon 40	Missense	p.Lys846Asp	I
52.	VN994012	COL1A1	c.103+2T>TC	Intron 1	Splice site	-	I
53.	VN1043012	COL1A1	c.3369+1G>GC	Intron 46	Splice site	-	I
54.	VN1063012	COL1A1	c.1350G>GC	Exon 20	Missense SIFT 0.0	p.Glu450Asp	III

Lisa 4. DNA eraldamine verest protokoll

- Valati veri 50 ml tuubi. Kui veri oli külmunud lasti sel sulada toatemperatuurini 18-25°C.
- Lisati lüüsipuhver A kuni 15 ml. Raputati tuubi hoolega ja jäeti see jääle 30 minutiks.
- Tsentrifugeeriti 4700 RPM 15 minutit +4°C.
- Ettevaatlikult kallati ära supernatant ja lisati Lüüsi puhver A 20 ml. Segati hoolega.
- Tsentrifugeeriti 4700 RPM juures 15 minutit +4°C
- Eemaldati supernatant ettevaatlikult. Lisati 3 ml TKM1 puhvrit ja sega vortexiga.
- Lisati 250 µl Triton-X(25%) ja segati vortexiga.
- Jäeti üleöö -20 °C
- Sulatati segu aeglaselt toatemperatuuril.
- Tsentrifugeeriti 4700 RPM 15 minutit +4 °C juures.
- Ettevaatlikult kallati ära supernatant, lisati 4 ml TKM2, segati vortexiga ja lisati 200 µl 10% SDS. Segati põhjalikult vortexiga.
- Asetati tuubid veevanni +56 °C juures 20 minutiks.
- Lisati kiirelt 1 ml 5M NaCl. Segati koheselt vortexiga 30 sekundit.
- Tsentrifugeeriti 4700 RPM 15 minutit +4 °C juures.
- Valati supernatant uude 50 ml tuubi. Välditi sademe kaasa valamist. Visati tuub koos sademega minema. Lisati isopropanool (hoia 4 °C) kuni 15 ml. Segati õrnalt, kuni DNA niidi ilmumiseni. See püüti kinni Pasteuri pipetiga.
- Pesti DNA 1ml 70% etanooliga. Jäeti see õhu kätte kuivama (2-3 minutiks).
- Võeti 1,5 ml tuub, märgista need ja lisa neisse 500 µl TE puhver. Pandi DNA tuubidesse, et see seal lahustuks.
- Eemaldati Pasteuri pipetid kui DNA oli eemaldatud.
- Asetati tuubid termaalblokki 37°C 10 minutit.
- Jäeti DNA proovid üleöö +4°C
- Mõõdeti Nanodropiga proovide kontsentratsioon.
- Säilitati DNA proovid -20°C või -80°C(pikemaks säilitamiseks).

Lisa 5. PCR programm amplifikatsiooni reaktsioonil

1=95,0°; 15:00 min

2=95,0°; 0:25 min

3=64,0°; 0:30 min

4=72,0°; 0:40 min

5=mine 2 etappi, 4 korda

6=95,0°; 0:25 min

7=62,0°; 0:30 min

8=72,0°; 0:40 min

9=mine 6 etappi, 30 korda

10=72,0°; 5:00 min

11=6,0° igavesti

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Ivo Kändla
(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: 30.06.1986)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Eesti ja Vietnami *Osteogenesis Imperfecta* patsientide *COL1A1* ja *COL1A2* geenide mutatsioonianalüüs

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Lidiia Zhytnik,
(*juhendaja nimi*)

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, 27.05.2016 (*kuupäev*)