

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Liina Pappa

**Eksoomide sekveneerimine kahel
unilateraalse neeru hüpoplaasiaga patsiendil**

Magistritöö

Juhendajad Tiit Nikopensius, PhD

Lili Milani, PhD

Sisukord

Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1. Kaasasündinud neeru ja kuseteede anomaaliad (CAKUT).....	5
1.1.1. Neeru agenees ja teised neeru hüpoplaasia defektid	6
1.1.2. Neeru hüpoplaasia	7
1.1.3. Tsüstilised neeruhaigused	7
1.1.4. Polütsüstiline neeruhaigus	7
1.1.5. Nefronoftiis.....	9
1.1.6. NPHP geenid	10
1.2. Eksoomi sekveneerimine	12
1.2.1. Eksoomi sekveneerimine tuumiklaboris.....	13
1.2.2. Eksoomi järjestuste analüüs	14
2. Eksperimentaalosa	17
2.1. Töö hüpotees ja eesmärk.....	17
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Valim.....	17
2.2.2. Eksoomi analüüs.....	18
2.2.3. Sangeri sekveneerimine	19
2.3. Tulemused.....	20
2.3.1. Patsient II-2	20
2.3.2. Patsient III-3	22
2.4. Arutelu	25
2.4.1. Patsient II-2	25
2.4.2. Patsient III-3	28
Kokkuvõte	32
Exome sequencing in two patients with unilateral renal hypoplasia.....	34
Summary.....	34
Tänuõnad.....	36
Kasutatud kirjandus	37
Kasutatud veebiaadressid	44
Lisad	45

Kasutatud lühendid

AD-PKD	Autosomaal-dominantne polütsüstiline neeruhaigus (<i>Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease</i>)
AR-PKD	Autosomaal-retsessiivne polütsüstiline neeruhaigus (<i>Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease</i>)
CAKUT	Kaasasündinud neeru ja kuseteede anomaaliad (<i>Congenital Anomalities of Kidney and Urinary Tract</i>)
CHF	kaasasündinud maksafibroos (<i>congenital hepatic fibrosis</i>)
EGV	Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu
ESRD	lõpp-staadiumi neeruhaigus (<i>end-stage renal disease</i>)
EVS	<i>Exome Variant Server</i>
GERP	<i>The Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>
GWAS	ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (<i>Genome-wide association study</i>)
ICD-10-CM	<i>International Classification of Diseases, Tenth Revision, Clinical Modification</i>
Mbp	miljon aluspaari (<i>Mega base pair</i>)
miRNA	mikro-RNA (<i>microRNA</i>)
NGS	teise põlvkonna sekveneerimine (<i>Next-generation sequencing</i>)
NHLBI-ESP	<i>National Heart, Lung and Blood Institute Exome Sequencing Project</i>
NPHP	nefronoftiis
PKD	Polütsüstiline neeruhaigus (<i>Polycystic Kidney Disease</i>)
UTR	mittetransleeriv ala (<i>Untranslated region</i>)
WES	eksoomi sekveneerimine (<i>Whole-exome sequencing</i>)
WGS	kogu genoomi sekveneerimine (<i>Whole-genome sequencing</i>)

Sissejuhatus

Kaasasündinud neeru ja kuseteede anomaaliad (CAKUT) on üheks peamiseks surma põhjuseks laste seas, esinedes üldpopulatsioonis sagedusega 3-6/1.000 sünnist. CAKUT haigusrühma kuuluvad mitmed erineva fenotüübilise avaldumise spektriga neeruteede väärarengud, mis hõlmavad neere, uriini kogumissüsteeme, kusepõit või kuseteid. Kõikidest CAKUT-seoselistest anomaaliatest moodustavad enamuse neeru agenees/hüpoplaasia ja düsplaasia. Sageli esinevad erinevad kuseteedega seotud haigused patsientidel korraga, mis muudab haiguse kliinilise diagnoosimise ja geneetilise tausta määramise keerulisemaks. Kõigil CAKUT rühma kuuluvatel väärarengutel on sarnane tekkemuster, kus mutatsioonid neeru arengus osalevates geenides on kausaalselt seotud CAKUT erinevate vormidega. Peamiseks CAKUT tekkepõhjuseks on anatoomiliselt neerude arengus toimunud muutused, mis põhjustavad erinevaid neerude väärarenguid. Kuigi paljud erinevate CAKUT vormide tekkel osalevad geenidefektid on tänaseks teada, pole kõiki haigust põhjustavaid geene ja geenivariante veel leitud.

Siiani on CAKUT fenotüübi alla kuuluvate haiguste uurimisel ja geneetilise tausta määramisel kasutatud mudelorganismidest saadud neerude arengus osalevate geenide info põhjal kandidaatgeenide ja eksoomide sekveneerimist. Peamiselt on kasutatud uute haiguspõhjuslike geenide leidmiseks siiski hiirt kui mudelorganismi. Praeguseks on teadlased jõudnud ühele meelele, et 85% kõigist haigusi põhjustavatest mutatsioonidest asuvad DNA kodeerivates ja regulatoorsetes järjestustes. Selletõttu hakati kasutama eksoomi sekveneerimist väga haruldasi mendeliaarseid haigusi põhjustavate geenide avastamisel. Eksoomide sekveneerimist kasutatakse käesoleval ajal aina rohkem just kõrge lookuse heterogeensusega mendeliaarsete haiguste puhul, kus esineb laialdane suuremalt jaolt kattuvate sümptomitega fenotüübiline varieeruvus. Eksoomide sekveneerimine kui hüpoteesivaba eksonivariantide uuringudisain lihtsustab oluliselt pärilike haiguste diagnoosimist ning muudab analüüsiprotsessi paljudel juhtudel kiiremaks ja kuluefektiivsemaks võrreldes esimese põlvkonna sekveneerimismeetodite kasutamisega.

Käesolevas töös kasutati eksoomi sekveneerimist, et hinnata täpsemalt haiguse geneetilist tausta kahel unilateraalse hüpoplaasia diagnoosiga eestlasest patsiendil, leida tõenäoliselt haigust põhjustavad geenivariandid ning võimalusel täpsustada juba eelnevalt määratud diagnoose.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Kaasasündinud neeru ja kuseteede anomaaliad (CAKUT)

Kaasasündinud neeru ja kuseteede anomaaliad (CAKUT) on üheks peamiseks surma põhjuseks laste seas, esinedes 3-6 juhul 1.000 sünnist (Yosypiv, 2012). CAKUT hõlmab endas mitmeid fenotüübilt erinevaid kuseteedega seotud haigusi, mis tihti esinevad patsientidel korraga. CAKUT haigusgrupi alla kuuluvad mitmed erineva spektriga neeruteede väärarengud, mis hõlmavad neere, uriini kogumissüsteeme, kusepõit või kuseteid (Song ja Yosypiv, 2010). See muudab haiguse kliinilise diagnoosimise ja geneetilise tausta määramise keeruliseks.

ICD-10-CM (<http://www.icd10data.com/>) andmete kohaselt jaotatakse kaasasündinud kuseteede väärarengute (ICD-10 koodid Q60-Q64) haigusgrupi hulka kuuluvad haigused järgnevalt:

- Q60 Neeru agenees ja teised neeru hüpoplaasia defektid (*Renal agenesis and other reduction defects of kidney*)
- Q61 Tsüstilised neeruhaigused (*Cystic kidney disease*)
- Q62 Kaasasündinud obstruktiivsed neeruvaagna defektid ja kaasasündinud ureetra arenguhäired (*Congenital obstructive defects of renal pelvis and congenital malformations of ureter*)
- Q63 Teised kaasasündinud neeru väärarengud (*Other congenital malformations of kidney*)
- Q64 Teised kaasasündinud kuseteede väärarengud (*Other congenital malformations of urinary system*)

Kõikidest nimetatud anomaaliatest moodustavad enamuse neeru agenees/hüpoplaasia ja düsplaasia (Sanna-Cherchi jt., 2007). Kõigil CAKUT-seoselistel väärarengutel on sarnane tekkemuster, mida iseloomustavad mittetäielik penetrantsus (*incomplete penetrance*) ja varieeruvused geeniekspressiooni tasemes. Mainitud faktorid põhjustavad morfogeneesi käigus muutusi ka neerude anatoomias, kutsudes sellega esile erinevaid neerude väärarenguid (Hahn, 2010; Hildebrandt, 2010). Kuigi paljud erinevate CAKUT vormide tekkel osalevad geenidefektid on tänaseni teada, pole kõiki haigust põhjustavaid genee veel määratud (Saisawat, 2012). CAKUT-l võib olla autosomaal-dominantne, autosomaal-retsessiivne või X-liiteline pärandumismuster (Ashraf jt., 2010).

CAKUT-seoselised fenotüübid võivad esineda ka koos teiste organite kaasasündinud hälvetega, kuid siiski on enamus CAKUT juhtumeid mittesündroomsed. Eksperimentidest loom-mudelitega on leitud tõendusid seostest neerude arengus osalevate geenide (nt *GDNF*, *RET* ja *SPRY*) ja CAKUT tekkega (Renkema jt., 2011; Chatterjee jt., 2012). Paljud kirjeldatud kandidaatgeenidest on leitud *knock-out* hiiri või rotte kasutades (nt *FRAS1*, *FREM2*, *GRIP1* jt.) ning seega võib arvata, et mittesündroomset CAKUT-d põhjustavad defektid üksikutes geenides (Stanković jt., 2010; Kohl jt., 2014; Yosypiv, 2012).

Inimestel esineva CAKUT tekkel on aga lisaks geenidefektidele olulised ka kodeeritavate valkude tasemed. Ekspressiooniuringutega on täheldatud seost haiguse tekke ja CAKUT patogeneesis osalevate geenide kodeerivate valkude ebatavalise tasemega ja/või vale tsütoplasmaatilise lokalisatsiooni vahel (Renkema jt., 2011).

Uuringud, mis hõlmavad samas perekonnas esinevate mitmete erinevate CAKUT fenotüüpidega patsiente, kinnitavad fakti, et ühes perekonnas esinev mittesündroomne CAKUT fenotüüp on geneetiliselt pärandatav ning kindlad geenimutatsioonid võivad potentsiaalselt viia haiguse tekkeni, kuigi lõplik fenotüübi avaldumine sõltub nii geneetilise tausta kui ka keskkonnafaktorite koosmõjust (Yosypiv, 2012). Geneetilised manipulatsioonid loom-mudelitega on aidanud identifitseerida geeniperekonnad ja geenide võrgustikud, mis osalevad neerude ja kuseteede normaalses arengus. Praeguseks on mittesündroomse CAKUT põhjuslike geenide leidmiseks kasutusel veel lisaks kolm erinevat meetodit: ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (GWAS), eksoomi sekveneerimine (WES) ja teise põlvkonna DNA sekveneerimine (Yosypiv, 2012). Mitmete uuringute tulemuste kokkuvõttena on kirjeldatud 18 nefronoftiisiga seostatavat geeni (Otto jt., 2011). Kõiki seniseid avastusi neerude väärarengute geneetilises taustas võttis kokku ülevaate artikkel, kus kirjeldati ~300 CAKUT tekkel osalevat geeni (Chatterjee jt., 2012).

1.1.1. Neeru agenees ja teised neeru hüpoplaasia defektid

Neeru agenees tähendab üldises mõttes kaasasündinud neeru puudumist, atroofiat või infantiilset neeru atroofiat (<http://www.icd10data.com/ICD10CM/Codes/Q00-Q99/Q60-Q64/Q60->). Unilateraalset neeru ageneesi (URA, *unilateral renal agenesis*) defineeritakse kui ühepoolset neerukoe puudumist, mis viib ebanormaalse või mittetäieliku embrüonaalse neeru arenguni ja sealt edasi mittefunktsionaalse neeru tekke või neeru aplaasiani (Westland jt., 2013).

1.1.2. Neeru hüpoplaasia

Neeru hüpoplaasia mõistet kasutatakse normaalse morfoloogia ja vähenenud nefroste arvuga ebanormaalselt väikeste neerude puhul. Sageli kasutatakse antud terminit valesti. Seda põhjusel, et enamikel neeru hüpoplaasia juhtudel esineb patsientidel ka ebanormaalselt diferentseerunud kude, mida defineeritakse neeru düsplaasiana. Vale diagnoosimine tuleneb eelkõige mitteinvasiivsete meetodite kasutamisest, mis ei ole diagnoosimiseks piisavalt täpsed (Cain jt., 2010).

1.1.3. Tsüstilised neeruhaigused

Tsüstilised neeruhaigused on lõpp-staadiumi neeruhaiguste (ESRD, *end-stage renal disease*) tekkel kõige sagedasemaks põhjuseks. Tsüstiliste neeruhaigustega patsientidel avalduvad kiiresti arenevad tsüstid nefronites ja kogumisjuhades. Arenevaid neeru tsüstide haigusi iseloomustab kõrge geneetiline heterogeensus, seega on tsüstiliste neeruhaiguste hulka kuuluvate haiguste loetelu mitmekesine (Joonis 1). Päritavate tsüstiliste neeruhaiguste hulka kuuluvad polütsüstiline neeruhaigus, glomerulotsüstiline neeruhaigus (*glomerulocystic kidney disease*) ja nefronoftiis on nimetatud haigusgrupist kõige sagedamini esinevad haigused (Bergmann, 2014).

1.1.4. Polütsüstiline neeruhaigus

Enamuse tsüstilistest neeruhaigustest moodustab polütsüstiline neeruhaigus (*Polycystic Kidney Disease*, PKD), mida esineb üldpopulatsioonis ühel sünnil 500st. PKD puhul moodustuvad tsüstid igas nefroni osas. See põhjustab neerude üldist suurenemist ja umbes 50% patsientidest ESRD-d. Mendeliaarsete pärandumismustritega ühe geeni poolt põhjustatud polütsüstiliste neeruhaiguste vormide hulka kuuluvad peamiselt polütsüstilise neeruhaiguse autosomaalne dominantne (AD-PKD) ja retsessiivne (AR-PKD) vorm. Siiani pole ükski uuring kinnitanud PKD X-liitelist pärandumist (Halvorson jt., 2010; Lancaster ja Gleeson, 2010; Pooler, 2009; Bergmann, 2014).

AD-PKD eeldatav esinemissagedus on 1:500-1:1.000 elussünni kohta (Bergmann, 2014). Seniste uuringute kohaselt seostatakse AD-PKD teket mutatsioonidega kahes erinevas sama geeniperekonna geenis: *PKD1* ja *PKD2* (Bergmann, 2014). Kuigi autosomaal-dominantne polütsüstiline neeruhaigus avaldub tavaliselt täiskasvanutel, on täheldatud juhtumeid, kus haigus on avaldunud ka looteeas. Selliste juhtumite puhul on edasise ravi kavandamiseks ja läbiviimiseks väga oluline õigeaegne molekulaarne diagnoosimine (Dakshinamurty, 2012).

Autosomaal-retsessiivse polütsüstilise neeruhaiguse esinemissagedus on hinnanguliselt 1:10.000 - 1:40.000 elussünni kohta (Sweeney Jr ja Avner, 2014). Autosomaal-retsessiivne polütsüstiline neeruhaigus avaldub tavaliselt imikueas, kuid sellel on täheldatud ka lapsepõlve ja noorukiea vorme, mille haigusfenotüüp ei ole nii tõsine (Al-Bhalal ja Akhtar, 2008). Nagu eelnevalt mainitud, on AR-PKD fenotüübilise avaldumise raskusaste seotud vanusega haiguse avaldumise hetkel. Raskekujulise AR-PKD puhul on ligi 40% juhtumitest võimalik ultraheli uuringutega haigust määrata juba raseduse ajal (Denamur jt., 2010). Inimestel on AR-PKD erinevad fenotüübid peamiselt kombineeritud kahepoolsest neeru tsüstilisest haigusest ja kaasasündinud maksa fibroosist (Denamur jt., 2010). Samas võivad AR-PKD kui laiaspektrilise fenotüübi sümptomite hulka kuuluda veel suurenenud ja tsüstilised neerud, mis 30% juhtudest põhjustavad neonataalset surma. Teistel juhtudel kujuneb patsientidel välja ESRD, mis võib vale ravi korral lõppeda surmaga (Elsharif, 2011, Sharp jt., 2005).

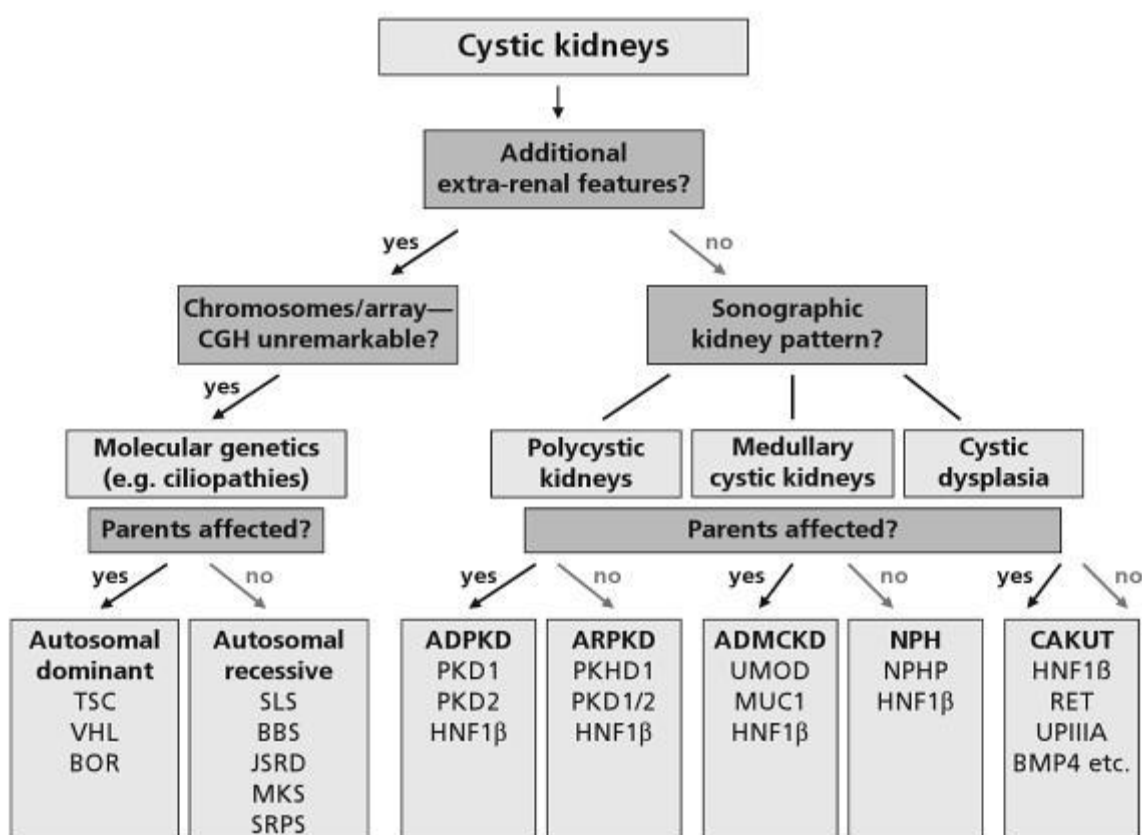
1.1.4.1. PKHD1

Erinevalt AD-PKD-st, kus haiguse tekkel osalevad kaks - kas *PKD1* või *PKD2* - geeni, on klassikalise AR-PKD tüüpilised juhtumid teadaolevalt seostatavad ühe - *PKHD1* - geeniga. *PKHD1* geeni suuruse ja alternatiivse splaissingu tõttu on AR-PKD molekulaarne diagnostika siiski töömahukas ja aeganõudev (Zhang jt., 2012). Rohkearvuliste geeni transkriptide ja fenokoopiate esinemise tõttu peaks ka üksikutesse heterosügootsetesse mutatsioonidesse suhtuma tähelepanulikkusega, kui tegemist on haruldase variandiga (Bergmann, 2014).

Polütsüstilise neeruhaiguse hiir- ja rotimudelid on inimese AR-PKD ortoloogid. Nende mudelite geneetilise analüüsi abil on suudetud täpselt kaardistada ja identifitseerida inimese *PKHD1* geen (Al-Bhalal ja Akhtar, 2008). Katsetest hiire mudeliga on teada, et *Pkhd1*-/- hiirtel tekib täiskasvanuna lisaks sidekoe vohamisele ja nekroosile veel leebe kuni tõsine neerutorukeste laienemine või tsüstide teke neerudes ja maksas (Kim jt., 2008).

PKHD1 geen hõlmab 470 kb suuruse ala inimese 6. kromosoomi pikas õlas (6p12) (<http://www.humgen.rwth-aachen.de>). Geenilt kodeeritakse mitmeid alternatiivse splaissingu tulemusel saadud transkripte. *PKHD1* pikim lugemisraam koosneb 66 eksonist ja kodeerib 4074-st aminohappest koosnevat polüduktiin/fibrotsüstiin (*polyductin/fibrocystin*) valku, mis kuulub tüüp 1 ühekordselt membraani läbivate (*single-pass*) transmembraansete valkude hulka. Valku isovorme ekspresseeritakse plasmamembraanis, primaarsetes ripsmetes (*primary cilium*) ja tsütoplasmas (Bergmann, 2014; Menezes jt., 2004).

Aachen Ülikooli andmebaasi järgi on *PKHD1* geeni eksonites üle 500 erineva mutatsiooni (<http://www.humgen.rwth-aachen.de>), millest 311 on mittesünonüümsed, 56 stopp-koodoni mutatsioonid, 88 raaminihke mutatsioonid ja 56 vaigistatud (*silent*) mutatsioonid. Enamus sealkirjeldatud mutatsioonidest esinevad liitheterosügootse kandlusega ning paiknevad ühtlaselt üle geeni (Zhang jt., 2012). Patsientidel, kellel on geenis kaks kärpivat (*truncating*) mutatsiooni (stopp-koodoni, raaminihke ja splaissingusaidi mutatsioonid), kujuneb välja haiguse raskekujuline fenotüüp, mis lõpeb enamasti peri- või neonataalse surmaga. Neonataalse perioodi üle elanud patsiendid kannavad tavaliselt vähemalt ühte mittesünonüümset mutatsiooni, mis levendab haiguse fenotüüpi (Denamur jt., 2010; Bergmann, 2014).



Joonis 1. Tsüstiliste neeruhaiguste jaotus ja nende patogeneesis osalevad geenid (Kenny ja Beales, 2013).

1.1.5. Nefronoftiis

Nefronoftiis (*Nephronophthisis*, NPHP) on autosomaal-retsessiivne tsüstiline neeruhaigus, mida kirjeldab krooniline tubulointerstitsiaalne nefriit (*tubulointerstitial nephritis*) ning mis kuulub ICD10-CM järgi käsn-neerudega medullaarsete tsüstiliste neerude hulka (Q61.5) (Wolf ja Hildebrandt, 2011; Salomon jt., 2009; <http://www.icd10data.com/>). NPHP on kõige sagedasemaks lõpp-staadiumi neeruhaiguste põhjustajaks, mis esineb enamikel juhtudel koos

mitmete teiste haigustega. Seega võib õigeaegsete uuringuteta ja diagnoosimiseta haigus märkamatuks jääda või süveneda. Avaldumise eajärgi jaotatakse nefronoftiis kolmeks: infantiilne (haigus kujuneb välja enne 5. eluaastat), juveniilne (haiguse esinemine teisel aastakümnel) ja noorukiea nefronoftiis. Nendest kolmest esineb lastel kõige sagedamini juveniilset vormi, mille korral on neerud morfoloogiliselt vähenenud või normaalse suurusega ja histoloogilise kirjelduse põhjal on neerudes interstitsiaalne fibroos (*interstitial fibrosis*) ja neerutorukeste atroofia koos alusmembraani morfoloogiliste defektidega (Tory jt., 2009). Tsüstid arenevad haiguse hilisemas staadiumis, tavaliselt kortikomedullaarses liitekohas. Haiguse juveniilse vormi korral algavad uriini kontsentreerumise häired esimese kümne eluaasta jooksul, pärast mida hakkavad haiguse sümptomid süvenema (Salomon jt., 2009).

Infantiilset nefronoftiisi iseloomustavad kortikaalsed mikrotsüstid. Samuti kujuneb haiguse lõplik avaldumisvorm välja enne viiendat eluaastat. Mõningatel infantiilse nefronoftiisiga lastel on lisaks täheldatud neeruväliseid sümptomeid, mille hulka kuuluvad näiteks vaimne alaareng, tserebellaarne ataksia (*cerebellar ataxia*), luukoe anomaaliad või maksa fibroos. Tänu erinevatele geneetilistele uuringutele, sealhulgas kandidaatgeenide uuringutele, on nefronoftiisi puhul tuvastatud 12 haiguse tekkel osalevat ja seda ilmselt põhjustavat geeni (*NPHP1-11*, *NPHP1L*) (Roslyn, jt., 2008; Salomon jt., 2009; Wolf ja Hildebrandt, 2011). Kuna viimase 10 aastaga on leitud mitmeid NPHP tekkel osalevaid gene ja kirjeldatud nendes olevaid mutatsioone, on paranenud ka üldine arusaam ja teadmised nefronoftiisi patoloogiast ja selle bioloogilistest taustamehhanismidest (Wolf ja Hildebrandt, 2011).

1.1.6. NPHP geenid

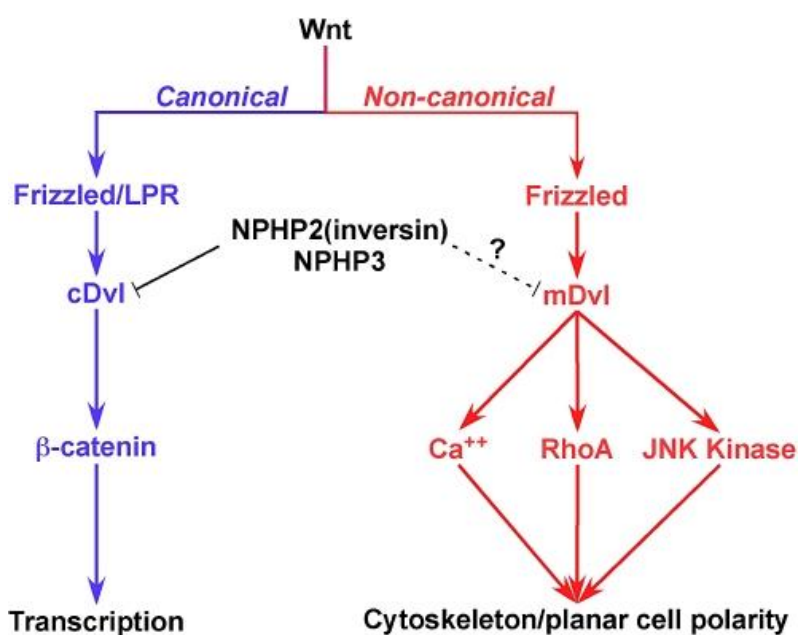
Nagu eelnevalt mainitud, põhjustavad nefronoftiisi erinevaid vorme mutatsioonid 12 NPHP-ga seotud geenis (*NPHP1-11*, *NPHP1L*) (Wolf ja Hildebrandt, 2011). *NPHP* geeniproductide puudumine põhjustab raku ripsmete arengus erinevaid defekte (*ciliogenesis*). Selle näiteks võib tuua patsiendid, kellel on mutatsioonid *NPHP1* geenis, mis põhjustavad näiliselt normaalsete ripsmetega rakkude korral patsientidel siiski hingamisprobleeme. Hiirtel, kellel on *NPHP2* geenis mutatsioonid, sünnivad normaalse ripsepiteeliga, kuid neil areneb ebanormaalse liikumatute ripsepiteeli rakkude polarisatsiooni tulemusena välja *situs inversus*. *NPHP3* geeni *knock-out* hiirtel esinevad pikenenud ripsmes (*cilia*) (Mergen jt., 2013).

1.1.6.1. NPHP2

INVS (*NPHP2*) geenilt kodeeritakse valku inversiini. Kodeeriv valk võib funktsioneerida neerutorukeste arengus ja funktsioonis ning vasak-parem telje (*left-right axis*) määramises. Teadaolevalt interakteerub inversiin ka nefrotsüstiiniga. Mutatsioone *INVS* geenis on seostatud tüüp 2 nefronoftiisiga (RefSeq; Pruitt jt., 2014).

1.1.6.2. NPHP3

NPHP3 geenilt kodeeritakse valku nefrotsüstiin-3. Nefrotsüstiin-3 peamine funktsioon on osalemine neerutorukeste arengus ning funktsionaalsel tasandil võib nefrotsüstiin-3 inversiiniga seondudes inhibeerida kanoonilist Wnt signaalirada (Joonis 2) (Bissler jt., 2010; Bergmann jt., 2008; RefSeq; Pruitt jt., 2014). Mutatsioonid *NPHP3* geenis on seotud nefronoftiis tüüp 3, neeru-maksa-pankrease düsplaasia ja Meckeli sündroomi 7. tüübiga (RefSeq; Pruitt jt., 2014).



Joonis 2. Wnt signaalirajad. Näidatud on, kuidas *INVS* (*NPHP2*) ja *NPHP3* seda mõjutavad (Bissler jt., 2010).

Juba varasemast on teada, et nefrotsüstiin-3 valgu funktsiooni puudumine võib põhjustada embrüonaalset suuremist, Meckel-Gruber sarnast sündroomi, *situs inversus*'t ja neeru-maksa-pankrease düsplaasiat. Uuringus, kus püüti hiire ja inimese nefrotsüstiin-3 valke võrreldes *NPHP3/Nphp3* geenide laia fenotüübilist spektrit kaardistada, leiti, et *pcy* mutatsiooniga

hiirtel tekkis hüpomorfne *Nphp3* alleel, mis põhjustas tsüstilise neeruhaiguse fenotüüpi. Sarnaselt eelnevale avastusele täheldati ka täieliku *Nphp3* geeni funktsiooni kadumise mõju embrüonaalsele arengule, põhjustades hiirtel embrüonaalset surma, *situs inversus*'t ja kaasasündinud südamehäireid. Inimeses mõjutab *NPHP3* geeni funktsiooni puudumine samuti embrüonaalset arengut. *NPHP3* geeni mutatsioonid võivad põhjustada laiaulatuslikke embrüonaalse mustriga haigusi, sealhulgas *situs inversus*'t, polüdaktüüliat (lisaõrmede ja – varvaste esinemine), kesknärvisüsteemi väärarenguid, struktuurseid südamehäireid ja erinevaid CAKUT endofenotüüpe (Bergmann jt., 2008).

1.2. Eksoomi sekveneerimine

Ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute abil on kindlaks tehtud, et eksonites ja intronites asetsevad populatsioonis sagedased (*common*) geneetilised variandid seletavad lahti vaid väikese osa multifaktoriaalsete haiguste pärilikkusest. Seega võib arvata, et suurema osa haruldaste pärilike haiguste seniteadmata tekkepõhjusteks on haruldased genoomi järjestuse variandid (Ng jt., 2009). Erinevalt Sanger sekveneerimisest, on praegu kasutusel olevate teise põlvkonna sekveneerimisplatvormidega (NGS) võimalik teostada massilist paralleelset sekveneerimist. See vähendab oluliselt sekveneerimiskulusid ja suurendab protsessi tõhusust.

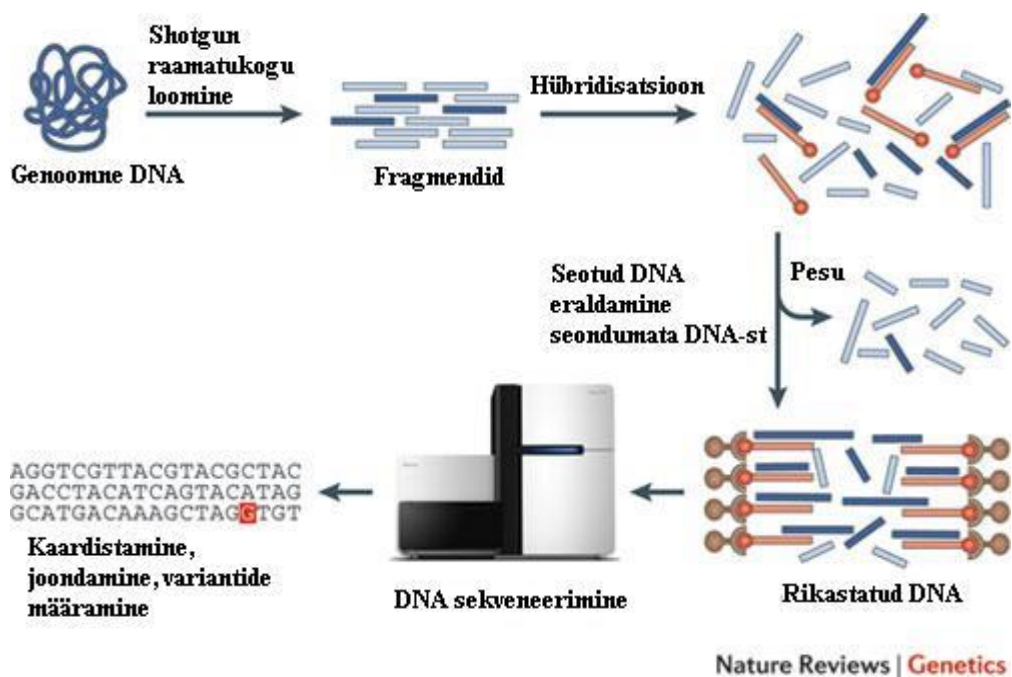
Kuigi inimese täisgenoomi sekveneerimine on viimase 5 aastaga märkimisväärselt odavamaks muutunud, kasutatakse haruldaste pärilike haiguste diagnoosimiseks ja haigust põhjustavate geenivariantide leidmiseks kõige sagedamini eksoomi sekveneerimist (Coffey jt., 2011). Kuigi kodeerivad järjestused moodustavad genoomist vaid 1%, paiknevad hinnanguliselt 85% mendeliaarsete haiguste tekkel osalevatest mutatsioonidest genoomi kodeerivates piirkondades (Barba jt., 2014). Terve eksoomi, mille moodustavad valku kodeerivad piirkonnad ehk eksonid, sekveneerimist (WES) kasutatakse edukalt keeruliste haiguste haiguspõhjuslike geenide määramisel ka siis, kui on puudulik informatsioon perekondlikust haigusloost (Ng jt., 2009; Meynert jt., 2013; Rabbani jt., 2014). Pärilike haiguste suuri haigusrühmi (nt ektodermaalsed düsplaasiad), mida iseloomustab fenotüübiliselt ulatuslik sümptomite kattuvus, on keeruline diagnoosida ja muud diagnostilised testid on sageli kallid ja aeganõudvad. Seetõttu kasutatakse taoliste juhtumite puhul eksoomi sekveneerimist, mis on kandidaatgeenide ja -variantide leidmist lihtsustanud (Rabbani jt., 2014).

Enne WES meetodi kasutuselevõttu kasutati mendeliaarsete haiguste kandidaatgeenide leidmiseks Sanger sekveneerimist. See oli võimalik tänu sarnasustele loom-mudelitest leitud

geenide ja inimese geenide vahel. Antud sarnasuste alusel oli võimalik määrata geenide asukohti ja ennustada nendelt transleeritavate valkude funktsiooni (Rabbani jt., 2014). Pärast eksoomi sekveneerimise kasutuselevõttu, on aina rohkem identifitseeritud haiguspõhjuslikke variante. Praeguseks on mendeliaarsetel haigustel identifitseeritud enam kui 100 põhjuslikku geeni (Rabbani jt., 2012).

1.2.1. Eksoomi sekveneerimine tuumiklaboris

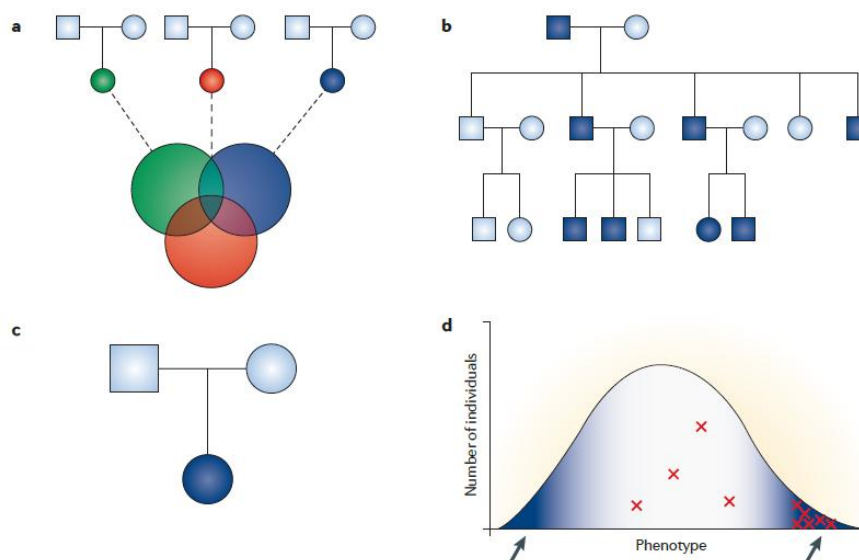
Enne eksoomi sekveneerimist tuleb rikastada DNA kodeerivad alad ülejäänud geneetilisest materjalist (Ng jt., 2009). Lühidalt algab eksoomi sekveneerimine genoomse DNA fragmenteerimisega, mille tulemusel saadakse *in vitro shotgun* raamatukogu. Raamatukogu fragmentidele liigendatakse adapterid. Illumina TruSeq Exome Enrichment Kit katab lisaks eksoomi järjestusele ka eksonitele külgnevaid mittekodeerivaid DNA järjestusi (promooterid, 3' ja 5' UTR-d, miRNA –de seondumissaidid jne.). Regulaatorsete järjestuste uurimine aitab leida variante, mis mõjutavad geeni funktsiooni (näiteks *enhancer*-järjestused) ja seda kuluefektiivsemalt kui WGS meetod (www.Illumina.com). Adapterite lisamisele järgneb eksoomi rikastamine hübridisatsiooniks eksonitele komplementaarsete biotiiniga märgistatud oligonukleotiididega. 300 – 400 bp suurused DNA fragmendid amplifitseeritakse ja hübridiseeritakse, pärast mida teostatakse massiline paralleelne sekveneerimine (Joonis 3).



Joonis 3. Eksoomi sekveneerimise põhimõte (Bamshad jt., 2011, modifitseeritud).

1.2.2. Eksoomi järjestuste analüüs

Saadud *read*'id kaardistatakse inimgenoomi referentsjärjestusele. Andmete kvaliteedikontrolli ja variantide klassifitseerimise järgselt saadud annotatsioonifailidest püütakse prioritseerimisega leida võimalikud haigusseoselised variandid (Joonis 3) (Danielsson jt., 2014; Bamshad jt., 2011). Valepositiivsete variantide eemaldamiseks filtreeritakse variandid mitmete erinevate kriteeriumite põhjal (intronis asetsemine, veebipõhiste programmide skoorid, sünonüümsed muutused jms.). Selle tulemusena väheneb kandidaatvariantide arv kuni 95% ja alles jääb 150-500 geenivarianti, mis on potentsiaalselt patogeensed. Eksoomi sekveneerimisel kasutatakse lisaks traditsioonilistele asukoha kaardistamismeetoditele ka teisi strateegiaid. Kõige sagedamini kasutatakse kõigist eksoomi sekveneerimise strateegiatest nelja: aheldusstrateegiat, *double-hit* strateegiat, *overlap* strateegiat ja *de novo* strateegiat (joonis 4) (Gilissen jt., 2012).



Joonis 4. Kõige sagedamini kasutatavad eksoomi sekveneerimise strateegiad. (a) mittersuguluses olevate patsientide sekveneerimine. (b) ühe suguvõsasiseselt mitme patsiendi sekveneerimine. (c) vanem-laps triode sekveneerimine. (d) fenotüübi jaotuse äärmuste võrdlemine (äärmused märgitud nooltega, punased ristid märgivad patsientide fenotüüpe) (Bamshad jt., 2011).

1.2.2.1. *Overlap* strateegia

Proovide lookusheterogeensuse puudumisel on võimalik uurida mitmeid sarnase fenotüübiga mittersuguluses olevaid patsiente ning otsida neil võimalusel rekurrentseid kattuvaid mutatsioone üksikutest kattuvatest geenidest (Joonis 4, (a)). Suurema patsientide valimi korral väheneb oluliselt ka valepositiivsete geenileidude hulk, milles on mutatsioonid. Prioritseerimise tulemusena jäävad alles vaid suurema tõenäosusega haigust põhjustavad

kandidaatgeenid (Gilissen jt., 2012; Bamshad jt., 2011). *Overlap* strateegia abil on siiani identifitseeritud näiteks Schinzel-Giedion sündroomi tekkepõhjused (Rabbani jt., 2012). Saitsu jt. kasutas eksoomi sekveneerimist kolmel mittediagnostilises oleval kaasasündinud hüpomüelinatsiooniga leukoentsefalopaatiaga indiviidil ning leidis *overlap* strateegiat kasutades mutatsioonide liitheterosügootse kandluse (Saitsu jt., 2011).

1.2.2.2. Aheldusstrateegia

Aheldusstrateegiat kasutatakse perekondades, kus uuritav haigus on monogeenselt pärandunud. Selleks sekveneeritakse haigetel perekonnaliikmetel eksoomid, et määrata neil omavahel jagatud variandid (Joonis 4, (b)). Lisaks sellele on võimalik sekveneerida ka tervete perekonnaliikmete eksoomid. Selle tulemusena välistatakse patsientide unikaalsed mittekahjustavad (*benign*) variandid (Gilissen jt., 2012). *Malpuech–Michels–Mingarelli–Carnevale* sündroomi kahe perekonna uuringus, kus kasutati eksoomi sekveneerimist, leiti *MASPI* geenis olev mutatsioon, mida seostati fenotüübi tekkega (Sirmaci jt., 2010).

Aheldusanalüüsid on informatiivsed mitmele haigust põdevale perekonnaliikmele. Aheldusanalüüsi kasutatakse tavaliselt eksoomi sekveneerimisega koos (Rabbani jt., 2012). Dominantsete häirete puhul on sageli leitud tavalisi heterosügootseid variante. 2011. aastal uuris Rademakers oma meeskonnaga ühes perekonnas leukoentsefalopaatiat ning kasutades aheldusanalüüsi, leidis haigetel 233 kandidaatgeeni 25Mb suuruses sihtmärkreioonis. Eksoomi sekveneerimise tulemusena leiti heterosügootne variant *CSF1R* geenis, mille rekurrentset esinemist on kirjeldatud ka teistes haigusperekondades (Rademakers jt., 2011).

1.2.2.3. De novo strateegia

Eelpool mainitud *overlap* strateegiat saab kasutada vaid haruldaste ühe geeni poolt põhjustatud haiguste korral. Sageli esinevate (*common*) ja geneetiliselt taustalt väga heterogeensete haiguste puhul on vähetõenäoline, et kahel patsiendil leitakse mutatsioonid samas geenis. Seda põhjusel, et genoomne piirkond, kus potentsiaalselt haiguse tekkel osalevad geenid võivad paikneda, on väga lai. Laia piirkonna eeliseks on *de novo* mutatsioonide leidmise tõenäosuse suurenemine. *De novo* mutatsioonide kinnitamiseks sekveneeritakse lisaks patsiendi enda eksoomile ka patsiendi vanematel eksoom (Joonis 4, (c)). *De novo* kandidaatide leidmiseks filtreeritakse välja kõik pärandunud variandid (Gilissen jt., 2012).

Varem on eksoomi sekveneerimist kasutatud perekondades, kus esineb autismi. Sanders jt. leidis sellistes perekondades *de novo* tekkemustriga mutatsioone ajus ekspresseeritavates geenides. Leitud mutatsioone seostati autismi tekkimise riski suurendamisega (Sanders jt., 2012).

1.2.2.4. Double-hit strateegia

Double-hit strateegiat kasutatakse juhul, kui uuringus on võimalik kasutada vaid üksiku patsiendi DNA-d ja esinev haigus on näiliselt retsessiivselt pärandunud (Bamshad jt., 2011). Teiste perekonnaliikmete geneetilise info puudumisel, on võimalik sekveneerida vaid selle üksiku patsiendi eksoom ja välja valida need kandidaatgeenid, milles paiknevad variandid esinevad homosügootsel ja liitheterosügootsel kujul (Gilissen jt., 2012). Juhul kui uuringus on võimalik kasutada vaid ühe retsessiivse haigusega patsienti, otsitakse patsiendil eelkõige homosügootse ja liitheterosügootse kandlusega variante. Gilisseni uurimisgrupi poolt läbiviidud uuringus leiti *double-hit* eksoomi sekveneerimisstrateegia abil Sensenbrenneri sündroomiga patsiendil liitheterosügootse kandlusega mutatsioon *WDR35* geenis (Gilissen jt., 2010).

1.2.2.5. Kandidaadi strateegia

Uuringus, kus on dominantsel kujul esineva haigusega patsient ning patsiendi perekonnaliikmeid ei ole võimalik uuringus kasutada või kui uuringus pole teisi patsiente, on ainukeseks võimaluseks kasutada „kandidaadi strateegiat“. Selle käigus prioritseeritakse kandidaadid erinevate põhimõtete alusel. Üheks võimaluseks oleks vaadata mutatsiooni mõju olulisust valgu funktsiooni ja struktuuri muutmisele (stopp-koodoni, raaminihke ja kanooniliste splaiss-saitide mutatsioonide korral). Mittesünonüümsete mutatsioonide puhul võetakse arvesse ka mutatsiooni ennustatavat mõju valgu struktuurile, milleks kasutatakse veebipõhiste programmide skooride (nt. SIFT, Polyphen-2 jt.). Samuti tuleb arvestada variantalleeli evolutsioonilist konserveerumist (phyloP, GERP skooride abil), kuna teadaolevalt on patogeensete variantidega funktsionaalsed geeni positsioonid kõrgemalt konserveerunud (Gilissen jt., 2012).

2. Eksperimentaalosa

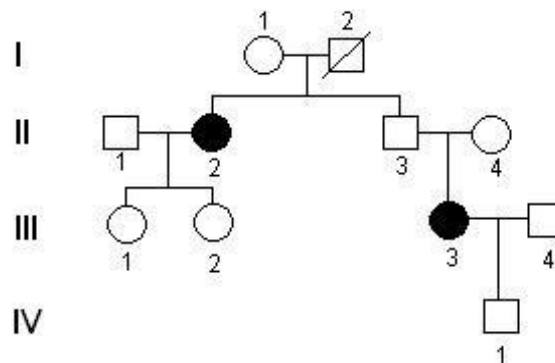
2.1. Töö hüpotees ja eesmärk

Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli analüüsida ühte Eesti perekonda, selgitamaks välja kahel perekonnaliikmel avaldunud näiliselt mendeliaarse pärilikkuse taustaga neeruhaiguste geneetilised põhjused ning samuti täpsustada neile algselt määratud diagnoose.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Valim

Uuringute läbiviimiseks kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu biopangast saadud DNA proove, mis olid kogutud ühe perekonna siseselt. Valimi suuruseks oli 5 indiviidi (I-1, II-2, II-3, II-4, III-3), kellest 4 olid naised ja üks oli mees (Joonis 5). Perekonnast kaks patsienti (II-2 ja III-3) olid diagnoositud ICD-10-CM koodiga Q60.3, mis tähendab unilateraalset neeru hüpoplaasiat.



Joonis 5. Uurimistöös analüüsitud Eesti perekonna sugupuud.

Patsientide raviarsti poolt saadud täpsema haigusloo põhjal algasid patsiendil II-2 probleemid neerudega imikueast raske uroinfektsiooniga ning jätkusid pidevate põletike ja korduvate antibakteriaalse ravi kuuridega. 14-aastasena loobuti parema neeru eemaldamisest, kui neeru funktsioon oli säilinud vaid 10% ulatuses ning oli pideva langustendentsiga. Neeruhädad algasid uuesti pärast teist rasedust ja aasta pärast lapse sünni teostati laparoskoopiline nefrektoomia, mille järel pole rohkem kaebusi esinenud.

Teine patsient (III-3) sündis normaalsest lõpuni kantud rasedusest. Probleemid algasid 3-4 aasta vanuselt. Ultraheliuuringute teostamisel leiti patsiendil vaid üks neer. Teine neer oli

rudimentaarne ning paiknes väikses vaagnas. Histoloogiliselt ei täheldatud midagi pahaloomulist. 7 aasta vanuselt eemaldati operatsiooni käigus hüpoplastiline neer. Täna on terve neeru funktsioonid normaalsed ja probleeme ei esine.

Käesoleva töö raames teostatavate uuringute läbiviimiseks andsid uuritavad geenidoonorid eelnevalt informeeritud nõusoleku ning uuringuteks on olemas Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee kooskõlastus.

2.2.2. Eksoomi analüüs

Uuringu käigus sekveeriti eksoom kahel patsiendil (II-2 ja III-3). Eksperimentaalne osa ja bioinformaatiline analüüs teostati vastavalt varasemates uuringutes kirjeldatud (Nikopentis jt., 2013). Eksoomide rikastamine genoomsest DNA-st toimus Illumina TruSeq™ Exome Enrichment kit'ga vastavalt tootja protokollile Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu tuumiklaboris. Eksoomide sekveerimisel 2×100 bp kasutati Illumina HiSeq2000 sekvenaatorit. Pärast eksoomide sekveerimist joondati järjestused ja annoteeriti variandid EGV *in-house* arendatud skriptidega.

2.2.2.1. Eksoomide andmete prioritseerimine

Eksoomide sekveerimise järel teostati leitud DNA variantidele bioinformaatiline kvaliteedikontroll ja prioritseerimine. Lõpliku kvaliteedikontrolli tulemusel saadud andmetest annotatsioonifailides valiti DNA variantide kandidaadid järgnevate parameetrite alusel:

1. variandi asukoht genoomis (**ekson**, intron, UTR)
2. asenduse tüüp (**mittesünonüümne**, sünonüümne, raaminihe, splaissingu variant jt.)
3. MutationTaster, SIFT, PolyPhen-2 ja Condel veebipõhiste programmide skoorid, mis ennustavad aminohappe asenduse mõju valgufunktsioonile (www.mutationtaster.org; Kumar jt., 2009; Adzhubei jt., 2010; López-Bigas jt., 2011)
4. esinemine teistes EGV andmebaasis olevates Eesti eksoomides ja täisgenoomides
5. phyloP ja GERP veebipõhiste programmide skoorid, mis näitavad aminohappe evolutsioonilist konserveerumist (Siepel jt., 2005; Cooper jt., 2005)
6. Olemasolu 1000 Genomes Project andmebaasis

Eksoomide analüüsimisel võeti lähema vaatluse alla ~300 CAKUT-ga seostatavat kandidaatgeeni (Chatterjee jt., 2012) ja 18 nefronoftiisiga seotud geeni (Otto jt., 2011).

Variantide analüüsil lähtuti eelkõige sellest, et tegu oleks kodeerivas alas paikneva mittedünaamse, stopp-koodoni või kanoonilise splaissingusaidi variandiga ning mis oleksid haruldased või puuduksid avalikest andmebaasidest, sealhulgas dbSNP135, 1000 Genomes Project ja NHLBI-ESP EVS (Exome Variant Server).

2.2.3. Sangeri sekveneerimine

Mutatsioonide kinnitamine ja segregatsioonianalüüs teistes perekonnaliikmetes teostati Sangeri sekveneerimisega. Leitud variantide valideerimiseks polümeraasahelreaktsiooni ja sekveneerimisega disainiti unikaalsed praimerid (Lisad, Tabel 1). Praimerite disainimiseks kasutati veebipõhist programmi Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Praimerite disainimisel määrati järgnevad parameetrid: T_m (sulamistemperatuur) 60°C, praimerite optimaalne pikkus 22 nukleotiidi, GC% 40 - 60%. Pärast disainimist kontrolliti praimerid üle UCSC Genome Browser'is (Karolchik jt., 2011; <http://genome.ucsc.edu/>), et praimerite sekventsidesse ei jääks ühtegi sagedast SNP-d, SINE-sid ega LINE-sid.

PCR-i reaktsioonid viidi läbi 19 µl mahus. Reaktsioonisegu sisaldas endas: 10× reaktsioonipuhver B [0,8 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,2% w/v Tween 20 (Solis BioDyne, Eesti)], 0,2 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Fermentas, Leedu), 25 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Eesti), 10 pmol *forward* ja 10 pmol *reverse* praimerit, 1 U Taq HOT FIREPol[®] DNA polümeraasi (Solis BioDyne, Eesti), 50 ng genoomset DNA-d ja lõppmahuni lisati Milli-Q-d. Polümeraasi ahelreaktsioon viidi läbi MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler termotsükleris (MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts, USA, www.mjr.com). DNA fragmentide amplifitseerimiseks kasutati 34-tsüklilist *touchdown* programmi (Lisad, Tabel 2). Produktid lahutati 1,5% agarosgeeli elektroforeesil 0,5× TBE puhvril (0,045 M Tris-boraat; 0,001 M EDTA-Na₂). Proovide geelile kandmiseks kasutati 6× laadimispuhvit (6× Loading Dye; Fermentas) ning pikkusmarkeriks oli MassRuler[™] DNA Ladder Low Range (Fermentas). PCR-i produktide visualiseerimiseks kasutati etiidiumbromiidi. PCR-i produktid puhastati, sadestati ja sekveneeriti Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. Järjestuse määramine teostati Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer sekvenaatoriga (<http://www.lifetechnologies.com/>). Sekventsid kontrolliti visuaalselt üle BioEdit *version* 7.0.9.0 programmiga (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Väljavalitud variantide valideerimiseks sekveneeriti Eesti Geenivaramu tuumiklaboris Sangeri sekveneerimisega mõlema eksoomidega sekveneeritud patsiendi (II-2 ja III-3) ning teiste perekonnaliikmete (I-1, II-3, II-4) geenide piirkonnad.

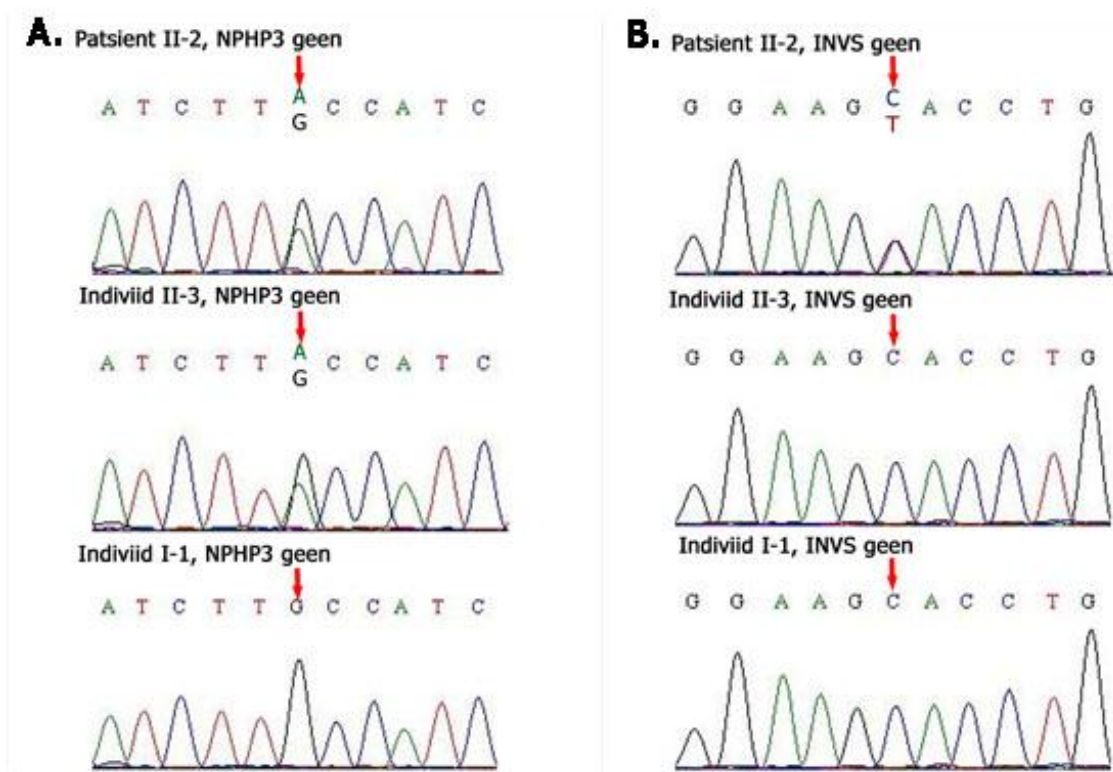
2.3. Tulemused

Käesolevas uuringus sekveneeriti eksoomid ühe Eesti perekonna kahel unilateraalse neeru hüpoplaasia diagnoosiga patsiendil (II-2, III-3). Eksoomide sekveneerimise ja bioinformaatilise analüüsi ning variantide prioritseerimise tulemusena leiti patsientidel kokku 11.807 eksonites asetsevat DNA varianti, millest 2.655 esinesid vaid patsiendil II-2 ja 2.577 patsiendil III-3. Jagatud eksonite variante oli patsientidel 6.575. Bioinformaatilisel analüüsil aluseks võetud CAKUT seoseliste 300 geeni ja nefronoftiisiseoseliste 18 geeni analüüs ning veebipõhiste programmide skooride arvestamise tulemusena vähenes eksonites asuvate DNA variantide hulk 122-ni, millest jagatud kodeeriva järjestuse variante oli patsientidel 52. 122-st DNA variandi hulgast valiti välja 15 kõige tõenäolisemat haiguspõhjuslikku varianti. Väljavalitud variantide valideerimine teostati Sangeri sekveneerimisega, kasutades lisaks patsientidele ka DNA proove uuringuks nõusoleku andnud perekonnaliikmetelt (I-1, II-3, II-4). Bioinformaatilise analüüsi ja sekveneerimise tulemusena ei leitud patsientidel ühtegi ühist *novel* või haruldast DNA varianti, mis oleks sobinud haiguse mendeliaarse pärandumise mustri ja eeldatava bioloogilise taustaga. Seega käsitleti edaspidi mõlemat patsienti kui eraldi sporaadilist haigusjuhtumit.

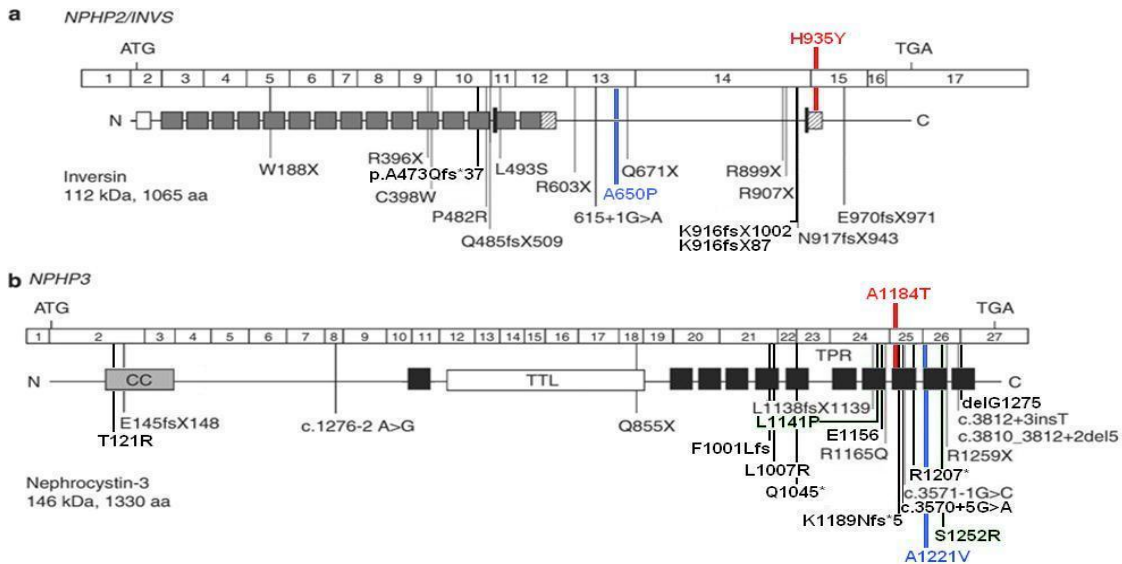
2.3.1. Patsient II-2

Patsiendil II-2 leiti kaks heterosügootset mittesünonüümset mutatsiooni. Üks mutatsioonidest oli *INVS* (varasemalt *NPHP2*) geenis (NM_014425.3, NP_055240.2) ja teine *NPHP3* geenis (NM_153240.4, NP_694972.3) (Joonis 6). *INVS* mutatsioon c.2803C>T (p.His935Tyr) paiknes eksonis 15 IQ-kalmoduliiniga seonduvas domeenis (Joonis 7 (a)). Mutatsioon esines dbSNP andmebaasis koodiga rs139768159 (Sherry jt., 2001). Leitud asendus oli SIFT programmi järgi kahjustav (*damaging*) (skoor 0), PolyPhen-2 programm kirjeldas mutatsiooni kui võimalikult kahjustav (*possibly damaging*) (skoor 0,858), kuid Mutation Taster (P=1) ja Condel (skoor 0.598) hindasid seda varianti polümorfismiks. GERP skoori (4,42) järgi oli nimetatud koodon kõrgelt konserveerunud (Lisad, Joonis 10), kuid phyloP (skoor 1,012) ennustuse kohaselt konserveerunud vaid *M. musculus* 'eni.

NPHP3 mutatsioon c.3550G>A (p.Ala1184Thr) asus eksonis 10 TPR (*Tetratricopeptide repeat*) domeenis (Joonis 7 (b)) ning mõjutab kõrgelt konserveerunud aminohapet (GERP skoor 4,72; phyloP skoor 4,475, ulatudes sebrakalani) (Lisad, Joonis 11). Leitud mutatsioon esines dbSNP andmebaasis koodiga rs34391943 ning oli kõigi veebipõhiste programmide (SIFT, PolyPhen-2, Condel ja MutationTaster) järgi deleterioosne ja/või haigust põhjustav (skoorid vastavalt 0, 1, 0,945; P=1). Vastavalt Sangeri sekveneerimise tulemustele selgus, et *NPHP3* geenis olev mutatsioon oli patsiendile pärandunud suure tõenäosusega isaliini pidi, kuna esines ka tervel vennal II-3 (Joonis 6). *INVS* geenis olev mutatsioon puudus indiviididel I-1 (ema) ja II-3 (vend), samuti ei detekteeritud mutatsioon patsiendil III-3 (vennatütar). Antud mutatsiooni paternaalset pärandumist polnud võimalik indiviidi I-2 (perekonnaliikmete sõnul terve) DNA puudumise tõttu uurida.



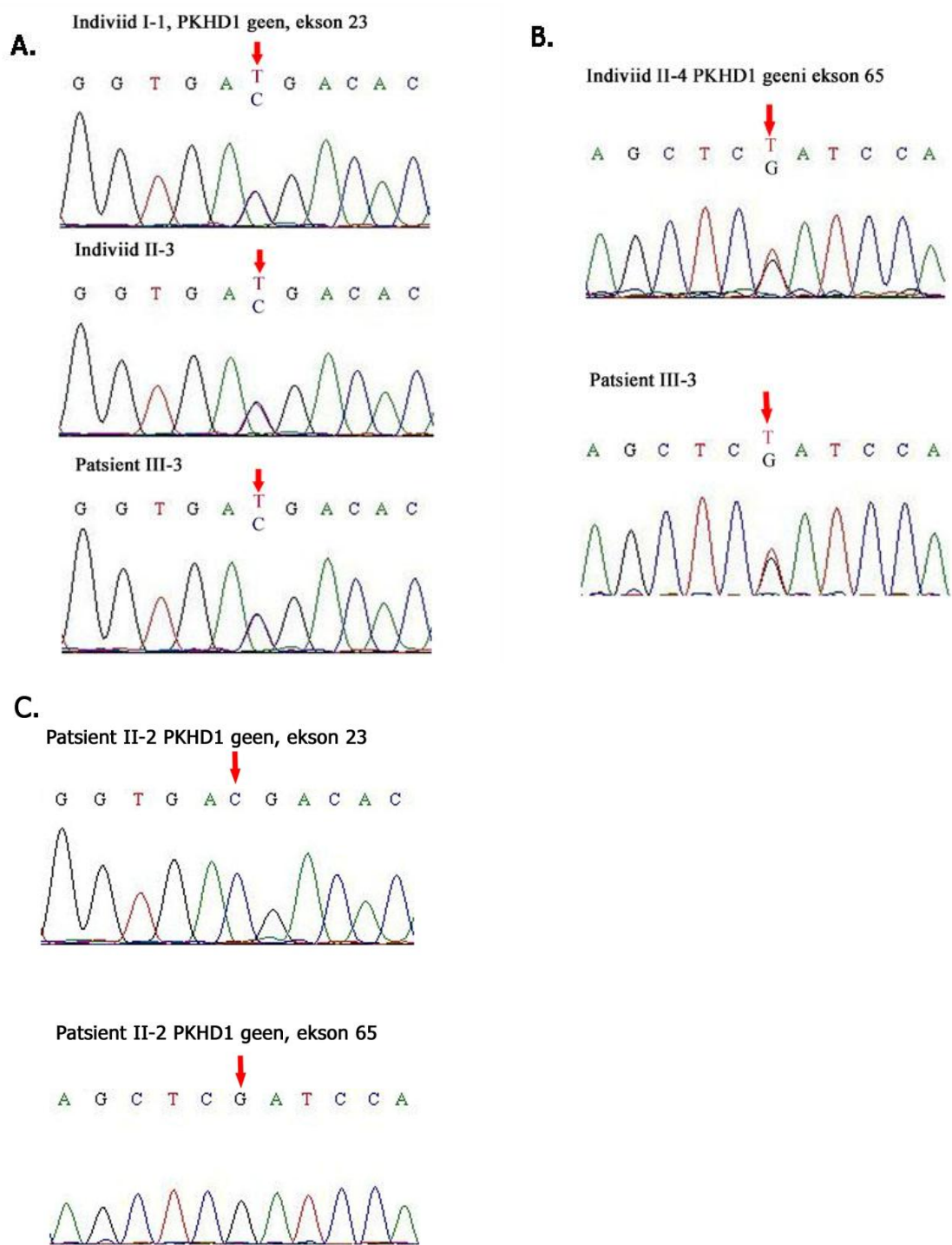
Joonis 6. Sekveneerimisel saadud elektroforeogrammi pildid *NPHP3* (c.3550G>A) ja *INVS* (c.2803C>T) geenides olevate mutatsioonide pärandumismustritest. A. *NPHP3* geenis oleva mutatsiooni c.3550G>A pärandumismuster. Antud mutatsioon esines nii patsiendil II-2 kui ka tervel vennal (II-3), kuid puudus emal (I-1) B. *INVS* geenis oleva mutatsiooni c.2803C>T pärandumismuster. Mutatsioon esines vaid patsiendil II-2 ning puudus tervel vennal (II-3) ja emal (I-1).



Joonis 7. (a) *NPHP2/INVS* geenilt kodeeritud inversiini sisaldab 16 tandeemset anküriini kordust (hallid kastid), kahte IQ-kalmoduliini siduvat domeeni (viirutatud kastid) ja kahte *destruction box region* ala (mustad tulbad). (b) *NPHP3* geeniproduct, mis sisaldab *coiled-coil* domeeni (CC), tubuliin türosiini ligaasi domeeni (TTL) ja *tetratricopeptide-repeat* domeeni (TPR). Punasega on märgitud käesolevas töös leitud mutatsioonid patsiendil II-2, sinisega on välja toodud mutatsioonid Saksamaal tehtud patsiendi uuringust (Tory jt., 2009, modifitseeritud)

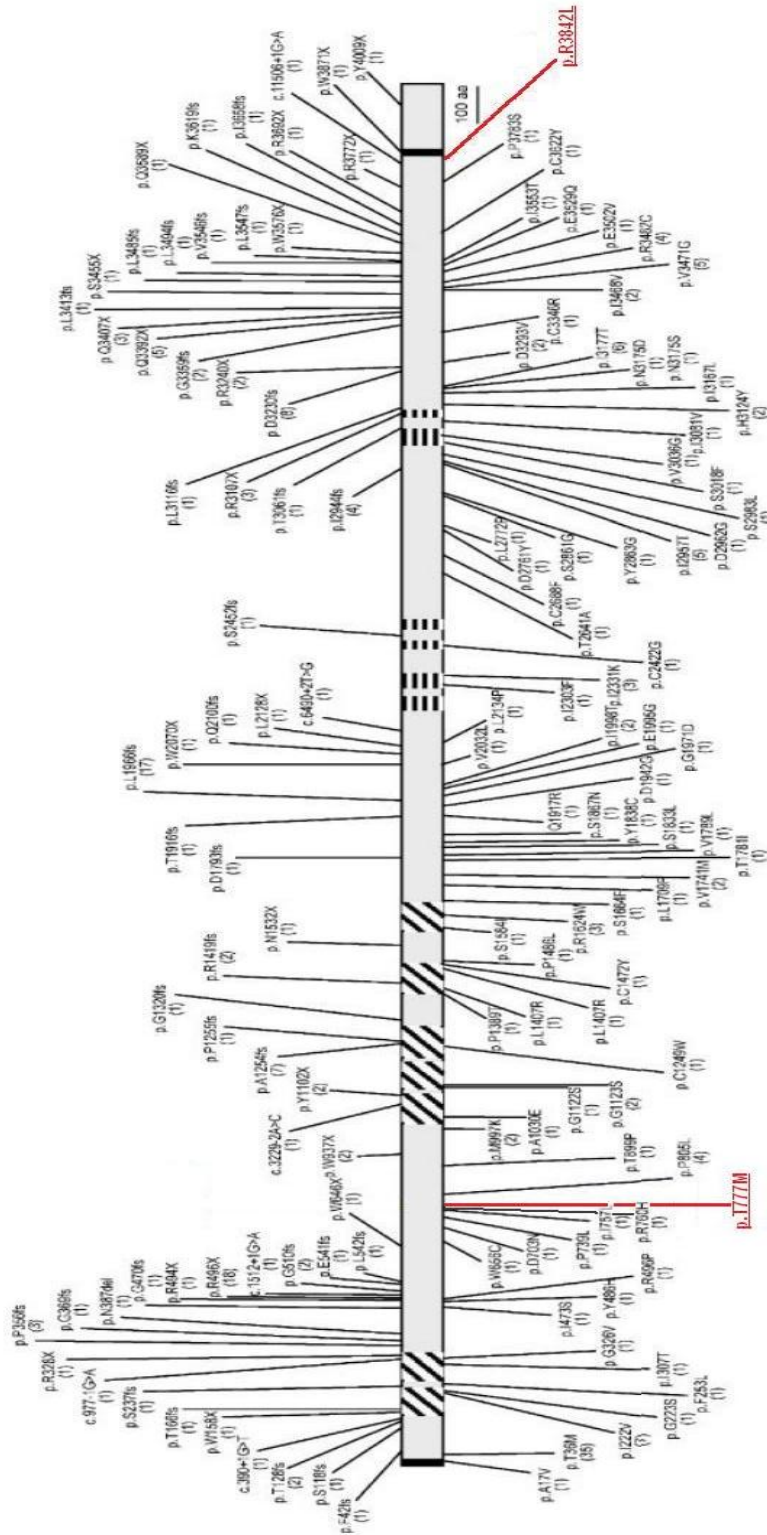
2.3.2. Patsient III-3

Patsiendil III-3 leiti *PKHD1* geenis kaks heterosügootset mittesünonüümset mutatsiooni eksonites 23 ja 65 (Joonised 8, 9). Eksonis 23 oli mutatsioon c.2330C>T (p.Thr777Met; NP_619639.3, NM_138694.3), mis puudus NHLBI-ESP andmebaasist ning seda ei esinenud ka dbSNP andmebaasis ega teistes Eesti eksoomides ja täisgenoomides. Leitud mutatsioon oli SIFT, PolyPhen-2 ja Condel hinnangute järgi deleterioosne (skoorid vastavalt 0,01, 1 ja 0,905), kuid MutationTaster ennustuse kohaselt oli tegu polümorfismiga (P=1). PhyloP andmebaasis oli mutatsioon skooriga 0,907 - olles konserveerunud kuni *M. musculus*'eni (Lisad, Joonis 12). Eksonis 65 paikneva mutatsiooni c.11525G>T (p.Arg3842Leu) oli dbSNP andmebaasis koodiga rs76572975. Antud mutatsiooni mõju valgule oli nii SIFT, PolyPhen-2 kui ka Condel hinnangute järgi deleterioosne (skoorid vastavalt 0,02, 0,994 ja 0,835). Mutation Taster programmi järgi oli tegu polümorfismiga (P=0,743). PhyloP (skoor 2,041) ja GERP (skoor 5,69) programmide kohaselt oli tegu suhteliselt konserveerunud järjestusega, kuid koodon 3842 on konserveerunud vaid *M. musculus*eni (Lisad, Joonis 13) (Losekoot jt., 2005). Segregatsioonanalüüs näitas, et mutatsioon c.11525G>T pärandus patsiendile emalt (II-4) ning puudus indiviididel I-1, II-2 ja II-3. Teine mutatsioon, c.2330C>T, pärandus paternaalselt (II-3), kes omakorda oli selle variandi pärinud oma emalt (I-1). Teistel indiviididel (patsient II-2; II-4) antud mutatsioon puudus (Joonis 8).



Joonis 8. Sekvencerimisel saadud kromatogrammid *PKHD1* geenis olevate mutatsioonide pärandumismustritest. A. Kromatogramm eksonis 23 olevast heterosügootsest mutatsioonist (c.2330C>T). B. Kromatogramm eksonis 65 olevast heterosügootsest mutatsioonist (c.11525G>T). Patsiendil III-3 on tegemist liiheterosügootse kandlusega. C. Kromatogramm patsient II-2 mutatsioonideta geenivariantidest.

Joonis 9. Lil Truncating 1 geeniproduct domeenid (d terminuse lä mutatsiooni



olüduktiinist. allpool es), IPT e domeen (C-nüümsed

2.4. Arutelu

Paljudest varasematest uuringutest on teada, et CAKUT on väga heterogeense fenotüübiga haigusrühm, millel on palju erineva geneetilise taustaga endofenotüüpe ning mille tekkel osalevad paljud erinevad neerude ja kuseteede arenguga seotud geenid. CAKUT uurimine perekondades on aidanud paremini mõista geneetiliste faktorite tähtsust CAKUT tekkel. Siiski sõltub haiguse patogenees ja lõplik patsientidel avaldunud fenotüüp nii geneetilisest taustast kui ka keskkonna riskifaktoritest (Yosypiv, 2012).

Käesoleva töö eesmärgiks oli tuvastada ühest Eesti perekonnast pärit kahel patsiendil näiliselt mendeliaarse pärandumismustriga neeruhaigusi põhjustavad geenivariandid ning vastavalt leidudele täpsustada võimalusel patsientidele juba määratud diagnoose. Selleks sekveneeriti mõlemal patsiendil eksoom ning võrreldi leitud ja prioritseeritud DNA variantide kandlust teiste perekonnaliikmetega. Kuna uuringu alguses polnud saadaval kõigi informatiivsete perekonnaliikmete DNA proovid, polnud ühel patsiendil võimalik teostada trio uuringut.

Analüüsi käigus ei leitud patsientidel ühtegi potentsiaalselt haigust põhjustavat jagatud DNA varianti, mis samal ajal puuduks tervetel indiviididel. Seetõttu vaadati hilisemal analüüsil kumbagi patsienti kui eraldi sporaadilist haigusjuhtumit. Tulemuste valideerimisel leiti kummalgi patsiendil unikaalsed liheterosügootsed mutatsioonide kombinatsioonid, mida ei leitud ühelgi tervel indiviidil. Samuti ei eksisteerinud ükski leitud mutatsioon varianthomosügootsel kujul teistes Eesti eksoomides ja täisgenoomides. Heterosügootsel kujul esinesid käesolevas töös leitud mutatsioonid madala kandjasagedusega (<5%) Kummalgi patsiendil identifitseeriti oluliste tulemustena kolmes erinevas eelsoodumusega seostatavas geenis heterosügootse kandlusega mittesünonüümsed mutatsioonid, mis sobisid pärandumise mustriga. Et mõista nende seoseid neeruhaiguste tekkega, tuleb esmalt analüüsida nende bioloogilist rolli antud kontekstis.

2.4.1. Patsient II-2

Patsiendil II-2 leiti *INVS* geenis IQ-kalmoduliini siduvas domeenis mutatsioon c.2803C>T (p.His935Tyr) (Joonis 7). Sellelt geenilt kodeeritakse *ankyrin-repeat* valku inversiini. Varem tehtud uuringutest on teada, et IQ-kalmoduliini siduv domeen erinevate *EF-hand* valkude seondumiskohaks ja inversiini mutatsioonid põhjustavad nefronoftiisi, autosomaal-retsessiivset tsüstilist neeruhaigust, millega kaasnevad ekstrarenaalsed ilmingud (sealhulgas *retinitis pigmentosa*, *cerebellar aplasia* ja *situs inversus*) (OMIM #602088) (Hunter jt., 2011;

Lienkamp jt., 2012). Leitud mutatsioon on Eesti populatsioonis suhteliselt harva esinev - mutatsiooni variantalleeli teadaolev sagedus üldpopulatsioonis on 0,078% (EGV andmebaasi andmetel, n=4459) ning homosügootsel kujul seda perekonnaliikmetel ega üldpopulatsioonis ei esinenud. NHLBI-ESP EVS andmebaasi järgi oli mutatsiooni c.2803C>T variantalleeli esinemissagedus eurooplaste seas kõigest 0,36%. 1000 Genomes Project andmebaasis puudus info mutatsiooni variantalleeli esinemissageduse kohta eurooplaste seas. SIFT ja Polyphen-2 skooride järgi oli tegemist tõenäoliselt haigust põhjustava mutatsiooniga. Samas, MutationTaster hindas seda varianti polümorfismiks, Condel aga võimalikuks haigusseoseliseks variantiks. Vastuoluliste andmete tõttu ei saa kindlalt väita, et antud mutatsioon üksinda osaleks neeruhaiguse tekkel kui haigusseoseline variant. Kuna leitud mutatsioon IQ-kalmoduliini siduvas domeenis oli üldpopulatsioonis väga harva esinev, võib patsiendil tegu olla *de novo* tekkinud mutatsiooniga. Seda ei saa aga kindlalt väita, sest patsiendi isa (I-2) DNA puudumisel ei olnud võimalik kontrollida mutatsiooni paternaarset pärandumist. Kuna pereliikmete sõnul oli isa (I-2) terve, on vähetõenäoline, et ta oli antud mutatsiooni kandja. Ka tervel vennal valideerimine Sangeri meetodil ei näidanud c.2803C>T kandlust. Seega võib oletada, et patsiendil II-2 esinev mutatsioon c.2803C>T *INVS* geenis oli *de novo* tekkemustriga.

NPHP3 geenis olev mutatsioon c.3550G>A (p.Ala1184Thr) paiknes ühes TPR domeenis ning oli kõigi kasutatud veebipõhiste programmide (Condel, SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster) järgi deleterioosne variant. Mutatsiooni c.3550G>A variantalleeli esinemissagedus Euroopa päritolu ameeriklaste seas oli NHLBI-ESP EVS andmebaasi järgi 1,3% ja 1000 Genomes Project andmetel 0,004%. EGV andmebaasis oli antud mutatsiooni variantalleeli sagedus Eesti üldpopulatsioonis 3,4% ning seda ei esinenud homosügootsel kujul. Siiani pole aga leitud tõendatud seost antud mutatsiooni kandluse ja CAKUT seoseliste neeruhaiguste vahel. Kuigi leitud mutatsioon esines ka dbSNP andmebaasis. Varasematest uuringutest on teada, et nefronoftiisi tekkel osalevate erinevate *NPHP* geeniperekonna hulka kuuluvate mitmete geenide variandid võivad korraga esineda antud haiguse digeense mudeli näol. Seega on üsnagi tavaline, et nefronoftiisi diagnoosiga patsientidel on paralleelselt mitmed DNA variandid erinevates *NPHP* perekonna geenides, mistõttu uuritakse nende puhul *NPHP* gene korraga (Hoefele jt., 2007). Seda tehakse ka põhjusel, et eksperimentaalselt on tõendamist leidnud, et paljud *NPHP* geenide produktid interakteeruvad üksteisega. Teadaolevalt interakteeruvad omavahel just nefrotsüstiinid 1-4 (Hoefele jt., 2007). Kinnitust on leidnud fakt, et nefrotsüstiin 3 interakteerub inversiiniga ning mõjutab seeläbi kanoonilist Wnt

signaalirada (Bergmann jt., 2008). Nefrotsüstiini valgud on multidomeensed valgud, mis on sageli rikkad *coiled-coil* domeenide ja teiste valk-valk interaktsioonides osalevate domeenide poolest, mis muudab nad adaptermolekulide sarnasteks. Mutatsioonid erinevates *NPHP* geenides põhjustavad fenotüübilt varieeruvaid neeruhaigusi. Selle info kohaselt võib väita, et iga geeni funktsiooni kaotamine viib unikaalsete mehhanismideni haiguse patogeneesis (Kenny ja Beales, 2013).

2007. aastal uuris Julia Hoefele koos oma uurimisgrupiga nefronoftiisi diagnoosiga patsiente 94 erinevast perekonnast. Selles uuringus sekveneeriti kõik *NPHP1*, *NPHP2*, *NPHP3* ja *NPHP4* geenide eksonid. Uuringu tulemusena leiti ühel nefronoftiisi diagnoosiga patsiendil kaks mutatsiooni liitheterosügootsel kujul geenides *INVS* (*NPHP2*) (G1948C, h A650P, PolyPhen-2 skoori järgi võimalikult kahjustav (*possibly damaging*)) ja *NPHP3* (C3662T, h A1221V, konserveerunud *D. rerio*'ni, PolyPhen-2 skoori järgi tõenäoliselt kahjustav (*probably damaging*)) digeense haiguspõhjusliku mudelina. *NPHP3* geeni mutatsioon oli MutationTaster'i ennustuse kohaselt haigust põhjustav (P=1) ning *INVS* geeni variant sama programmi järgi polümorfism (P=1) sarnaselt meie patsiendile II-2, kus ainult *NPHP3* variant oli hinnanguliselt deleterioosne. Varem tehtud erinevatest uuringutest selgub, et nefronoftiisi diagnoosiga haigetel klasterduvad *NPHP* geeniperekonna geenides mutatsioonid eelkõige erinevatesse domeenidesse. Domeenides olevatest mutatsioonidest on raaminihke ja stopp-koodoni mutatsioonid ainukesed, mille puhul ei ole haiguse tekkeks vajalik teiste mutatsioonide olemasolu (Hoefele jt., 2007; Otto jt., 2008). Teadaolevalt vahendavad *NPHP3* geenis olevad *tetratricopeptide repeat region*'id (TPR) domeenid valk-valk interaktsioone. Valgud, mis sisaldavad nimetatud domeene, osalevad erinevates bioloogilistes protsessides nagu rakutsükli regulatsioon, transkriptsiooni kontroll, mitokondriaalne ja peroksüsomaalne valkude transport, neurogenees ja valkude voltumine (Hunter jt., 2011).

Tuginedes kirjanduse andmetele ja uuringutele üldpopulatsioonis, võib käesolevas uuringus leitud mutatsioonide järgi väita, et patsiendil II-2 leitud *NPHP3* geenis olev deleterioosne variant üksinda ei ole nefronoftiisi põhjustamiseks piisav - haiguse tekkeks ja bioloogilise läve ületamiseks on vaja ka teise, kas või mittedeleterioosse mutatsiooni olemasolu mõnes muus *NPHP* geenis. Kuna patsiendil esines *NPHP2* geenis eeldatavalt mittedeleterioosne variant, mis puudus indiviididel, kellel oli olemas *NPHP3* geeni variant, oleks see analoogiliselt Hoefele jt. uuringule tõenäoliselt ikkagi piisav, et ületada bioloogiline lävi nefronoftiisi kujunemiseks. Seega võib antud tulemustest järeldada, et patsiendi II-2 neeru eemaldamise ja neeru funktsiooni ulatusliku vähenemise põhjuslikuks fenotüübiks oleks

leitnud mutatsioonide põhjal nefronoftiisi digeenne mudel (Q61.5; OMIM #602088 (*NPHP2*) ja OMIM #604387 (*NPHP3*)).

NPHP2 neeruhaiguse (OMIM #602088) fenotüüp on kombineeritud nefronoftiisist (*NPHP*), sealhulgas ebanormaalne neerutorukeste basaalmembraan ja *renal interstitial fibrosis*, ning polütsüstilise neeruhaiguse (*PKD*) sümptomitest (suurenenud neerud ja laialt levinud tsüstide arenemine) (Otto jt., 2003). Sõltuvalt muteerunud alleelidest *NPHP3* geenis, põhjustavad sealsed mutatsioonid teadaolevalt väga varieeruva fenotüübiga haigusi, mille hulka kuuluvad noorukiea nefronoftiis (OMIM #604387) (võib esineda ka koos maksafibroosi või *retinitis pigmentosa* ga), infantiilne nefronoftiis (OMIM#602088) või Meckel-Gruber sündroom (Wolf ja Hildebrandt, 2011).

2.4.2. Patsient III-3

Patsiendil III-3 leiti kaks mittesünonüümset mutatsiooni c.2330C>T (p.Thr777Met) ja c.11525G>T (p.Arg3842Leu) *PKHD1* geenis. NHLBI-ESP EVS andmebaasi kohaselt oli mutatsiooni c.11525G>T variantalleeli esinemissagedus eurooplaste seas vaid 2,4% ja 1000 Genomes Project'i kohaselt 0,013%. EGV andmebaasi järgi esines üldpopulatsioonis mutatsiooni heterosügootsel kujul 2,06%. Eksonis 23 paikneva haruldase mutatsiooni c.2330C>T kohta puudusid andmed nii NHLBI-ESP EVS kui ka EGV andmebaasides. *PKHD1* geen on neerude arengus väga tähtis, kuna sellelt kodeeritav valk fibrotsüstiin/polüduktiin mõjutab neerutorukeste arengut, osaledes polütsüstiin-2 (*PKD2* geeni produkt, mida on omakorda seostatud AD-*PKD* tekkega) ekspressiooni ja funktsiooni reguleerimisel (Kim jt., 2008).

Tsüstilised neeruhaigused on neerude arenguhäiretest koosnev grupp, mille hulka kuuluvad paljud sporaadilised kaasasündinud, arenguga seotud või elu jooksul tekkinud neeruhaigused. Neerudes arenevad tsüstid võivad esineda üksikult või kogumikena ning samuti võivad varieeruda nende suurused, ulatudes mikroskoopilistest tsüstidest mõne sentimeetrini diameetris. Kuigi paljud tsüstilised neeruhaigused võivad esineda arenguhäirena või avalduda hilisemal eluperioodil, on enamus tsüstilistest neeruhaigustest päritavad. Ühed harudasemad CAKUT seoselised fenotüübid, AD-*PKD* ja AR-*PKD*, võivad avalduda ka varajases vanuses. Paljude tsüstiliste neeruhaiguste geneetiline taust on tänaseks teada (Pooler, 2009; Dakshinamurty, 2012).

Erinevalt autosomaal-dominantsest polütsüstilisest neeruhaigusest (fenotüübid on kombineeritud kahepoolse neeru tsüstilisest haigusest ja kaasasündinud maksa fibroosist), kus tuhanded tsüstid esinevad igas nefroni segmendis eraldiseisvatena ja olles nii eraldatud ülejäänud nefroosist, moodustuvad polütsüstilise neeruhaiguse retsessiivse vormi puhul väikesed piklikud tsüstid kogumisjuhas, säilitades ühenduse terve nefroniga. Autosomaal-retsessiivset polütsüstilist neeruhaigust on kirjeldatud kui tsüstiliste laienditega kortikaalsete ja medullaarsete kogumisjuhadega haigust. AR-PKD puhul on täheldatud laiaspektrilist fenotüübi avaldumist. Sinna alla kuuluvad näiteks suurenenud ja tsüstilised neerud, mis 30% põhjustavad neonataalset surma. Teistel juhtudel kujunevad patsientidel välja lõpp-staadiumi neeruhaigused (ESRD), mis võivad vale ravi korral lõppeda surmaga (Elsharif, 2011). Aheldusanalüüsi abil on kindlaks tehtud, et kõik tüüpilised AR-PKD vormid on põhjustatud mutatsioonidest *PKHD1* geenis, millelt kodeeritakse valku fibrotsüstiin/polüduktiin (FPC) (Farrell jt., 2014; Rossetti jt., 2003). Siiani on erinevates uuringutes leitud nii haruldasi, kui tavalisi mittesünonüümseid ja geeni kärpivaid (*truncating*) mutatsioone (Rossetti jt., 2003). *PKHD1* ekspresseeritakse kõige rohkem neerudes, aga seda ekspresseeritakse ka maksas, südames, kilpnäärmes, munasarjades, eesnäärmes ja testistes (Farrell jt., 2014). *PKHD1* geeniproducti fibrotsüstiin on otseselt seotud rakkude adhesiooni ja vohamise regulatsiooniga (Pooler, 2009). Kuna geeni eksonitel on palju alternatiivseid splaissinguvariante, suureneb potentsiaalselt membraanseoseliste transleeritavate transkriptide hulk. (Zhang jt., 2012). *PKHD1* geeni suuruse ja alternatiivse splaissingu tõttu on AR-PKD molekulaarne diagnostika siiski väga keeruline (Zhang jt., 2012). Katsetest hiiremudeliga on teada, et *Pkhd1*^{-/-} hiirtel tekib täiskasvanuna lisaks sidekoe vohamisele ja nekroosile veel leebe kuni tõsine neerutorukeste laienemine või tsüstide teke neerudes ja maksas (Kim jt., 2008).

Autosomaal-retsessiivse polütsüstilise neeruhaigusel on näidatud genotüüp-fenotüüp seost, kus kahe *PKHD1* geeni inaktiveeriva mutatsiooni korral avaldub patsiendil haigus raskemal kujul ning seda seostatakse perinataalse surmaga. Patsiendid, kellel on vähemalt üks hüpomorfne mittesünonüümne mutatsioon, avaldub haiguse juveniilne vorm. See kinnitab fakti, et mitme mittesünonüümse mutatsiooni esinemine geenis vaid vähendab fibrotsüstiin/polüduktiini hulka, mitte ei põhjusta geeniproducti täielikku puudumist (Fedeles jt., 2014). Praeguseks on leitud paljudel AR-PKD diagnoosiga patsientidel haigust põhjustavate mutatsioonide liitheterosügootset kandlust, kus vähemalt üks mutatsioonidest on deleterioosne mittesünonüümne või raaminihke mutatsioon *PKHD1* geenis. Samas on täheldatud osadel patsientidel ka splaissingu, insertiooni ja deletsiooni variante ning

homosügootseid asendusi ja deletsioone, mis on põhjustanud AR-PKD-d (Sharp jt., 2005). Kui *INVS* ja *NPHP3* geenide puhul klasterdusid mutatsioonid domeenidesse, siis *PKHD1* geenis ei ole täheldatud erilist mutatsioonide klasterdumist, vaid mutatsioonid jaotuvad üle terve geeni ühtlaselt. Samas on erinevalt *INVS* ja *NPHP3* geenidest *PKHD1* geeni puhul olulisem esinevate mutatsioonide tüüp, mis mõjutab nii transleeritava geeniproducti hulka organismis. Mõningatel AR-PKD patsientidel on leitud ka *stop-gained* mutatsioone (Gunay-Aygun jt., 2010; Bergmann jt., 2004; Zhang jt., 2012). Esmakordselt CAKUT fenotüübiga patsientidel teostatud eksoomi sekveneerimise tulemusena saab esile tuua 15-aastaselt neeruhaigel poisil leitud kahe mittesünonüümse mutatsiooni liitheterosügootne kandlus (p.N327D ja p.G1979R) *PKHD1* geenis, mis põhjustasid patsiendil autosomaal-retsessiivset neeruhaigust (Zhang jt., 2012). Käesolevas töös leitud *PKHD1* geeni mutatsioonide kombinatsiooni pole varasemates uuringutes täheldatud. Sellegipoolest on varasemalt mainitud antud töös leitud c.11525C>T läheduses asuvat mutatsiooni. 2005. aastal leidis Sharp oma uurimisgrupiga ühel patsiendil liitheterosügootse kandlusega duplikatsiooni (c.5895dupA) ja mittesünonüümse mutatsiooni (c.11524C>T) (Sharp jt., 2005). Täiendavate mittesünonüümsete mutatsioonide leidmine *PKHD1* geenis toetab Fedeles jt. oletust, et kahe erineva mittesünonüümse mutatsiooni esinemine *PKHD1* geenis ei vii funktsionaalse geeniproducti täieliku puudumiseni.

Seega võib kirjeldatud mutatsioonide ja kirjanduse andmete põhjal väita, et patsiendil III-3 oli autosomaal-retsessiivne polütsüstiline neeruhaigus (OMIM #263200 *Polycystic Kidney Disease, Autosomal Recessive*, ICD-10-CM kood Q61.1), mis põhjustas unilateraalset neeru ageneesi ning komplikatsioonide vältimiseks viis lõpuks neeru eemaldamiseni.

Fenotüübilt ja geneetiliselt heterogeensele CAKUT-le lisaks on eksoomide sekveneerimist kasutatud teiste sarnaselt iseloomulikult kõrge lookuse heterogeensusega haiguste puhul. Varem on seda kasutatud näiteks erinevate ektodermaalse düsplaasia fenotüüpide, *Coffin-Siris* sündroomi, autismi ja teiste neuroloogilise arenguga seotud haiguste geneetilise tausta määramisel, mis on muutnud haiguste diagnoosimise lihtsamaks ja täpsemaks (Haghighi jt., 2013; Raykova jt., 2014; Schrier jt., 2012; Cukier jt., 2014).

Kokkuvõtteks võib öelda, et käesolevas töös uuritud patsientidel kirjeldatud neeruhaiguste geneetilise tausta määramisel leiti kummalgi patsiendil erinevad mutatsioonid erinevates geenides. See tähendab, et kummagi patsiendi neeru eemaldamise põhjuseks oli erinev haigusfenotüüp. Tänu eksoomide sekveneerimisele osutus patsiendi II-2 täpsemaks

diagnoosiks nefronoftiis, mille põhjustasid deleterioosne populatsioonis madala sagedusega esinev mutatsioon geenis *NPHP3* ja haruldane mutatsioon geenis *INVS*, mida oli kumbagi vaja, et ületada haiguse avaldumiseks vajalik bioloogiline lävi. Patsiendil III-3 täpsemaks diagnoosiks võib geneetilise tausta põhjal ennustada autosomaal-retsessiivset polütsüstilist neeruhaigust, mille tekkeks piisab enamusel juhtudel kahe mittesünonüümse mutatsiooni liitheterosügootsest kandlusest *PKHD1* geenis. Kuna siiani pole täheldatud *PKHD1* geeni puhul varianthomosügootset kandlust, tuleks liitheterosügootse kandluse puhul arvestada, et kummagi haigusvormi (AR-PKD ja AD-PKD) tekkeks piisab enamasti sellest, kui vaid üks mutatsioon kahest on ennustuslikult deleterioosne. Nagu antud töös leitud mutatsioonide puhul, ei pea mutatsioonid olema üliharuldased. Ühelgi tervel perekonnaliikmel ei leitud samu kahe mutatsiooni kombinatsioone, mis patsientidel. See näitab töös kirjeldatud variantide olulisust kummagi patsiendi haiguste tekkel.

Antud töö raames leitud mutatsioonid *PKHD1*, *INVS* ja *NPHP3* geenides täiendavad teadmisi CAKUT geneetilise tausta kohta ja aitavad mõista erinevate CAKUT fenotüübi alla kuuluvate haiguste tekkepõhjuseid. Käesolevas uurimistöös saadud tulemused on veelkordseks tõenduseks eksoomide sekveneerimise tulemuslikkuse kohta mendeliaarsete haiguste geneetilise tausta täpsemal selgitamisel. Seda just eelkõige kõrge lookuse heterogeensusega keeruliste haiguste, nagu CAKUT, korral, mis näitab sellise uuringu strateegia olulisust ja sobilikkust ka pärilike neeruhaiguste geneetilises diagnostikas kasutamiseks.

Kokkuvõte

CAKUT on üks levinumaid ja sagedamini esinevaid neeruhaigusi laste seas. Seda iseloomustab geneetiliselt taustalt ja fenotüübilt kõrge heterogeensus, mis muudab haiguse fenotüüpide diagnoosimine ja nende haiguspõhjuslike geenide tuvastamine keeruliseks. Praeguseks on loom-mudelitel, aheldusanalüüsi ja Sangeri sekveneerimisega, leitud palju CAKUT-seoselisi kandidaatgeene, mille massiline sekveneerimine haigusseoseliste geenivariantide otsimiseks on siiski liialt kulukas, aeganõudev ja töömahukas. Paljude mendeliaarseid haigusi põhjustavate mutatsioonide asukoht kodeerivates genoomipiirkondades on muutnud eksoomide sekveneerimise populaarseks meetodiks haiguspõhjuslike geenivariantide leidmiseks.

Käesolevas töös uuritud kahel patsiendil ühes Eesti perekonnas sekveneeriti eksoomid, et täpsustada neile varasemalt määratud unilateraalse neeru hüpoplaasia diagnoose. Patsientide kui sporaadiliste haigusjuhtumite analüüsil leiti kolmes erinevas geenis liitheterosügootsete kandlusega mutatsioonide kombinatsioonid, mida pole varasemates uuringutes mainitud ning mis muudab leiud maailma neeruhaiguste geneetika teaduse jaoks unikaalseteks. Kandidaatvariandid valideeriti Sanger sekveneerimisega.

Patsiendil II-2 tuvastati mittesünonüümsete mutatsioonide senikirjeldamata kombinatsiooni liitheterosügootne kandlus geenides *INVS* (c.2803C>T) ja *NPHP3* (c.1390C>T). Ka varasemalt on kirjeldatud ühel nefronoftiisiga patsiendil mutatsioonide liitheterosügootne kandlus samades geenides. Mainitud geenides leitud mutatsioonide digeense, varem kirjeldamata kombinatsiooni tulemusena võis tekkida patsiendil CAKUT haigusrühma kuuluv nefronoftiis, mis oli tõenäoliselt ka neeru eemaldamise põhjuseks.

Patsiendil III-3 leiti kahe mittesünonüümse mutatsiooni senikirjeldamata kombinatsiooni liitheterosügootne (c.11525C>A ja c.2330G>A) kandlus geenis *PKHD1*. *PKHD1* geeni kodeeriva järjestuse mutatsioone seostatakse autosomaal-retsessiivse polütsüstilise neeruhaiguse tekkega. Kirjanduse põhjal piisab kahest mittesünonüümsest mutatsioonist selles geenis, et tekiks haiguse leebem vorm, mis ei põhjusta neonataalset surma, kuid mõjutab neerude arengut ning põhjustab tsüstide teket neis. Seega oleks patsiendi III-3 potentsiaalne täpsustatud diagnoos AR-PKD, mis viis komplikatsioonide vältimiseks neeru eemaldamiseni.

Tänu eksoomide sekveneerimisele osutus võimalikuks leida mõlema patsiendi haigusseoselised geenivariandid ning sellega täpsustada neile algselt määratud diagnoose. Eksoomide sekveneerimine aitas täiendada teadmisi CAKUT haigusrühma kuuluvate haiguste

geneetilisest taustast ja tekke- ja arengumehhanismidest, mis lihtsustab tulevikus pärilike neeruhaiguste diagnoosimist.

Exome sequencing in two patients with unilateral renal hypoplasia

Liina Pappa

Summary

CAKUT (congenital anomalies of kidney and urinary tract) occurs in 3-6/1.000 births. CAKUT consists of different and phenotypically heterogenous renal diseases which makes the diagnosis difficult. The most frequent techniques used to identify new candidate genes in CAKUT are: GWAS (genome wide association studies), exome sequencing and whole genome sequencing. As most disease-causing mutations are located in coding regions of the genome, the best technique to identifying genes involved in CAKUT, is whole-exome sequencing (WES), because it makes the process more cost efficient, the analysis faster and simpler than with alternative methods.

The aim of this study was to sequence the exomes of two patients with unilateral renal hypoplasia and specify the previously determined diagnoses. During the data prioritisation, no shared possibly causal variants were found in the patients, therefore both of them were examined as sporadic cases. As a result, compound heterozygous mutations in 3 different genes were found. None of the findings have been mentioned in previous studies which makes them unique findings in CAKUT genetics.

In patient II-2, two compound heterozygous mutations were found in the *INVS* (c.2803C>T) and *NPHP3* (c.1390C>T) genes. In a previous study, carried out by Hoefele *et al.*, two compound heterozygous mutations were found in a patient with nephronophthisis in the same genes (*INVS* and *NPHP3*). The digenic mutations found in the current study and the information from Hoefele *et al.* study suggest that the specified diagnosis of patient II-2 was nephronophthisis which led to the removal of one kidney.

In patient III-3, two compound heterozygous mutations (c.11525C>A and c.2330G>A) were found in the *PKHD1* gene. Mutations in the coding regions of *PKHD1* are associated with autosomal recessive polycystic kidney disease (AR-PKD). According to previous studies, two heterozygous mutations in *PKHD1* are sufficient to cause the milder phenotype of AR-PKD which affects the development of kidneys and formation of cysts. Based on previous

information and findings in the current study, it is possible to suggest that patient III-3 had AR-PKD which led to the removal of the kidney.

In conclusion, by sequencing the exomes of the two patients we were able to identify novel mutations in genes important for renal development and specify the diagnoses of both patients. The results found in the current study also clarify the genetic background of CAKUT and therefore help to simplify the future diagnosis of congenital kidney diseases.

Tänuõnad

Sooviksin siiralt tänada kõiki inimesi, kes aitasid ja toetasid mind magistritöö kirjutamisel. Tahaksin tänada oma juhendajaid Dr. Tiit Nikopensiust ja Dr. Lili Milanit soovitude, abi ja õpetussõnade eest. Veel sooviksin tänada Dr Kadri Lilienthali erialaste nõuannete ja tulemuste kinnitamise eest ja TÜ Eesti Geenivaramu direktorit, professor Andres Metspalu uurimistöö läbiviimise võimaluse eest.

Kasutatud kirjandus

1. Adzhubei, I., A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V., E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A., S., Sunyaev, S., R., 2010, A method and server for predicting damaging missense mutations, *Nat Methods.*, 7(4):248-249
2. Al-Bhalal, L., Akhtar, M., 2008, Molecular basis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD), *Adv Anat Pathol.*, 15(1):54-58
3. Ashraf, S., Hoskins, B., E., Chaib, H., Hoefele, J., Pasch, A., Saisawat, P., Trefz, F., Hacker, H., W., Nuernberg, G., Nuernberg, P., Otto, E., A., Hildebrandt, F., 2010, Mapping of a new locus for congenital anomalies of the kidney and urinary tract on chromosome 8q24, *Nephrol Dial Transplant.*, 25(5):1496-1501
4. Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A., 2014, Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology, *Viruses.*, 6(1): 106–136
5. Bergmann, C., 2014, ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies, *Pediatric Nephrology*
6. Bergmann, C., Senderek, J., Küpper, F., Schneider, F., Dornia, C., Windelen, E., Eggermann, T., Rudnik-Schöneborn, S., Kirfel, J., Furu, L., Onuchic, L., F., Rossetti, S., Harris, P., C., Somlo, S., Guay-Woodford, L., Germino, G., G., Moser, M., Büttner, R., Zerres, K., 2004, PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD), *Hum Mutat.*, 23(5):453-463
7. Bergmann, C., Fliegau, M., Brüchle, N., O., Frank, V., Olbrich, H., Kirschner, J., Schermer, B., Schmedding, I., Kispert, A., Kränzlin, B., Nürnberg, G., Becker, C., Grimm, T., Girschick, G., Lynch, S., A., Kelehan, P., Senderek, J., Neuhaus, T., J., Stallmach, T., Zentgraf, H., Nürnberg, P., Gretz, N., Lo, C., Lienkamp, S., Schäfer, T., Walz, G., Benzing, T., Zerres, K., Omran, H., 2008, Loss of Nephrocystin-3 Function Can Cause Embryonic Lethality, Meckel-Gruber-like Syndrome, Situs Inversus, and Renal-Hepatic-Pancreatic Dysplasia, *Am J Hum Genet.*, 82(4): 959–970
8. Chatterjee, R., Ramos, E., Hoffman, M., VanWinkle, J., Martin, D., R., Davis, T., K., Hoshi, M., Hmiel, S., P., Beck, A., Hruska, K., Coplen, D., Liapis, H., Mitra, R., Druley, T., Austin, P., Jain, S., 2012, Traditional and targeted exome sequencing reveals common, rare and novel functional deleterious variants in RET-signaling complex in a cohort of living US patients with urinary tract malformations, 131(11): 1725-1738

9. Cooper, G., M., Stone, E., A., Asimenos, G.; NISC Comparative Sequencing Program, Green, E., D., Batzoglou, S., Sidow, A., 2005, Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence, *Genome Res.*,15(7):901-913
10. Cukier, H., N., Dueker, N., D., Slifer, S., H., Lee, J., M., Whitehead, P., L., Lalanne, E., Leyva, N., Konidari, I., Gentry, R., C., Hulme, W., F., Booven, D., V., Mayo, V., Hofmann, N., K., Schmidt, M., A., Martin, E., R., Haines, J., L., Cuccaro, M., L., Gilbert, J., R., Pericak-Vance, M., A., 2014, Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders, *Mol Autism.*, 10;5(1):1
11. Danielsson, K., Mun, L., J., Lordemann, A., Mao, J., Lin, C., H., 2014, Next-generation sequencing applied to rare diseases genomics, *Expert Rev Mol Diagn.*, 14(4):469-487
12. Dakshinamurty, K., V., 2012 Polycystic Kidney Disease – ECAB, Digital Edition, Elsevier - Health Sciences Division, Gurgaon, Haryana, India
13. Denamur, E., Delezoide, A., L., Alberti, C., Bourillon, A., Gubler, M., C., Bouvier, R., Pascaud, O., Elion, J., Grandchamp, B., Michel-Calemard, L., Missy, P., Zaccaria, I., Le Nagard, H., Gerard, B., Loirat, C.; Société Française de Foetopathologie, Barbet, J., Beaufrère, A., M., Berchel, C., Bessières, B., Boudjemaa, S., Buenerd, A., Carles, D., Clemenson, A., Dechelotte, P., Devisme, L., Dijoud, F., Espérandieu, O., Fallet, C., Gonzalès, M., Hillion, Y., Jacob, B., Joubert, M., Kermanach, P., Lallemand, A., Laquerrière, A., Laurent, N., Liprandi, A., Loeuillet, L., Loget, P., Martinovic, J., Ménez, F., Nancy, F., Roux, J., J., Rouleau-Dubois, C., Sinico, M., Tantau, J., Wann, A., R., 2010, Genotype-phenotype correlations in fetuses and neonates with autosomal recessive polycystic kidney disease, *Kidney Int.*, 77(4):350-358
14. Elsharif, M., E., 2011, Mortality rate of patients with end stage renal disease on regular hemodialysis: a single center study, *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, May;22(3):594-596
15. Farrell, C., M., O'Leary, N., A., Harte, R., A., Loveland, J., E. et al., 2014, Current status and new features of the Consensus Coding Sequence database, *Nucleic Acids Res.*, 42(Database issue):D865-872
16. Fedeles, S., V., Gallagher, A., R., Somlo, S., 2014, Polycystin-1: a master regulator of intersecting cystic pathways, *Trends Mol Med.*, 20(5):251-260

17. Gilissen, C., Arts, H., H., Hoischen, A., Spruijt, L., Mans, D., A., Arts, P., 2010, Exome sequencing identifies WDR35 variants involved in Sensenbrenner syndrome, *Am. J. Hum. Genet.*, 87, 418–423
18. Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H., G., Veltman, J., A., 2012, Disease gene identification strategies for exome sequencing, *Eur J Hum Genet.*, 20(5):490-477
19. Gunay-Aygun, M., Font-Montgomery, E., Lukose, L., Tuchman, M., Graf, J., Bryant, J., C., Kleta, R., Garcia, A., Edwards, H., Piwnica-Worms, K., Adams, D., Bernardini, I., Fischer, R., E., Krasnewich, D., Oden, N., Ling, A., Quezado, Z., Zak, C., Daryanani, K., T., Turkbey, B., Choyke, P., Guay-Woodford, L., M., Gahl, W., A., 2010, Correlation of Kidney Function, Volume and Imaging Findings, and PKHD1 Mutations in 73 Patients with Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease, *Clin J Am Soc Nephrol.*, 5(6): 972–984
20. Haghghi, A., Nikuei, P., Haghghi-Kakhki, H., Saleh-Gohari, N., Baghestani, S., Krawitz, P., M., Hecht, J., Mundlos, S., 2013, Whole-exome sequencing identifies a novel missense mutation in EDAR causing autosomal recessive hypohidrotic ectodermal dysplasia with bilateral amastia and palmoplantar hyperkeratosis, *Br J Dermatol.*; 168(6):1353-1356
21. Hahn H., 2010, Genetics of kidney development: pathogenesis of renal anomalies. *Korean J Pediatr.* 53(7): 729–734.
22. Halvorson, C., R., Bremmer, M., S., Jacobs, S., C., 2010, Polycystic kidney disease: inheritance, pathophysiology, prognosis, and treatment, *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 3: 69–83
23. Hildebrandt, F., 2010, Genetic kidney diseases, *The Lancet*, 375(9722): 1287-1295
24. Hoefele, J., Wolf, M., T., O'Toole, J., F., Otto, E., A., Schultheiss, U., Dêschenes, G., Attanasio, M., Utsch, B., Antignac, C., Hildebrandt, F., 2007, Evidence of Oligogenic Inheritance in Nephronophthisis, *J Am Soc Nephrol.*, 18(10):2789-2795
25. Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T., K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., de Castro, E., Penny Coggill, P., Corbett, M., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R., D., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., McMenamin, C., Mi, H., Mutowo-Muellenet, P., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Pesseat, S., Punta, M., Quinn, A., F., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Selengut, J., D., Sigrist, C., J., A., Scheremetjew, M., Tate, J., Thimmajananathan, M., Thomas, P., D., Wu, C., H., Yeats, C., Yong, S.-Y., 2011,

- InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database, *Nucleic Acids Research*, 40(D1): D306–D312
26. Karolchik, D., Hinrichs, A., S., and Kent, W., J., 2011, The UCSC Genome Browser, *Curr Protoc Hum Genet.*, CHAPTER: Unit18.6
 27. Kenny, T., D., Beales, P., L., 2013 *Ciliopathies: A Reference for Clinicians* pp. 150-159, 194-214. Oxford University Press
 28. Kim, I., Fu, Y., Hui, K., Moeckel, G., Mai, W., Li, C., Liang, D., Zhao, P., Ma, J., Chen, X., Z., George, A., L. Jr., Coffey, R., J., Feng, Z., P., Wu, G., 2008, Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function, *J Am Soc Nephrol.*,19(3):455-468
 29. Kohl, S., Hwang, D., Y., Dworschak, G., C., Hilger, A., C., Saisawat, P., Vivante, A., Stajic, N., Bogdanovic, R., Reutter, H., M., Kehinde, E., O., Tasic, V., Hildebrandt, F., 2014, Mild Recessive Mutations in Six Fraser Syndrome-Related Genes Cause Isolated Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract, *J Am Soc Nephrol.*
 30. Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P., C., 2009, Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm, *Nat Protoc.*, 4(7):1073-1081
 31. Lancaster, M., A., Gleeson, J., G., 2010, Cystic Kidney Disease: the Role of Wnt Signaling, *Trends Mol Med.*, 16(8): 349–360
 32. Lienkamp, S., Ganner, A., Walz, G., 2012, Inversin, Wnt signaling and primary cilia, *Differentiation.*, 83(2):S49-S55
 33. López-Bigas, N., González-Pérez, A., 2011, Improving the Assessment of the Outcome of Nonsynonymous SNVs with a Consensus Deleteriousness Score, *Condell, American Journal of Human Genetics*, 88(4): 440–449
 34. Losekoot, M., Haarloo, C., Ruivenkamp, C., White, S., J., Breuning, M., H., Peters, D., J., 2005, Analysis of missense variants in the PKHD1-gene in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD), *Hum Genet.*, 118(2):185-206
 35. Menezes, L., F., Cai, Y., Nagasawa, Y., Silva, A., M., Watkins, M., L., Da Silva, A., M., Somlo, S., Guay-Woodford, L., M., Germino, G., G., Onuchic, L., F., 2004, Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm, *Kidney Int.*, 66(4):1345-1355
 36. Mergen, M., Engel, C., Müller, B., Follo, M., Schäfer, T., Jung, M., Walz, G., 2013, The nephronophthisis gene product NPHP2/Inversin interacts with Aurora A and

- interferes with HDAC6-mediated cilia disassembly, *Nephrol Dial Transplant.*, 28(11):2744-2753
37. Meynert. A., M., Bicknell, L., S., Hurles, M., E., Jackson, A., P., Taylor, M., S., 2013, Quantifying single nucleotide variant detection sensitivity in exome sequencing, *BMC Bioinformatics.*, 14:195
38. Nikopensius, T., Annilo, T., Jagomägi, T., Gilissen, C., Kals, M., Krjutškov, K., Mägi, R., Eelmeets, M., Gerst-Talas, U., Remm, M., Saag, M., Hoischen, A., Metspalu, A., 2013, Non-syndromic Tooth Agenesis Associated with a Nonsense Mutation in Ectodysplasin-A (EDA), *J Dent Res.* 92(6):507-511
39. Otto, E., A., Helou, J., Allen, S., J., O'Toole, J., F., Wise, E., L., Ashraf, S., Attanasio, M., Zhou, W., Wolf, M., T., Hildebrandt, F., 2008, Mutation analysis in nephronophthisis using a combined approach of homozygosity mapping, CEL I endonuclease cleavage, and direct sequencing, *Hum Mutat.*, Mar;29(3):418-426
40. Otto, E., A., Ramaswami, G., Janssen, S., Chaki, M., Allen, S., J., Zhou, W., Airik, R., Hurd, T., W., Ghosh, A., K., Wolf, M., T., Hoppe, B., Neuhaus, T., J., Bockenhauer, D., Milford, D., V., Soliman, N., A., Antignac, C., Saunier, S., Johnson, C., A., Hildebrandt, F., GPN Study Group., 2011, Mutation Analysis of 18 Nephronophthisis-associated Ciliopathy Disease Genes using a DNA Pooling and Next-Generation Sequencing Strategy, *J Med Genet.*, 48(2):105-116
41. Otto, E., A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J., F., Hiller, K., S., Mueller, A., M., Ruf, R., G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., Foreman, J., W., Goodship, J., A., Strachan, T., Kispert, A., Wolf, M., T., Gagnadoux, M., F., Nivet, H., Antignac, C., Walz, G., Drummond, I., A., Benzing, T., Hildebrandt, F., 2003, Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination, *Nat Genet.*, 34(4): 413–420
42. Pooler, C., 2009, *Porth Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*, pp.794-796, Lippincott Williams & Wilkins
43. Pruitt, K., D., Brown, G., R., Hiatt, S., M., Thibaud-Nissen, F., Astashyn, A., Ermolaeva, O., Farrell, C., M., Hart, J., Landrum, M., J., McGarvey, K., M., Murphy, M., R., O'Leary, N., A., Pujar, S., Rajput, B., Rangwala, S., H., Riddick, L., D., Shkeda, A., Sun, H., Tamez, P., Tully, R., E., Wallin, C., Webb, D., Weber, J., Wu, W., Dicuccio, M., Kitts, P., Maglott, D., R., Murphy, T., D., Ostell, J., M., 2014, RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Res.* 1;42(1):D756-763

44. Rabbani, B., Mahdieh, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H., Inoue, I., 2012, Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders, *J Hum Genet.*, 57(10):621-632
45. Rabbani, B., Tekin, M., Mahdieh, N., 2014, The promise of whole-exome sequencing in medical genetics, *Journal of Human Genetics*, 59, 5–15
46. Rademakers, R., Baker, M., Nicholson, A. M., Rutherford, N. J., Finch, N., Soto-Ortolaza, A., 2011, Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids, *Nat. Genet.*, 44: 200–205
47. Raykova, D., Klar, J., Azhar, A., Khan, T., N., Malik, N., A., Iqbal, M., Tariq, M., Baig, S., M., Dahl, N., 2014, Autosomal Recessive Transmission of a Rare KRT74 Variant Causes Hair and Nail Ectodermal Dysplasia: Allelism with Dominant Woolly Hair/Hypotrichosis, *PLoS One.*, 9(4):e93607
48. Renkema, K., Y., Winyard, P., J., Skovorodkin, I., N., Levchenko, E., Hindryckx, A., Jeanpierre, C., Weber, S., Salomon, R., Antignac, C., Vainio, S., Schedl, A., Schaefer, F., Knoers, N., V., A., M., Bongers, E., M., H., F., for the EUCAKUT consortium, 2011, Novel perspectives for investigating congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT), *Nephrol Dial Transplant*, 26: 3843–3851
49. Rossetti, S., Torra, R., Coto, E., Consugar, M., Kubly, V., Málaga, S., Navarro, M., El-Youssef, M., Torres, V., E., Harris, P., C., 2003, A complete mutation screen of PKHD1 in autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD) pedigrees, *Kidney Int.*, 64(2):391-403
50. Saisawat, P., Tasic, V., Vega-Warner, V., Kehinde, E.O., Günther, B., Airik, R., Innis, J., W., Hoskins, B.E., Hoefele, J., Otto, E.A., Hildebrandt, F. (2012) Identification of two novel CAKUTcausing genes by massively parallel exon resequencing of candidate genes in patients with unilateral renal agenesis. *Kidney International*, 81: 196-200
51. Saitsu, H., Osaka, H., Sasaki, M., Takanashi, J., Hamada, K., Yamashita, A., Shibayama, H., Shiina, M., Kondo, Y., Nishiyama, K., Tsurusaki, Y., Miyake, N., Doi, H., Ogata, K., Inoue, K., Matsumoto, N., 2011, Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA Polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy, *Am J Hum Genet.*, 89(5):644-651
52. Salomon, R., Saunier, S., Niaudet, P., 2009, Nephronophthisis, *Pediatr Nephrol.*, 24(12):2333-2344

53. Sanders, S., J., Murtha, M., T., Gupta, A., R., Murdoch, J., D., Raubeson, M., J., Willsey, A., J., 2012, De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism, *Nature* 485, 237–241
54. Sanna-Cherchi, S., Caridi, G., Weng, P., L., Scolari, F., Perfumo, F., Gharavi, A., G., Ghiggeri, G., M., 2007, Genetic approaches to human renal agenesis/hypoplasia and dysplasia, *Pediatr Nephrol.*, 1675–1684
55. Schrier, S., A., Bodurtha, J., N., Burton, B., Chudley, A., E., Chiong, M., A., D'Avanzo, M., G., Lynch, S., A., Musio, A., Nyazov, D., M., Sanchez-Lara, P., A., Shalev, S., A., Deardorff, M., A., 2012, The Coffin-Siris syndrome: A Proposed Diagnostic Approach and Assessment of 15 Overlapping Cases, *Am J Med Genet A.*, 158A(8): 1865–1876
56. Sharp, A., M., Messiaen, L., M., Page, G., Antignac, C., Gubler, M., C., Onuchic, L., F., Somlo, S., Germino, G., G., Guay-Woodford, L., M., 2005, Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts, *J Med Genet.*, 42(4):336-349
57. Sherry, S., T., Ward, M., H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E., M., Sirotkin, K., 2001, dbSNP: the NCBI database of genetic variation, *Nucleic Acids Res.*, 29(1):308-311
58. Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J., S., Hinrichs, A., S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L., W., Richards, S., Weinstock, G., M., Wilson, R., K., Gibbs, R., A., Kent, W., J., Miller, W., Haussler, D., 2005, Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes, *Genome Res.*, 15(8):1034-1050
59. Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Sakalar, Y., B., Hasanefendioglu-Bayrak, A., 2010, MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes, *Am. J. Hum. Genet.*, 87, 679–686
60. Song, R., Yosypiv, I., V., 2010 Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract, *Pediatr Nephrol.*, 26(3): 353-364
61. Stanković, A., Zivković, M., Kostić, M., Atanacković, J., Krstić, Z., Alavantić, D., 2010, Expression profiling of the AT2R mRNA in affected tissue from children with CAKUT, *Clin Biochem.*, 43(1-2):71-75
62. Sweeney Jr, W., E., Avner, E., D., 2014, Pathophysiology of childhood polycystic kidney diseases: new insights into disease-specific therapy, *Pediatric Research*, 75, 148–157

63. Zhang, D., Lu, L., Yang, H., B., Li, M., Sun, H., Zeng, Z., P., Li, X., P., Xia, W., B., Xing, X., P., 2012, Exome sequencing identifies compound heterozygous PKHD1 mutations as a cause of autosomal recessive polycystic kidney disease, Chinese Medical Journal, 125(14):2482-2486
64. Tory, K., Rousset-Rouvière, C., Gubler, M.-C., Morinière, V., Pawtowski, A., Becker, C., Guyot, C., Gié, S., Frishberg, Y., Nivet, H., Deschênes, G., Cochat, P., Gagnadoux, M.-F., Saunier, S., Antignac, C., Salomon, R., 2009, Mutations of NPHP2 and NPHP3 in infantile nephronophthisis, Kidney International 75, 839–847
65. Wolf, M., T., F., Hildebrandt, F., 2011, Nephronophthisis, Pediatric Nephrology, 26(2):181-194
66. Yosypiv, I., V., 2012, Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract: A Genetic Disorder?, Int. J. Nephrol.

Kasutatud veebiaadressid

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>

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

<http://www.humgen.rwth-aachen.de>

<http://www.icd10data.com/>

<http://www.icd10data.com/ICD10CM/Codes/Q00-Q99/Q60-Q64/Q60->

<http://www.illumina.com>

<http://www.lifetechnologies.com/>

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

<http://www.mjr.com>

<http://www.mutationtaster.org/>

Lisad

Tabel 1. PCR-i jaoks kasutatud praimeritepaarid

Geen	Praimeri nimetus	Järjestus 5'-3'	Amplikoni pikkus
<i>INVS</i>	INVS15F	TCA GGA GGT GTT TGA TAA TGG A	336 bp
	INVS15R	AGT GGT TTG GGG GAA TTT TAG T	
<i>NPHP3</i>	NPHP10F	GCT CAG TCT TTG AAT AAT CTG GC	418 bp
	NPHP10R	ATT TAA CAA AAC AAA CCC AGC A	
<i>PKHD1</i> (ekson 23 jaoks)	PKHD23F	CCC AAC CCA GAC GTT AAT ACT T	310 bp
	PKHD23R	TGT CAC TTT CAG ACA CTG GAAA	
<i>PKHD1</i> (ekson 65 jaoks)	PKHD65F	ATT GGT ATG GAA GGT TGG TCT G	437 bp
	PKHD65R	CTT CTT TTA AGC CAA CAG CAC A	

Tabel 2. PCR programm

	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Algne denaturatsioon	95°C	15 min	
Denaturatsioon	95°C	25 s	4×
Praimerite seondumine	64°C	30 s	
	-0,5°C per cycle		
Praimerite ekstensioon	72°C	40 s	
Denaturatsioon	95°C	25 s	30×
Praimerite seondumine	62°C	30 s	
Praimerite ekstensioon	72°C	40 s	
Lõpp-ekstensioon	72°C	5 min	
	6°C	∞	

Species	Match	Gene	aa	Alignment
H.sapiens			935	Q R A W R S Y Q L R R K H L S H L R H M K Q L G A
mutated	all conserved		935	Q R A W R S Y Q L R R K Y L S H L R H M K Q L G
P.troglodytes	all identical	ENSPTRG00000021189	935	Q R A W R S Y Q L R R K H L S H L R H M K Q L G
M.mulatta	all identical	ENSMUG00000001524	934	Q R A W R S Y Q L R R K H L S H L R H T K Q L G
F.catus	no homologue			
M.musculus	all identical	ENSMUSG00000028344	933	Q R A W R S Y Q L R R K H L S R L L H L K Q L G
G.gallus	not conserved	ENSGALG00000013441	977	T W R S Y R L R Q E L S Q L L S A K R Q R
T.rubripes	no homologue			
D.rerio	not conserved	ENSDARG00000002213	887	Q R A W R R S C V R G R I R K V L C R S L K G V E
D.melanogaster	no alignment	FBgn0260487	n/a	
C.elegans	no alignment	ZC15.7	n/a	
X.tropicalis	not conserved	ENSXETG00000023058	978	Q K A W R T Y W I S K S Y R T T R H

Joonis 10. *INVS* geenis oleva mutatsiooni c.2803C>T konserveerumine (väljavõte: MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>).

Species	Match	Gene	aa	Alignment
H.sapiens			1184	H P S L A Y T V K H L A I L Y K K M G K L D K A
mutated	not conserved		1184	H P S L A Y T V K H L T I L Y K K M G K L D K
P.troglodytes	all identical	ENSPTRG00000040799	1170	H P S L A Y T V K H L A I L Y K K M G K L D K
M.mulatta	all identical	ENSMUG00000021772	1185	H P S L A Y T V K H L A I L Y K K M G K L D K
F.catus	all identical	ENSFCAG00000019390	960	H P S L A Y T V K H L A I L Y K K M G K L D K
M.musculus	all identical	ENSMUSG00000032558	1179	H P S L A Y T V K H L A I L Y K K T G K V D K
G.gallus	all identical	ENSGALG00000011703	1170	H P S L A Y T V K H L A V L Y K K M G K L D
T.rubripes	all identical	ENSTRUG00000017819	1160	H P S L A Y T L K H L A M L Y K R R G K L E K
D.rerio	all identical	ENSDARG00000078261	1156	H P S L A Y T L K H L A M L Y K R R G K L
D.melanogaster	no homologue			
C.elegans	all conserved	C18C4.10	381	D P N V A K T K N N L S S A Y L K Q G K Y K E
X.tropicalis	no alignment	ENSXETG00000008477	n/a	

Joonis 6. *NPHP3* geenis oleva mutatsiooni c.1390C>T konserveerumine (väljavõte: MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>).

Species	Match	Gene	aa	Alignment
H.sapiens			777	G T E E G S G L V L V T T Q R R Q R T S P P L G
mutated	not conserved		777	G T E E G S G L V L V M T Q R
P.troglodytes	all identical	ENSPTRG00000018272	777	G T E E G S G L V L V T T Q R
M.mulatta	no alignment	ENSMMUG00000016993	n/a	
F.catus	no homologue			
M.musculus	all identical	ENSMUSG00000043760	775	G T G D G S E L I E V T A Q R
G.gallus	no homologue			
T.rubripes	no homologue			
D.rerio	no homologue			
D.melanogaster	no homologue			
C.elegans	no homologue			
X.tropicalis	no homologue			

Joonis 7. *PKHD1* geenis eksonis 23 oleva mutatsiooni c.2330G>A konserveerumine (väljavõte: MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>).

species	Match	Gene	aa	Alignment
H.sapiens			3842	V T S P P G V N F T A R S K P F A V L P V T R K
mutated	not conserved		3842	V T S P P G V N F T A I S K P F A V L P V T R
P.troglodytes	all identical	ENSPTRG00000018272	3842	V T S P P G V N F T A R S K P F A V L P V T R
M.mulatta	no alignment	ENSMMUG00000016993	n/a	
F.catus	no homologue			
M.musculus	all identical	ENSMUSG00000043760	3835	V T S P P G V N F T A R S R T F V V L P V A S
G.gallus	no homologue			
T.rubripes	no homologue			
D.rerio	no homologue			
D.melanogaster	no homologue			
C.elegans	no homologue			
X.tropicalis	no homologue			

Joonis 8. *PKHD1* geenis eksonis 65 oleva mutatsiooni c.11525C>A konserveerumine (väljavõte: MutationTaster, <http://www.mutationtaster.org/>).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liina Pappa

(autori nimi)

(sünnikuupäev:17.04.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Eksoomide sekveneerimine kahel unilateraalse neeru hüpoplaasiaga patsiendil
(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Tiit Nikopensus ja Lili Milani,
(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 alates **26.05.2015** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014 *(kuupäev)*