

Pikkade järjestuste koopiaarvu varieerumine inimese genoomis

Priit Palta

Varieerumine inimese genoomis

- SNP-d
- Väikesed insertioon/deletsioon polümorfismid
- Kordusjärjestused
- Genoomi struktuursed muutused

Pikkade järjestuste koopiaarvu polümorfismid

- **CNP**-d e. pikkade järjestuste koopiaarvu polümorfismid (large-scale copy number polymorphisms) *Sebat et al.*

vs.

- **LCV**-d e. pikkade järjestuste koopiaarvu variatsioonid (large-scale copy-number variations) *lafrate et al.*

Pikkade järjestuste koopiaarvu polümorfismid e. CNP-d

- Järjestused, mille pikkused on vahemikus 100 kb – 2Mb
- Paiknevad hajutatult üle kogu genoomi
- Suur osa sellistest polümorfismidest hõlmavad ka geene

CNP uurimine inimese genoomis

- ROMA (Sebat *et al.*)
- Array-CGH (Iafrate *et al.*)

- 
- 
- Sebat' uurimisrühm

Mida tehti?

- Omavahel võrreldi 20 karüotüübiliselt ja fenotüübiliselt normaalse, mitte suguluses oleva inimese genoome
- Pikkade järjestuste koopiaarvu polümorfismide leidmiseks kasutati **ROMA** meetodit (representational oligonucleotide microarray analysis)

ROMA meetod

- Meetod seisneb selles, et mõõdetakse kahe erinevalt märgistatud DNA suhtelist kontsentratsiooni, hübridiseerides neid DNA järjestusi oligotele (mis on kiibil). Kiibilt saadavad signaalid ja signaalide tugevused detekteeritakse.

Sebat *et al.*

Mida tehti?

- Kiipidel kasutati lühikesi spetsiifiliselt disainitud oligoid (85 k)
- Keskmiselt 1 proov iga 35 kb kohta inimese genoomis

Mida tehti?

- Genoomse DNA kompleksust vähendati, lõigates seda restriктаasiga (põhikatsel - Bgl II, kontrollimisel - Hind III)
- Saadud proovide pikkused jäid vahemikku 200 – 1200 aluspaari

Mida tehti?

- Kiipidel olnud oligonukleotiidid disainiti *in silico* inimese teadaoleva genoomse järjestuse alusel nii, et nad oleksid komplementaarsed restriksioonifragmentidega

Mida tehti?

- Hübridisatsioonandmeid analüüsiti HMM-i (Hidden Markov model) abil, mis oli disainitud leidma DNA koopiaarvu erinevusi kiibilt saadud signaalide alusel

Sebat *et al.*

Mida tehti?

- Ignoreeriti erinevusi, mis võisid olla tekkinud somaatiliste muutuste (mutatsioonide) tõttu

Tulemused

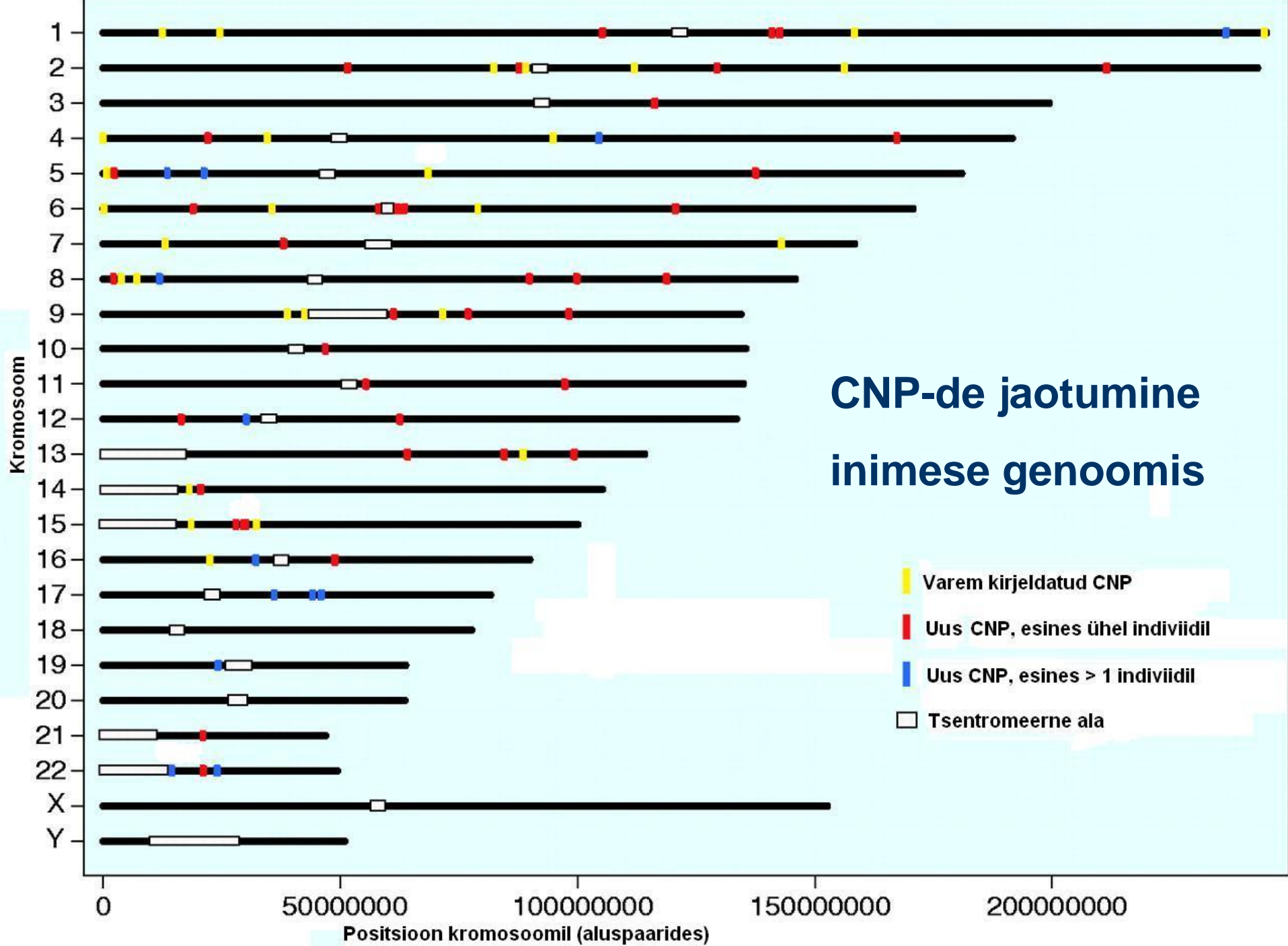
- Leiti 221 CNP, millest 76 olid unikaalsed (varem kirjeldamata)
- Kontrolliti 12 CNP, millest 11 leidsid kinnitust ka tsütogeneetiliste meetoditega (FISH)

Tulemused

- 70 CNP hõlmasid teadaolevaid geene
- Mitmed CNP olid kordistanud või “ära kaotanud” geene, mida seostatakse neuroloogiliste hälvetega ja vähi tekkega

Tulemused

- Mõned CNP esinesid piirkondades, mille *de novo* muutused võivad põhjustada erinevaid arenguhälbeid (Prader-Willi sündroom, Angelman'i sündroom, kassisilma sündroom, jt)



Sebat *et al.*

Mis plaanis?

- Teha 380 k kiip, et avastada võimalikult palju CNP-sid
- Uurida täpsemalt geneetiliste haiguste ja arenguhälvete seost CNP-dega

- 
- 
- lafrate uurimisrühm

Mida tehti?

- Uuriti 55 omavahel mitte suguluses olevat inimest
- Pikkade järjestuste koopiaarvu polümorfismide leidmiseks kasutati **array-CGH** meetodit (array-based comparative genomic hybridization)

Array-CGH meetod

- Array-CGH meetodi puhul märgistatakse uuritav DNA ja kontroll-DNA erinevalt fluorestseeruvate märgistega ja kohübridiseeritakse kiibil olevatele järjestustele. Kiipidelt saadavad signaalid detekteeritakse ja analüüsitakse.

lafrate *et al.*

Mida tehti?

- Kiipidel kasutati pikki DNA fragmente (genoomseid BAC kloone)
- Keskmiselt 1 proov iga Mb kohta inimese genoomis

Iafrate *et al.*

Mida tehti?

- 39 normaalse karüotüübi ja fenotüübiga inimese genoome võrreldi normaalsete kontroll-indiviidide genoomidega
- Uuriti ka 16 kromosomaalsete anomaaliatega inimese genoome, et kontrollida meetodi täpsust

Tulemused

- Lisaks teadaolevatele anomaaliatele leiti 255 piirkonda (CNP), mis erinesid uuritud indiviididel võrreldes kontroll-indiviididega
- Esines nii juurdetulekuid (gains) kui ka kaotsiminekuid (losses), mis paiknesid genoomis korrapäratult (?)

Tulemused

- Keskmiselt leiti ühel inimesel 12,4 CNP
- Leitud 255-st CNP-st esinesid:
 - 102 CNP-d rohkem kui ühel uuritud inimesel, nendest 24 CNP-d rohkem kui viiel uuritud inimesel

Tulemused

- 102-st sagedamini esinenud CNP-st paiknesid:
 - 25,5% piirkondades, kust on ka varem leitud duplikatsioon/deletsioonid
 - 12,7% piirkondades, kus on käesolevas inimese genoomi versioonis “augud”

Tulemused

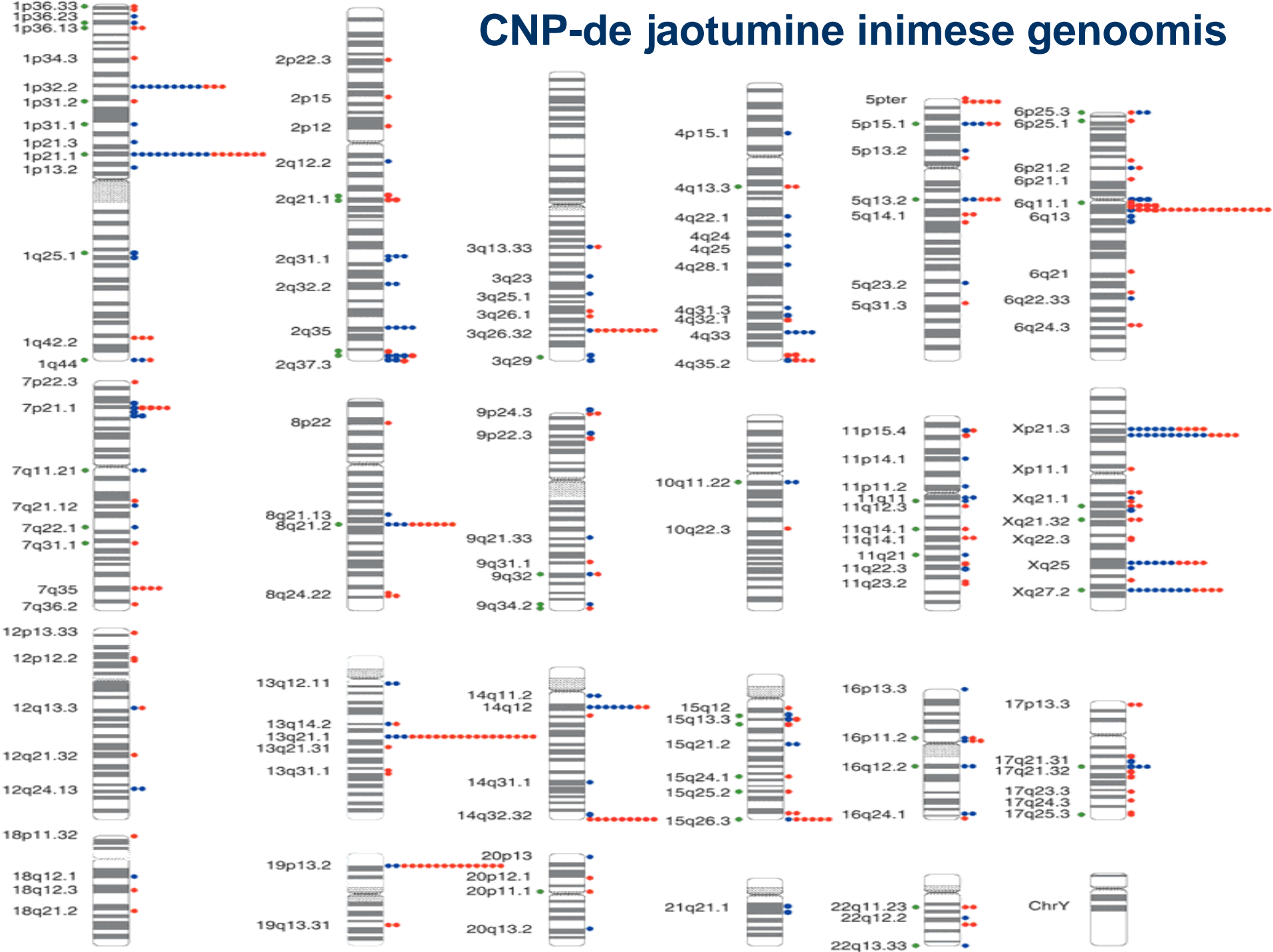
- 142 (255-st) CNP paiknesid regioonides, kus on teadaolevad kodeerivad järjestused
- 67 CNP hõlmasid terviklikult vähemalt ühte geeni

lafrate *et al.*

Tulemused

- 14 CNP-d paiknesid regioonides või regioonide lähedal, mida on eelnevalt seostatud geneetiliste sündroomide või vähi esinemisega

CNP-de jaotumine inimse geenomis



Kasulikku bioinformaatikule

- Genome Variation Database

<http://projects.tcag.ca/variation/>

- The Human Recent Segmental Duplication Browser

<http://projects.tcag.ca/humandup/>

Kasutatud kirjandus

- N. P. Carter “As normal as normal can be?”
Nature Genetics, vol. 36/9, p. 931-932, sept. 2004
- J. Sebat *et al.* “Large-scale Copy Number Polymorphism in the Human Genome”
Science, vol. 305, p. 525-528, juuli 2004
- A. J. Iafrate *et al.* “Detection of large-scale variation in the human genome”
Nature Genetics, vol. 36/9, p. 949-951, sept. 2004