

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

Triin Kikas

**Raseduskomplikatsioonide biomarkerid ning leitud geenide
ekspressiooni mõjutavad eQTLid**

Magistritöö

Juhendajad Prof. Maris Laan

Kristiina Rull, MD, PhD

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	9
1.1 Rasedustüsistused	9
1.1.1 Preeklampsia.....	9
1.1.2 Gestatsioonidiabeet.....	11
1.1.3 Loote kasvu kõrvalekalded: gestatsiooniaja kohta väiksed ning suured vastündinud	11
1.2. Geenide diferentsiaalse ekspressiooni uuringud	12
1.2.1. Ülegenoomse diferentsiaalse geeniekspressiooni meetodid.....	12
1.2.2.1. Geeniekspressiooni kiibid.....	12
1.2.2.2. RNA sügav-sekveneerimine	13
1.2.2. Ülegenoomsete meetoditega saadud tulemuste valideerimine	14
1.2.3. Geeniekspressiooni erinevused platsentas rasedustüsistuste korral ülegenoomsete uuringute põhjal	14
1.2.3.1. Preeklampsia uuringud	15
1.2.3.2. Gestatsioonidiabeedi uuringud	17
1.2.3.3. Lapse kasvuhäirete uuringud	18
1.3. Geeniekspressiooni mõjutavad lookused ehk eQTLid.	18
1.3.1. Definiitsioon ja uurimismetoodikad	18
1.3.2. Inimese genoomis identifitseeritud eQTLide profiil	19
1.3.3 Platsenta eQTLid	20
1.4 Biomarkerid rasedustüsistuste ennustamiseks ja varaseks avastamiseks	20
1.4.1. Biomarkeri mõiste ja tüübid	20
1.4.2. Biomarkerite eripärad seoses rasedusega	21
1.4.3. Täna kliinikus rasedustüsistuste ennetamiseks kasutatavad biomarkerid	21
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1 Eesmärgid ja uurimistöö plaan	23
2.2 Materjal ja meetodika.....	24
2.2.1 REPROMETA valim.....	24

2.2.2 Käesolevas töös kasutatud alavalimid	25
2.2.3. Platsenta transkriptoomi diferentsiaalse ekspressiooni andmete top-geenide valideerimine ja replitseerimine	27
2.2.3.1 Käesolevas töös uuritavate geenide valik platsenta RNASeq andmetest	27
2.2.3.2 cDNA süntees	30
2.2.3.3 Taqman RT qPCR	30
2.2.3.4. RT-qPCR andmete analüüs	31
2.2.4 Rasedustüsistustele potentsiaalsete biomarkerite filtreerimise põhimõtted.....	32
2.2.5. Genotüpiseerimine Sequenom platvormil	32
2.2.6 Kandidaatgeenide ekspressiooni mõjutavate platsenta <i>cis</i> -eQTL-ide tuvastamine.....	33
2.3 Tulemused	35
2.3.1 Kandidaatgeenide validatsioon.....	35
2.3.2 Validatsiooni parimate geenide bioloogiline taust	38
2.3.3 Potentsiaalsed biomarkerid.....	40
2.3.4 Kandidaatgeenide <i>cis</i> -eQTL analüüs.....	41
2.4 Arutelu	47
2.4.1 RT-qPCR kui RNAseq validatsioonimeetod.....	47
2.4.2 Potentsiaalsed biomarkerid.....	47
2.4.3 Kandidaatgeenide <i>cis</i> -eQTLid.....	48
2.4.4. Potentsiaalsed uurimistöö arengusuunad.....	49
KOKKUVÕTE.....	51
SUMMARY	52
KIRJANDUSE LOETELU.....	53
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	62
LISAD	63
LISA 1	63
LISA 2	64
LISA 3	65
LIHTLITSENTS.....	68

KASUTATUD LÜHENDID

ABCA12 – *ATP-binding cassette; sub-family A member 12*

ADAMTSL4 – *(A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)-like 4*

ADM – *adrenomedulin*

AFP – *alpha-fetoprotein*

AQPEP – *Aminopeptidase Q, laeverin*

BCL6 – *B-cell CLL/lymphoma 6*

C10orf54 – *chr 10 open reading frame 54*

CAM – *chorioamnionitis, koorioamnioniit*

cDNA – *komplementaarne DNA*

CDR2L – *cerebellar degeneration-related protein 2-like*

CRH – *corticotropin releasing hormone*

CRLF1 – *cytokine receptor-like factor 1*

CSF3R – *colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)*

C_T – *threshold cycle, tsüklite arv*

DACT2 – *dapper; antagonist of beta-catenin; homolog 2*

ddH₂O – *destilleeritud vesi*

DDX60L – *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like*

DLX3 – *distal-less homeobox 3*

DLX4 – *distal-less homeobox 4*

DOT1L – *DOT1-like; histone H3 methyltrans-ferase*

E – *efektiivsus*

ECM1 – *extracellular matrix protein 1*

ENG – *endoglin*

eQTL – *expression quantitative trait loci, ekspressiooni taset mõjutav lookus*

FAM65B – *family with sequence similarity 65; member B*

FC – *fold change, gruppidevaheline erinevus kordades*

fc(UBC) – *indiviidi uuritava geeni ekspressioonitaseme erinevus kordades referentsgeenist (UBCst)*

FDR – *False discovery rate, valeavastusmäär*

FLT1 – *fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)*

FPKM - *Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments*, fragmente kb kohta miljoni joondatud fragmendi kohta

FSTL3 – *follistatin-like 3*

GD, G – gestatsioonidiabeet

GDPD5 – *glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5*

GLTSCR1 – *glioma tumor suppressor candidate region gene 1*

GRAMD1A – *GRAM domain containing 1A*

HELLP - *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low PlateletP count*, hemolüüs, kõrgeenenud maksaensüümide tase, madal vereliistakute tase

HSD11B2 – *hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2*

HSD11B2a – *hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2*

HSD17B1 – *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1*

HTRA4 – *High-temperature requirement factor A4, HTRA serine peptidase 4*

IgA – immunoglobuliin A

IGFBP1 – *insulin-like growth factor binding protein 1*

IGHA1 – *immunoglobulin heavy constant alpha 1*

INHA – *inhibin, alpha*

INHBA – *inhibin, beta A*

IPMK – *inositol polyphosphate multikinase*

ITPK1 – *inositol-tetrakisphosphate 1-kinase*

ITPK1-AS1 – *ITPK1 antisense RNA 1*

IUGR – *intrauterine growth restriction*, emakasisene kasvupeetus

KIAA1211 – iseloomustamata valk KIAA1211

KLC2 – *kinesin light chain 2*

Kof – kofaktor

LD – *linkage disequilibrium*, aheldustasakaalus

LEP – *leptin*

LGA, L – *large for gestational age*, gestatsiooniaja kohta suur vastsündinu

LHB – *luteinizing hormone beta*

LTBP3 – *latent trans-forming growth factor beta binding protein 3*

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*, mass-spektromeetria metoodika

MC1R – *melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)*

Min.alleel – minoorne alleel

MIR205HG – *MIR205 host gene*

miRNA – mikro RNA

MYO7B – *myosin VIIB*

N – konrollgrupp

OTUD5 – *OTU domain containing 5*

PAPPA2 - *pappalysin 2*

PE, P – preeklampsia

PIGF – *placental growth factor*

Pl.kaal – platsenta kaal

PLIN2 – *perilipin 2*

RELL2 – *RELT-like 2*

REPROMETA – REPROgrammed fetal and/or maternal METAbolism

RFX1 – *regulatory factor X; 1*

RNA-seq – RNA sügav-sekveneerimine

RPKM - *Reads Per Kilobase per Million mapped reads*, lugemeid kb kohta miljoni joondatud lugemi kohta

RT-qPCR – reaalaja kvantitatiivne PCR

SAP – *shrimp alkaline phosphatase*, aluseline fosfataas

SD – standardhälve

SEMA3F – *sema domain; immunoglobulin domain (Ig); short basic domain; secreted; (semaphorin) 3F*

SERPINA3 – *serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3*

SGA, S – *small for gestational age*, gestatsiooniaja kohta väike vastsündinu

SH3PXD2A – *SH3 and PX domains 2A*

SLC16A3 – *solute carrier family 16; member 3 (monocarboxylic acid trans-porter 4)*

SLC25A35 – *solute carrier family 25; member 35*

SLC26A11 – *solute carrier family 26; member 11*

SPINT1 – *serine peptidase inhibitor; Kunitz type 1*

SRCIN1 – *SRC kinase signaling inhibitor 1*
STS – *steroid sulfatase (microsomal); isozyme S*
STX1B – *syntaxin 1B*
ZNF469 – *zinc finger protein 469*
TEAD3 – *TEA domain family member 3*
TES – transkriptsiooni lõppsait
TET3 – *tet methylcytosine dioxygenase 3*
TMEM74B – *trans-membrane protein 74B*
TMEM8A – *trans-membrane protein 8A*
TMPRSS6 – *trans-membrane protease; serine 6*
TREM1 – *triggering receptor expressed on myeloid cells 1*
TSS – transkriptsiooni algussait
UBC – *ubiquitin C*
uE3 – *unconjugated estriol*, konjugeerimata östriool
UTR – *untrans-lated region*, transleerimata regioon
VEGF – *vascular endothelial growth factor*
 β -hCG – inimese koorioni gonadotropiin, beeta subühik

SISSEJUHATUS

Platsenta on ainuke ajutine organ inimkehas. Sellest tulenevalt on platsental unikaalne geeniekspressioon, mis kohandub raseduse jooksul loote vajadustele. Kui aga platsenta geenide ekspressiooni regulatsioon on häiritud, ilmnevad mitmesugused probleemid olenevalt häire tekkeajast. Mitmete hiliste rasedustüsistuste puhul on näidatud normaalsest erinevat geeniekspressiooniprofiili sünnitusjärgsetes platsentades. Biomarkerina oleks võimalik kasutada genee, mille ekspressioonimuutus toimub võimalikult varases raseduses. Samas on siis võimalik geeniekspressiooni muutusi määrata vaid valgude taseme alusel. Eelistatud on mitteinvasiivset lähenemist võimaldavad biomarkerid, mille produktid/valgud on määratavad ema vereseerumist.

Meie laboris varasemalt läbi viidud platsenta transkriptoomi uuringus (Sõber *et al*) leiti mitmeid erinevusi rasedustüsistustega (preeklampsia, gestatsioonidiabeet, suured ja väiksed vastündinud) platsentade geeniekspressioonis. Kõik mainitud raseduskomplikaatsioonid mõjutavad ema ja lapse heaolu raseduse ja sünnituse ajal ning ka hilisemas elus. Seni on aga vähe kirjeldatud biomarkereid, mis juba varases raseduses võimaldaksid ennustada rasedustüsistuse kujunemist piisava tundlikkuse ja spetsiifilisusega.

Käesoleva magistritöö üldfookus on platsenta geeniekspressiooniprofiilid rasedustüsistustes. Minu magistritöö keskendub Sõber *et al* uuringus normaalsest erineva ekspressioonitasemega geenide hulgast valitud kandidaatgeenide valideerimisele RT-qPCRiga ning nende geenide ekspressiooni mõjutavate DNA variantide tuvastamisele. Teiseks eesmärgiks on filtreerida kandidaatgeenide seast potentsiaalselt rasedustüsistuse biomarkerina ema seerumist määratavad geenid.

Märksõnad: rasedustüsistused, geeniekspressioon platsentas, biomarker, eQTL

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rasedustüsistused

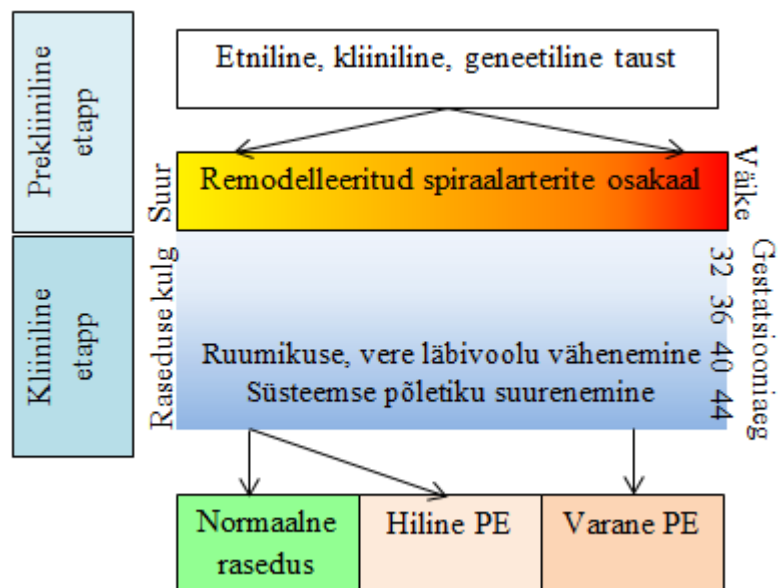
1.1.1 Preeklampsia

Preeklampsia (PE) on rasedusaegne tüsistus, mis esineb raseduse teisel poolel. Eestis oli aastal 2013 preeklampsiaga tüsistunud 2,1% rasedustest (Allvee ja Karro, 2014), ülemaailmne preeklampsia esinemissagedus on 3,2%, koos eklampsiaga (preeklampsia raskeim vorm) põhjustab üle 60 000 ema surma aastas (World Health Organization, 2005). Preeklampsia on süsteemne haigus, mis kahjustab mitmeid ema organeid: veresoonte endoteeli, neere, aju jm. Sellest tulenevalt on PE diagnoosimine keerukas. Klassikalisteks sümptomiteks loetakse raseduse ajal kõrgenenud vererõhku (vähemalt 140/90 mmHg) ilma eelneva hüpertensioonita ning proteiinuuria vähemalt 0,3g valku 24 tunni uriinist (English *et al.*, 2015). Lisaks võib raskete vormide korral esineda nägemishäireid, peavalu, iiveldust ning ülakõhuvalu. Preeklampsia jagatakse kliiniliste sümptomite ilmnemise aja järgi varaseks ja hiliseks preeklampsiaiks. Hilise PE puhul tekivad sümptomid peale 36. rasedusnädalat ning haigus on tavaliselt kergema kujuga, kuid sagedamini tekivad emapoolsed tüsistused nagu HELLP sündroom (hemolüüs, kõrgenenud maksaensüümide tase, madal vereliistakute tase) ning eklampsia. Varase preeklampsia puhul tekivad sümptomid enne 34. rasedusnädalat ning sellega kaasneb sageli loote kasvupeetus ja enneaegne sünnitus (Staff *et al.*, 2013).

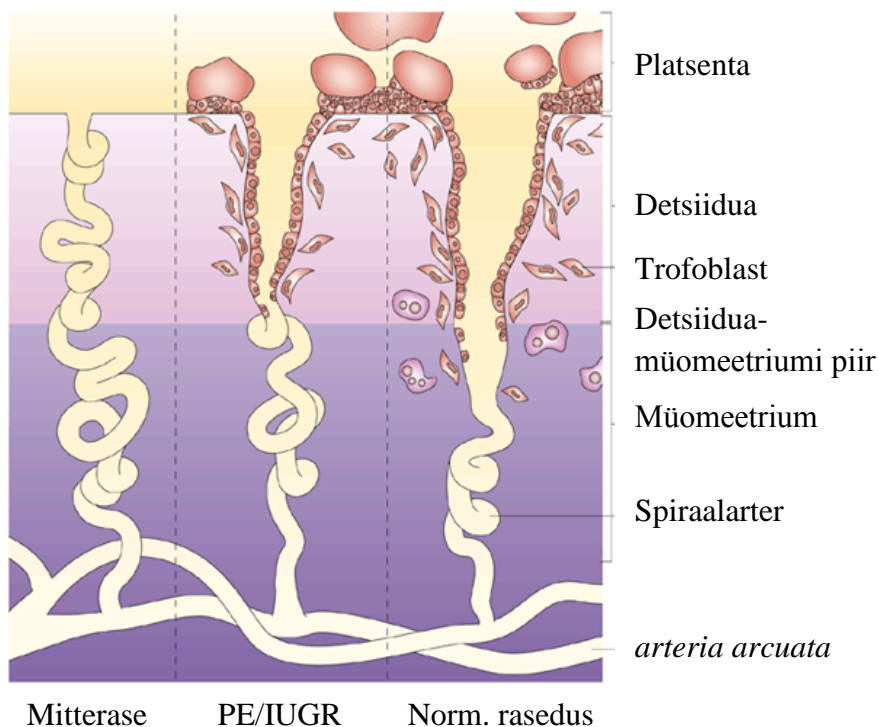
Preeklampsia puhul on näidatud mitmeid riskitegureid, nii vanemate kui ka lootepoolseid. Kasutades eelnevalt teadaolevaid kliinilisi ja epidemioloogilisi andmeid, on võimalik arvutada rasedale riskiskoor, mille alusel on võimalik leida riskigruppi kuuluvad rasedad ning neid sagedamini jälgida. Peamised riskitegurid preeklampsia tekkeks on eelnev preeklampsiaga tüsistunud rasedus, antifosfolipiidsündroom, diabeet, mitmikrasedus, esmasrasedus, preeklampsia esimese ringi sugulastel, ülekaalulisus, vanus üle 40 eluaasta, eelnev hüpertensiooni olemasolu (English *et al.*, 2015).

Täpne preeklampsia etioloogia on teadmata, kuid on näidatud, et preeklampsia tekkeks piisab vaid platsenta olemasolust (Staff *et al.*, 2013). Praeguse teooria kohaselt kujuneb preeklampsia kahes etapis (joonis 1). Prekliinilises etapis 8.-18. rasedusnädalal ei toimu uteroplatsentaalsete spiraalarterite remodelleerimine piisaval määral (joonis 2) ning sellest tulenevalt on häiritud

platsenta verevarustus ning kujuneb oksüdatiivne stress. Pärast 20. rasedusnädalat põhjustab süsteemne veresoonte endoteeli põletik kliinilise etapi (Tannetta *et al.*, 2013).



Joonis 1. Preeklampsia kujunemine kaheetapilise teooria alusel. Kohandatud Redman *et al.*, 2014 järgi.



Joonis 2. Spiraalarterite remodelleerimine normaalses raseduses ning preeklampsia korral. (Moffett-King, 2002)

1.1.2 Gestatsioonidiabeet

Gestatsioonidabeet (GD) on raseduse jooksul esmakordselt diagnoositud diabeet. Gestatsioonidiabeedi sagedus varieerub 1-14% (American Diabetes Association, 2003), Eestis diagnoositi aastal 2013 gestatsioonidiabeet 4,4% rasedatel (Karro ja Allvee, 2014). Diabeedi üldine sagenemine ja varasem tekkeaeg ning sünnitajate vanuse tõus viimastel aastatel on toonud kaasa ka rasedusaegse diabeedi sagedasema esinemise.

Gestatsioonidiabeet on seotud kõrgema riskiga mitmete terviseprobleemide tekkeks nii emal (sünnitusteede trauma, suurem risk operatiivseks sünnituseks, preeklampsia), lapsel (makrosoomia, õlgade düstokia, sünnitusabitrauma, hüpoglükeemia) kui ka pärast rasedust (2. tüüpi diabeedi teke) (Schwartz *et al.*, 2015). Gestatsioonidiabeedi tekke riskigruppi kuuluvad rasedad, kes on ülekaalulised, kellel on esinenud eelnevalt GD või esineb glükosuuria ning kelle perekonnas esineb diabeeti.

1.1.3 Loote kasvu kõrvalekalded: gestatsiooniaja kohta väiksed ning suured vastsündinud

Nagu eelnevalt mainitud võib rasedusaegsete haiguste tagajärjel kaasneda loote kasvu häired. Gestatsiooniaja kohta suur vastsündinu (*large for gestational age*, LGA) on tavaliselt defineeritud sünnikaaluga üle 90. protsentiili populatsiooni kasvukõveral ning gestatsiooniaja kohta väike vastsündinu (*small for gestational age*, SGA) alla 10. protsentiili. Vastsündinute kasvu hindamiseks kasutatakse Ponderali indeksit, mis näitab kaalu ja pikkuse suhet gestatsiooniajast sõltumatult.

SGA alavormiks on üsisisene kasvupeetus (*intrauterine growth restriction*, IUGR), mille puhul jääb loote kasvupotentsionaal saavutamata kas geneetilise haiguse, infektsiooni või muul põhjusel. Kuigi enamus IUGR vastsündinuid on alla 10. kasvuprotsentiili, on mõned normaalpiiridesse jääva kaaluga. Sellest tulenevalt on SGA ja IUGR eristamine keeruline. Samas on IUGR vastsündinute riskid tüsistusteks veelgi kõrgemad (Bamberg ja Kalache, 2004).

Lisaks preeklampsiale tõstavad SGA vastsündinu riski mitmed muud tegurid nagu ema etniline taust, esmasrasedus, ema lühike kasv ning madal kaal. Arenenud maades on üheks peamiseks SGA riskifaktoriks suitsetamine raseduse ajal (McCowan ja Horgan, 2009). LGA riskiteguriteks on ema diabeet, ülekaal ning suur kaaluüve (Catalano *et al.*, 2012). Samuti on näidatud, et LGA-na sündinud naistel on kahekordne risk saada suure kaaluga vastsündinuid (Ahlsson *et al.*, 2007).

Liiga väike või liiga suur vastündinu kaal tõstab riski mitmete tüsistuste tekkeks perinataalselt (sünnitrauma) ning ka hilisemas eas. Kõrge sünnikaaluga kaasneb kõrgenenud risk hilisemaks ülekaaluks, diabeedi tekkeks, kardiovaskulaarhaigusteks ning vähi tekkeks (Rasmussen ja Johansson, 1998; Bhasin ja Kapoor, 2014; O'Neill *et al.* 2015). Madala sünnikaaluga lastel on näidatud suuremat riski haigestuda kardiovaskulaarhaigustesse ning vaimuhaigustesse (Lahti *et al.*, 2015).

1.2. Geenide diferentsiaalse ekspressiooni uuringud

1.2.1. Ülegenoomse diferentsiaalse geeniekspressiooni meetodid

1.2.2.1. Geeniekspressiooni kiibid

RNA-kiibid on kõige levinum ülegenoomne meetod geenide ekspressiooni mõõtmiseks. Enamasti kasutatakse selleks klaaskiipi, mille pinnale on hübridiseeritud oligonukleotiid-sihtmärgid, alternatiivina on võimalik katta kiibi pind mikrokuulikestega, mille pinnale seotakse sihtmärk.

Tüüpilises tööskeemis kasutatakse uuritavat ning kontroll-RNAd, mis märgistatakse erinevate fluorestsentsmärgistega. Mõlemad proovid segatakse ning kantakse kiibile, kus RNA lõigud hübridiseeruvad komplemetaarsetele sihtmärkidele. Kinnitumata proovid pestakse maha ning iga positsiooni fluorestsentsi suhtelist intensiivsust mõõdetakse skänneriga. Tulemusena saadakse indiviidi geenide suhtelised ekspressioonid (Sealfon ja Chu, 2011). Kiipidevaheliste erinevuste vähendamiseks eemaldatakse toorandmetest taustamüra ning need normaliseeritakse (Irizarry *et al.*, 2003).

Mikrokiibid on olnud peamiseks ülegenoomi geeniekspressiooni uurimismeetodiks alates 1990ndatest. Mikrokiipide suureks eeliseks on veel nende suhteline odavus ning saadavate andmete lihtsam analüüs, samas on neil ka mitmeid puuduseid. Näiteks tausta hübridisatsioon limiteerib ekspressiooni mõõtmise täpsust, eriti madala ekspressioonitasemega transkriptide puhul. Lisaks erinevad ka kiibil kasutatavate sihtmärkide hübridisatsiooni tugevused ning kiipidelt saab informatsiooni ainult nende geenide kohta, millele on disainitud vastavad sihtmärgid (Zhao *et al.*, 2014).

1.2.2.2. RNA sügav-sekveneerimine

RNA sügav-sekveneerimine ehk RNA-seq on oluline tööriist transkriptoomi uurimises, võimaldades näidata terve genoomi ekspressiooni. RNA sekveneerimises on viis põhilist etappi: eksperimendi disain, RNA ettevalmistamine, raamatukogude valmistamine, sekveneerimine ning andmete analüüs.

Esimeses laboratoorses etapis eraldatakse RNA uuritavast rakulisest materjalist ning kogu RNAST eemaldatakse rRNA. Vastavalt soovile võib eraldada ainult mRNA-d või kõik transkribeeritud RNAd, kus sisalduvad ka miRNAd. Seejärel toimub RNA fragmenteerimine, cDNAks konverteerimine ning raamatukogu valmistamine. Raamatukogu ettevalmistuse käigus liidetakse cDNA lõikudele platvormspetsiifilised adapter-järjestused, mis on vajalikud hilisemaks sekveneerimiseks. Sekveneerimine teostakse valitud platvormil vastavalt platvormispetsiifilisele protokollile. Tavaliselt toimub alguses fragmentide kloonalne amplifikatsioon tahkel kandjal, Illumina puhul on tahkeks kandjaks kiip, teistes on kasutuses *bead*-süsteem emulsioon (Voelker *et al.*, 2014).

Andmete analüüs algab toorandmete protsessimisest, mille käigus eemaldatakse ebakvaliteetsed lugemid. Seejärel joondatakse allesjäänud lugemid referentsi alusel geeni transkriptidele. Pärast joondamist leitakse lugemite arv, mis langesid eksonitele, transkriptile või geenile, et leida vastava geeni ekspressiooni hinnang. Kui on saadud esialgsed hinnangud lugemite arvu kohta proovides, tuleb kindlasti teostada ka normaliseerimine. Üks lugemite arvu kallutatuse põhjus peitub erinevate proovide sekveneermis-sügavuse erinevuses ning üldiselt skaleeritakse iga eksperimendi lugemite arvud sekveneerimissügavuse suhtes igas proovis. Teine peamine kallutatuse põhjus tuleneb geenide erinevatest pikkustest, kuna suurtesse geenidesse koguneb rohkem lugemeid. Mõlema kallutatuse arvesse võtmiseks kasutatakse ühte kahest ühikust – RPKM (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*) või FPKM (*Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped*) (Finotello ja Di Camillo, 2015).

RNA sekveneerimine on näidanud suurt potentsiaali mikrokiipide asendamiseks. Lisaks geeniekspressioonile, on võimalik leida ka uusi transkripte, vaadata alleelispetsiifilist ekspressiooni ning splaiss-saite. Erinevalt mikrokiipidest ei sõltu RNA sekveneerimine ka eelnevast informatsioonist genoomi kohta ning väldib hübriidisatsioonist tulenevat kallutatust, mis esineb mikrokiipidel. Samas on RNA sekveneerimise suur probleem saadavate suuremahuliste

andmete analüüs ning hoiustamine, kuid olemasolevaid meetodeid täiustatakse pidevalt (Zhao *et al.*, 2014).

1.2.2. Ülegenoomsete meetoditega saadud tulemuste valideerimine

Peamiseks kandidaatgeenide ekspressiooni määramise ning mikrokiipidel saadud tulemuste valideerimise viisiks on reaalaaja kvantitatiivne PCR (*real-time quantitative PCR*, RT-qPCR). Meetodit saab kasutada juba väga väikese algse transkriptide koguse juures ning on hea tundlikkuse, täpsuse ning lihtsa protokolliga (Heid *et al.*, 1996). RT-qPCR põhineb PCR produktide detekteerimisel peale iga amplifikatsiooni tsükli ning kvantitatiivse mõõduna kasutatakse tsüklite arvu (*threshold cycle*, C_T), kus fluorestsentsi tase ületab minimaalse detektsioonitaseme, mis on määratud lävena (*threshold*) (Higuchi *et al.*, 1992). Samas saab RT-qPCRi kasutada ainult koos *housekeeping*-geeniga ehk referentsgeeniga, millega võrreldakse uuritava geeni ekspressiooni. Referentsgeen peab olema alati stabiilse ekspressiooniga, vastasel juhul ei saa analüüsil usaldusväärseid tulemusi. Seega peaks olema eelnevalt näidatud referentsgeeni stabiilsus.

Teiseks võimaluseks valideerida mikrokiipidel saadud tulemusi on *Northern blot* meetod. *Northern blot* põhineb RNA hübridisatsioonil agarosgeelil. Selle meetodi eeliseks on ensümaatiliste vaheetappide puudumine, mis võimaldab saada tehniliste moonutusteta tulemusi. Samas nõuab *Northern blot* meetod suuremat kogust RNAd ning sellega on keerulisem tuvastada madala ekspressiooniga gene. (Ding *et al.*, 2007)

Selleks, et valideerida geeni ekspressiooni erinevusest tulenevat valgu kontsentratsiooni erinevust, on vajalik läbi viia analüüs kudedes. Selleks võib kasutada *Western blot* analüüsi koe homogenaadiga või immunohistokeemiat koelõikudes.

1.2.3. Geeniekspressiooni erinevused platsentas rasedustüsistuste korral ülegenoomsete uuringute põhjal

Platsenta on väga oluline loote kasvuks ja arenguks raseduse algusest peale, võimaldades ema ja lootevahelist gaaside, toitainete ning jääkainete vahetust. Samuti kaitseb platsenta loodet ema immuunsüsteemi rünnaku eest ning tagab immuuntolerentsi säilimise raseduse jooksul. Lisaks sekreteerib platsenta mitmesuguseid raseduse jaoks olulisi hormone ning kasvufaktoreid (Rossant ja Cross, 2001). Häiritud platsentatsiooni regulatsioon põhjustab mitmesuguseid

tüsistusi: trofoblastiline haigus emal (Hui *et al.*, 2005), preeklampsia (Cross, 2003), loote kasvupeetus (Chaddha *et al.*, 2004). Seega on platsenta oluline uurimisobjekt mõjutades raseduses nii last kui ema.

1.2.3.1. Preeklampsia uuringud

Mitmed mikrokiibi uuringud on näidanud preeklampsia puhul platsentas geeniekspressiooni muutusi, kokkuvõtte neist on tabelis 1. Sagedasemad geenid, mis on artiklites välja toodud, on *LEP*, *FLT1*, *INHA*, *PAPPA2* ning *ENG*. Samas pole paljudes artiklites välja toodud leitud parimaid gene p-väärtuse alusel, vaid need, mis kattuvad varasemate artiklitega. Lisaks puudub mõnedes artiklites ka ülevaade alla- ja ülesreguleeritud geenide jaotuvusest. Seega on keeruline teha järeldusi uute oluliste preeklampsia geenide suhtes. Samuti on enamus töid tehtud väikestes valimites, kus on suur roll juhuslikkusel.

Hiljuti viis Leavey *et al* läbi uuringu, mis koondas seitsme eelneva uuringu mikrokiipide andmed. Sel viisil saadi laiendatud valim, mis koosnes 77 preeklamptilisest platsentast ning 96 kontrollist. Uuringus leiti, et valim klasterdus geeniekspressiooni aluses kolmeks, kus ühes grupis oli ainult PE indiviidid ning kahes teises segu PE ja kontrollidest. Kasutades 10 PE ennustusmarkerit (*LEP*, *HTRA4*, *FSTL3*, *CGB*, *TREMI*, *ENG*, *PAPPA2*, *FLT1*, *INHBA*, *INHA*) oli võimalik korrektselt eristada 95% ainult PE klasteri indiviididest, samas kui teistest klastritest pärit PE indiviide eristati 40-50%. Preeklampsia on selgelt heterogeenne ning praegu teadaolevad peamised markerid suudavad kindlalt tuvastada ainult ühte alagruppi (Leavey *et al.*, 2015).

Tabel 1. Kokkuvõtte varasemalt läbi viidud mikrokiibi uuringutest preeklampsia platsentades. Rasvaselt on märgitud geenid, mis leiti vähemalt 3 uuringus.

Viide	Valim (PE/N)	Mikrokiip	Üles-reguleeritud	Ülesreguleeritud kandidaatgeenid	Alla-reguleeritud	Allareguleeritud kandidaatgeenid
(Jarvenpaa <i>et al.</i> , 2007)	2/3	Affymetrix Human U133 plus 2.0	4	<i>EPAS1, FLT1, SIGLEC10, ANG4</i>	9	<i>ECGF1, JAG1, COL18A1, TNFSF12, VEGF, ANPEP, PDGFA, SERPIN12</i>
(Enquobahrie <i>et al.</i> , 2008)	18/18	Operon Human genome array ready oligo set	58	<i>LEP, FLT1, PCDHA3, CYP11A, F2R, IL9, FCGR2B, CDO1, VGLL1, EBI3, INSL4, BCL6, INHA</i>	2	<i>MGC1132, NR4A2</i>
(Winn <i>et al.</i> , 2009)	12/11	Affymetrix HG-U133A / HG-U133B	41	<i>FLT1, LEP, CRH, SIGLEC6, PAPP2, INHA, ENG, HTRA1</i>	14	<i>HSD17B1, ASB2, CA10</i>
(Sitras <i>et al.</i> , 2009)	16/21	Applied Biosystems Human genome survey microarray v2.0	213	<i>LEP, FLT1, FLT4, β-hCG, ENG, LAEVERIN, BCL6, INHA, MMP14, PAPP2</i>	82	<i>PDGFD</i>
(Founds <i>et al.</i> , 2009)	4/8	Affymetrix HG-U133 Plus 2.0	5	<i>CCK, CTGA2</i>	31	<i>FSTL3, MMP12, LAIR2, S100A8</i>
(Lee <i>et al.</i> , 2010)	13/13	Agilent Human 4X44K	121	<i>CXCR6, CXCL3, OSM, LEP, FLT1, VEGFA, SMOX, CYP26A, EGLN3, LDHA, CRY2L1</i>	294	
(Hoegh <i>et al.</i> , 2010)	11/18	Affymetrix HG-U133A Gene Chip	12	<i>LEP, INHA</i>	9	<i>TXNRD1</i>
(Várkonyi <i>et al.</i> , 2011)	6/5	Agilent 44K inimese kogugenoomi oligo set	350*	<i>LEP, CGB, TREM1, LHB, SIGLEC6, PAPP2</i>		<i>KRT81, OPRK1</i>
(Tsai <i>et al.</i> , 2011)	23/37	Illumina Human6- v2 BeadArray	83	<i>SIAE, PIK3R1, ENG, LEP, PAPP2, NANS, INHA, FLT1</i>	45	<i>RHOG, CD4, ST6GAL1</i>

(Chang <i>et al.</i> , 2011)	13/10	Human 15K kiip		<i>HSPA1B, LIMS1, PLAGL1, TRIM31, PPP2R2C</i>		<i>RNF128, ADM, ARFIP1</i>
(Nishizawa <i>et al.</i> , 2011)	8/8	Affymetrix Human Exon 1.0 ST	94	<i>INHBA, INHA, FLRG, BCL6, LEP, PAPP2, FLT1, ENG, CGB, CRH</i>	88	<i>GSTA3</i>
(Mayor-Lynn <i>et al.</i> , 2011)	7/7	Illumina Human Ref-12 v3 Expression BeadChip	1	<i>CRH, MMP-1</i>	119	<i>SCOS1, CRHBP, ADAM-17, TIMP3, STC2</i>
(Meng <i>et al.</i> , 2012)	6/6	Illumina Human HT-12 V4 BeadChip	483	<i>BTNL9, HMBS, ULBP1, CHRNA1, RMRP</i>	456	<i>INSL6, CXCL9, TMCC1, PAGE2</i>
(Lapaire <i>et al.</i> , 2012)	9/7	Affymetrix GeneChip Human 1.0 ST	896*	<i>B-hCG, HTRA4, CRHBP, LHB, QPCT, CD97, MMP19, ADAM2, INHBC</i>		<i>CCL3, NOX4, VCAM1, FOSB, CX3CR1</i>
(Xiang <i>et al.</i> , 2013)	5/7	Roche Nimblegen Gene Expression 12×135 K	137	<i>LEP, SH3PXD2A, ENG</i>	114	<i>JAG1</i>
(Song <i>et al.</i> , 2013)	5/5	Agilent SurePrint G3 Human GE 8 × 60K	91	<i>LEP, FLT1, CRH, INHBA, INHA, BCL6, PAPP2, SH3PXD2A, CYP11A1</i>	133	<i>TFRC, CXCL12, SEPP1, SLC8A1, CD36, CYBB</i>

* - diferentsiaalse ekspresiooniga geenide arv kokku

1.2.3.2. Gestatsioonidiabeedi uuringud

Gestatsioonidiabeeti on seni uuritud vaid kolmes ülegenoomses RNA mikrokiibi uuringus. Radaelli *et al* uuringus identifitseeriti 435 geeni, millest 253 olid ülesreguleeritud ning 181 allareguleeritud; Enquobahrie *et al* uuringus tuvastati 66 ülereguleeritud geeni ning Zhao *et al* uuringus tuvastati 243 geeni, millest 69 oli ülesreguleeritud ning 174 allareguleeritud. Nende uuringu tulemustes kattus vaid üks geen – *LEP*, samas kõigis uuringutes olid rikastatud immuunsusega seotud funktsionaalsed rajad (Enquobahrie *et al.*, 2009; Radaelli *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2011).

1.2.3.3. Lapse kasvuhäirete uuringud

Vastsündinu kaaluhäirete kohta on tehtud samuti suhteliselt vähesed ülegenoomsed ekspressiooni mikrokiibi uuringuid. Madeleneau *et al* uuringus võrreldi IUGR geeniekspressioone kontrollide vastu ning identifitseeriti 636 geeni, mille ekspressioon oli üle 1,5 korra erinev kahe grupi vahel, sealhulgas *LEP*, *IGFBP1* ning *SERPINA3* (Madeleneau *et al.*, 2015). Struwe *et al* uuringus identifitseeriti 157 normaalsest erinevalt ekspresseerunud geeni, sealhulgas *IGFBP1*, prolaktiin, *LEP* ja *CRH* (Struwe *et al.*, 2010). Eelnevates uuringutes märgitud geenid on enamuses ära märgitud ka preeklampsia uuringutes, seetõttu ei ole üllatav, et Toft *et al* uuringus, mis võrdles SGA ja PE geeniekspressiooni profiile, erinevusi kahe grupi vahel ei leitud (Toft *et al.*, 2008).

Gestatsiooniaja kohta suurte vastsündinute kohta varasemalt ülegenoomset ekspressiooni uuringut läbi viidud ei ole.

1.3. Geeniekspressiooni mõjutavad lookused ehk eQTLid.

1.3.1. Definitsioon ja uurimismetoodikad

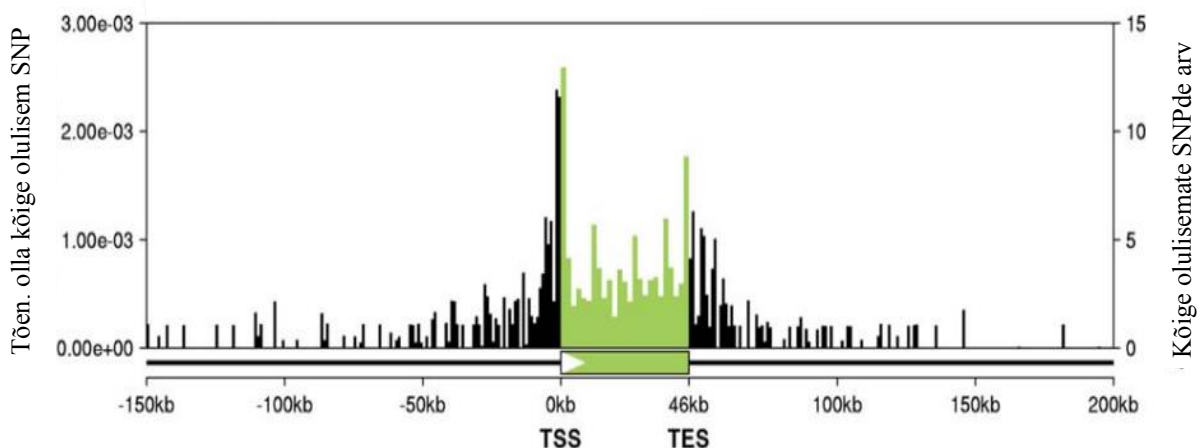
DNA järjestusest tulenev geneetiline variatsioon, mis mõjutab geenide ekspressiooni on oluline osa geenide regulatsioonis. Selliseid funktsionaalse efektiga varieeruvaid lookuseid, milleks on tavaliselt SNPd, nimetatakse eQTLideks (*expression quantitative trait loci*). Vastavalt lookuse kaugusele mõjutatavast geenist jagatakse need *cis*- ja *trans*-eQTLideks. Piirid, mille alusel neid jagatakse, varieeruvad, sagedamini defineeritakse *cis*-eQTLid kui SNP, mis paikneb kuni 1Mb kaugusel geeni transkriptsiooni algussaidist. *Trans*-eQTLid, mis asuvad mõjutatavast geenist eemal või koguni teisel kromosoomil, omavad enamasti geeni ekspressioonile väiksemat efekti kui *cis*-eQTLid (Bryois *et al.*, 2014). Lisaks on näidatud, et *trans*-eQTLid on enamasti koespetsiifilised, *cis*-eQTLidest on koespetsiifilised ainult umbes üks kolmandik (Grundberg *et al.*, 2012).

eQTL uuringuid viiakse läbi kasutades mikrokiipe või RNA sekveneerimisandmeid genotüüpide ning geenide ekspressiooni määramiseks. Uuringud teostatakse kas perekondades aheldatuse alusel (Göring *et al.*, 2007) või populatsioonides assotsiatsioonide alusel (Cheung *et al.*, 2005).

1.3.2. Inimese genoomis identifitseeritud eQTLide profiil

Enamus statistiliselt olulisi SNPsid paikneb mõjutatava geeni sees või vahetus läheduses. Kõige tihedamalt on olulisi eQTL SNPsid transkriptsiooni algussaidi ümbruses (*transcription start site*, TSS) ning vahetult ülesvoolu transkriptsiooni lõppsaidist (*transcription end site*, TES), nagu on näha joonisel 3. Lisaks on näidatud, et funktsionaalselt olulistest SNPdest vaid <7% asub geenist kaugemal kui 20kb. Kui TSS läheduses asuvad SNPd mõjutavad ilmselt geeni transkriptsiooni initsiatsiooni, siis arvatakse, et TES eQTLid võivad mõjutada geenide ekspressiooni transkripti stabiilsuse või degradatsiooni kiiruse kaudu (Veyrieras *et al.*, 2008).

Varasemalt on eQTLid uuritud inimeses mitmetes kudedes. Ühes suurimas eQTL uuringus (valim $n=2708$) identifitseeriti täisverest 3847 eQTLi, millest 3176 olid *cis*-eQTLid (500kb geenist) ning 144 *trans*-eQTLid (Schramm *et al.*, 2014). Grundberg *et al* (2012) identifitseerisid $n=856$ valimis 3529, 4625 ja 2796 *cis*-eQTLi (1Mb geenist) vastavalt rasvkoest, lümfoblasti rakuliinist ning nahakoest. Lisaks tuvastati samas uuringus 639, 557 ja 609 *trans*-eQTLi vastavalt rasvkoest, lümfoblastidest ning nahast. Nagu näha, erinevad leitud eQTLid eri kudedes ka samadel indiviididel. Südame lihaskoest (valim $n=180$) on tuvastatud 771 eQTL, millest 770 on *cis*-eQTLid (1Mb geenist), mis mõjutasid 428 transkripti ekspressiooni (Koopmann *et al.*, 2014). Tuvastatud eQTLide arv sõltub analüüsi võimsusest, mida mõjutab kõige enam valimi suurus. *Cis*-eQTLide arvu mõjutab ka konkreetses uuringus kasutatud definitsioon, mille alusel neid määratakse.



Joonis 3. Statistiliselt oluliste eQTLide paiknemine geeni (roheline ala) ümbruses, keskmise pikkusega (20-100kb) geeni näitel. TSS – transkriptsiooni stardisait, TES – transkriptsiooni lõppsait (Veyrieras *et al.*, 2008 alusel)

1.3.3 Platsenta eQTLid

Nagu eelnevalt mainitud, on platsenta väga oluline organ raseduse normaalse kulu tagamiseks. Seni aga pole läbi viidud ühtegi ülegenoomset eQTL analüüsi platsenta koes. Kuna suur hulk eQTL-e avalduvad koespetsiifiliselt, ei saa teha järeldusi platsenta geeniekspressiooni regulatsiooni kohta teistes kudedes identifitseeritud eQTLide alusel. Lisaks on platsenta ainuke ajutine organ inimkehas ning seetõttu omab unikaalset geeniekspressiooni ning selle regulatsiooni. Platsenta puhul peab selle geeniekspressioon muutuma raseduse jooksul vastavalt loote arengule. Näiteks raseduse alguses on vajalik spetsiifiline geeniregulatsioon, et toimuks korrektne implantatsioon emakaseina. Hilisemas järgus on olulisemad loote kasvu ja organite diferentseerumist mõjutavad geenid. Raseduse erinevatel perioodidel häirunud geeniekspressioonimustrid avalduvad erineva kliinilise pildina. Raseduse varases järgus võib tekkida raseduse katkemine või loote väärarengud, raseduse lõpupoole tekivad loote kasvuhäired ning ema ainevahetushäired.

1.4 Biomarkerid rasedustüsistuste ennustamiseks ja varaseks avastamiseks

1.4.1. Biomarkeri mõiste ja tüübid

Biomarkerid on mitmesugused tunnused, mis viitavad mõnele bioloogilisele protsessile või olekule (Pletcher ja Pignone, 2011). Biomarkereid saab jagada diagnostilisteks, prognostilisteks ning geneetilisteks.

Diagnostilisi biomarkereid kasutatakse koos kliiniliste sümptomitega haiguste diagnoosimiseks, kuid see tähendab ka, et nende ilmnemise ajaks on haigus juba olemas ja/või progresseeruv. Paljude haiguste juures on oluline võimalikult varajane sekkumine, seega ei ole diagnostiliste biomarkerite kasutus alati piisav. Prognostiliste markeritena saab kasutada mitmeid biomolekule, mis on seotud haiguse patofüsioloogiaga ning mille puhul on teada nende piirtase normi ja hilisemalt areneva haiguse eristamiseks.

Komplekssete haiguste patofüsioloogia on aga keeruline ja heterogeenne ning biomolekulide kontsentratsioon kehavedelikes võib ajas muutuda. Seega on väga oluline proovi võtmise aeg, et sellistel markeritel oleks ennustuslik väärtus. DNA püsib aga ajas muutumatuna ning seega on võimalik selliste markeritega ennustada haigusrisi juba näiteks sünnil. Geneetiliste markeritena

saab kasutada mitmeid erinevaid polümorfseid genoomijärjestusi, näiteks SNPsid, haplotüüpe, deletsioone, insertsioone.

1.4.2. Biomarkerite eripärad seoses rasedusega

Biomarkerite kasutamisel raseduse ajal on mitmesugused nüansid, mis puuduvad teiste haigusmarkerite puhul.

Selleks, et oleks võimalik sekkuda hilisemalt tekkivate rasedustüsistuste puhul, on vajalik võimalikult varane teadmine, et midagi on valesti. Näiteks kromosoomanomaaliate puhul on raseduse katkestamine võimalik kui rasedus on kestnud vähem kui 22 nädalat ning vajab kindlat diagnoosi võimalikult vara. Ka teiste raseduskomplatsioonide puhul võiks olla kasu just varases raseduses sekkumisest. Nagu eelnevalt mainitud on preeklampsial prekliiniline etapp, kus määratakse hilisemate sümptomite väljakujunemine. On näidatud, et aspiriini manustamine riskigrupis teise trimestri alguses vähendab hilisema raske PE tekke tõenäosust (CLASP Collaborative Group, 1994). Seega on rasedustüsistuste biomarkerite määramiseks suhteliselt kitsas ajaaken, ning varases raseduses määratavad markerid on eelistatud.

Teiseks probleemiks biomarkerite määramisel raseduse ajal on markeri määramise koht. Mitmed markerid pärinevad lootelt ja/või ema ning loote kokkupuutepinnalt. See oleneb ka rasedustüsistuse põhjusest, kas probleem on ema- või loote poolne. Kõige lihtsam on biomarkerit määrata ema verest, kuna vereproove võetakse regulaarselt ning see meetod oleks väheinvasiivne. Ema verest määratavat markeri kontsentratsiooni on aga keerulisem interpreteerida biomolekulide puhul, mis läbivad platsentat ning jõuavad ema verre. Sel juhul on raske kindlaks teha, kui palju on loote poolset mõju. Samas võib haigusele viidata vaid ema või ainult loote biomolekuli kontsentratsiooni kõrvalekalle normist ning seega on sellised biomarkerid vähem informatiivsed. Kõik loote poolsed biomolekulid ei läbi aga platsentat ning neid ema verest määrata ei ole võimalik. Otsene loote biomolekulide määramine võimalik vaid invasiivsete meetoditega nagu lootevee uuring.

1.4.3. Täna kliinikus rasedustüsistuste ennetamiseks kasutatavad biomarkerid

Eestis määratakse praegu esimese trimestri sõeluuringu käigus PAPP-A ning vaba β -hCG tase. Nende ning teiste raseda andmete põhjal arvutatakse individuaalne riskiskoor, mille alusel määratakse vajadusel edasised uuringud ning nõustamisvõimalused. Teise trimestri sõeluuringul

määratakse verest kolme valgu sisaldus: AFP, hCG ning uE3. Sarnaselt esimese trimestri uuringuga arvutatakse riskiskoor, mille alusel edasi minnakse (SA Tartu Ülikooli Kliinikum Ühendlabor Geneetikakeskus).

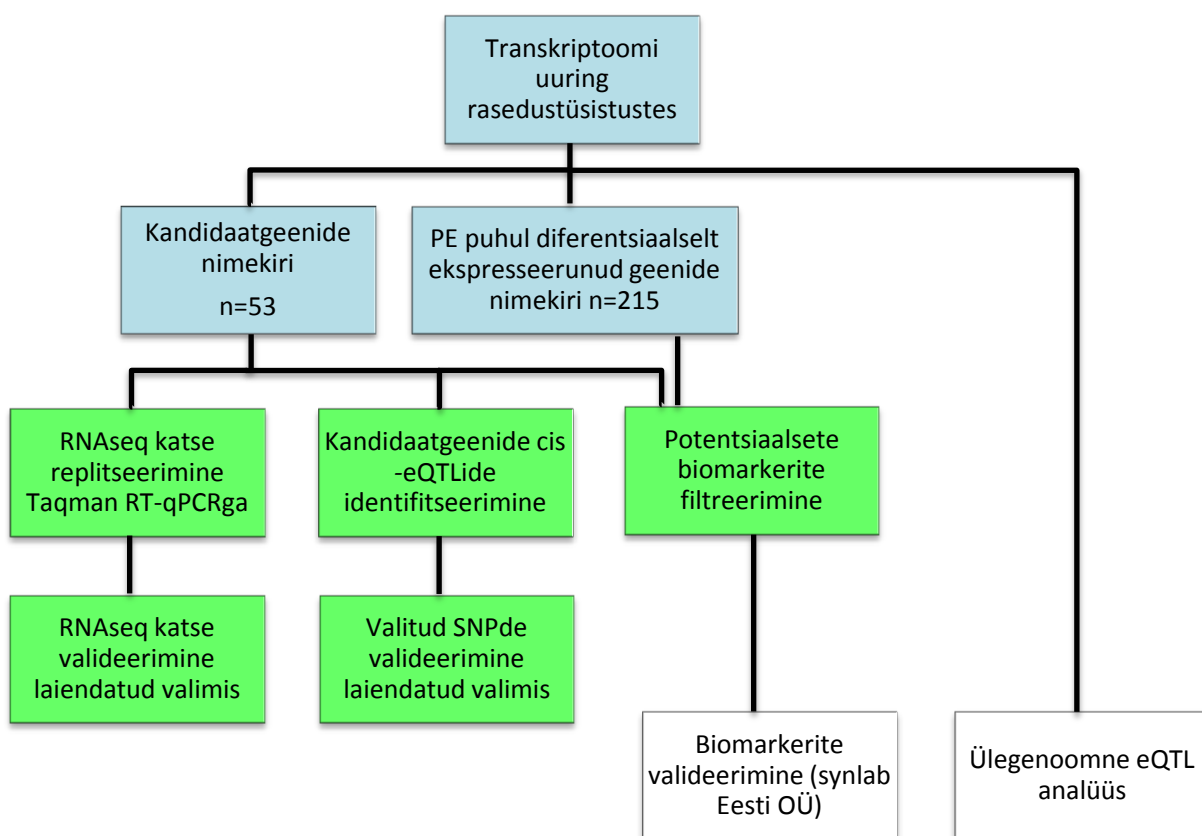
Raseduse jooksul mõõdetakse vererõhku, et määrata preeklampsia või rasedusaegse hüpertoonia olemasolu. Lisaks määratakse riskigrupi kuuluvatel rasedatel 24-28. rasedusnädalal glükoositaluvus gestatsioonidiabeedi diagnoosimiseks.

Alates 2013. aastast pakub Roche Diagnostics Limited preeklampsia riski ennustamiseks kitti sFLT1 ja PIGF suhte määramiseks (<http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-testing/electsys-preeclampsia-assays-sFlt-1-PIGF.html>). PIGF ning sFLT taset on võimalik määrata ka Thermo Fisher Scientific Inc. KRYPTOR platvormil (<http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=8&tabid=247>). Antud test võimaldab aga kindlalt ennustada preeklampsia tekkeriski ainult eelneval nädalal.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Eesmärgid ja uurimistöö plaan

Meie laboris on varasemalt läbi viidud Sõber *et al* poolt platsenta transkriptoomi uuring erinevates rasedustüsistustes. Käesoleva magistr töö eesmärkideks oli (1) saadud tulemuste valideerimine ja replitseerimine; (2) uuringu top geenide potentsiaali uurimine biomarkerina kasutamiseks ning (3) uuringu andmeid kasutades läbi viia kandidaatgeenide *cis*-eQTL uuring. Antud uurimistöö ning edasiste plaanide skeem on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Käesoleva magistr töö tööplaan. PE – preeklampsia, eQTL – geeniekspressiooni mõjutav SNP. Sinistes kastides toodud etapid on eelnevalt läbi viidud artikli (Sõber, Reiman, Kikas *et al.*, käsikiri avaldamisele saadetud) raames, rohelistes kastides on antud töö kontekstis läbi viidud etapid ning valgetes kastides prospektiivsed etapid.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 REPROMETA valim

REPROgrammed fetal and/or maternal METAbolism (REPROMETA, REPROgrammeeritud loote ja/või ema METAbolismi) uuringu eesmärgiks oli uurida platsenta geeniekspressiooni profiile. Uuringu raames kogutud valim sisaldab kliinilist informatsiooni ning bioloogilist materjali üksikrasedustest gestatsiooniajaga 36-42 nädalat. Valimi kogumist koordineerisid Maris Laan ning Kristiina Rull koostöös Pille Vaasi ning Pille Teesaluga (SA TÜK Naistekliinik). Varasemalt on antud valimit kasutatud ja detailselt kirjeldatud järgnevates töödes: Uusküla *et al.* 2012; Männik *et al.* 2012; Männik *et al.* 2010. Valim sisaldab 383 perekonda (ema, isa, vastsündinu). Kliiniline ja epidemioloogiline informatsioon ema haiguste, suitsetamise, kehamõõtude ning eelnevate sünnituste kohta koguti pärast sünnitust raseda kaardist ning sünnitusloost. Loote sünniinformatsioon sisaldas gestatsiooniaega, sünnikaalu, -pikkust, pea- ja kõhuümbermõõtu ning platsenta kaalu. Juhtumid loote- ja kromosoomianomaaliatega; perekonnad, kus esines pärilikke haigusi ning eelneva diabeedi, kroonilise hüpertensiooni ning kroonilise neeruhaigusega patsiendid jäeti valimist välja.

REPROMETA valimis olevad inividid, on jaotatud alagrupideks sünnikaalu ning rasedustüsistuse puudumise/olemasolu alusel. Kontrollgrupp koosneb tüsistusteta rasedustest, mis viisid normkaaluga lapse sünnini (N, sünnikaal 10-90 protsentiili vahel; platsenta: n=115). Häiritud loote kasvuga alagrupid sisaldavad väikese kehakaaluga (SGA, alla 10. protsentiili kasvukõveral; platsenta: n=74) ja suure kehakaaluga (LGA, üle 90. protsentiili kasvukõveral; platsenta: n=94) vastsündinuid. Kaaluprotsentiilid hüpotoofia ja makrosoomia defineerimiseks on arvatud Eesti sünniregistris oleva informatsiooni alusel (Karro *et al.*, 1997). Ema rasedusaegsete komplikatsioonidega alagrupid sisaldavad preeklampsia (PE; platsenta: n=44) ja gestatsiooniaegse diabeediga (GD; platsenta: n=56) emasid. Kõik PE juhtumid esindasid preeklampsia rasket vormi ning olid defineeritud kui hüpertensioon (süstoolne vererõhk ≥ 160 mmHg ja/või diastoolne vererõhk ≥ 110 mmHg) ja/või proteiinuuria (≥ 5 g valke uriinis 24 tunni jooksul) esinemisega. GD diagnoositi kui 75g suukaudse glükoosi tolerantsuse testil (OGTT) 24-28 gestatsiooninädalal oli vereplasmas glükoositaset üle 4,8 mmol/l ja/või 1h ja 2h plasma glükoositaset vastavalt üle 10 mmol/l ja 8,7 mmol/l.

2.2.2 Käesolevas töös kasutatud alavalimid

Käesolevas töös kasutasin kohordist kahte alavalimit. Esimeses, pilootvalimis, oli 40 indiviidi (8 indiviidi igast rasedustüsistuse grupist ning normgrupist), kellel on olemas RNA sekveneerimisandmed ning Illumina HumanOmniExpress-12-v1 kiibi genotüüpiseerimise andmed. Teine, validatsioonivalim, koosnes 120 indiviidist (24 indiviidi igast grupist) ning hõlmas indiviide ka pilootvalimist. Kasutatud alavalimite vastsündinute ning vanemate kliiniliste parameetrite keskmised koos standardhälbega on toodud tabelites 2 ja 3.

Tabel 2. Indiviidide kliinilised parameetrid pilootvalimis, keskmine \pm SD

	Ühik	Norm	SGA	LGA	PE	GD
Emade parameetrid						
Vanus	aasta	29,3 \pm 7,85	24,5 \pm 3,51	30,9 \pm 5,06	27,4 \pm 7,39	30,3 \pm 5,15
Pikkus	cm	164,5 \pm 5,34	165,4 \pm 6,23	168,4 \pm 6,39	168,8 \pm 3,85	166,1 \pm 5,28
KMI enne rasedust	kg/m ²	23,9 \pm 3,77	20,6 \pm 2,92	24,83 \pm 4,61	26,3 \pm 5,00	26,3 \pm 7,85
Rasedusaegne kaaluiive	kg	17,2 \pm 3,52	13,3 \pm 3,47*	21,7 \pm 7,25	10,9 \pm 3,36*	14,8 \pm 5,76
Eelnevaid rasedusi	0/1/>2	3/4/1	7/1/0	2/2/4	6/1/1	3/3/2
Suitsetamine	ei/jah	6/2	6/2	8/0	6/2	7/1
Gestatsiooniaeg	päev	278,6 \pm 11,5	272 \pm 9,46	281,6 \pm 4,41	266,1 \pm 3,94*	275,5 \pm 5,98
Keisrilõige/vaginaalne sünnitus		3/5	2/6	5/3	6/2*	5/3
Isade parameetrid						
Vanus	aasta	31,8 \pm 5,99	27,14 \pm 5,64	35,8 \pm 8,28	32,8 \pm 8,94	33,5 \pm 7,05
KMI	kg/m ²	25,1 \pm 3,83	22,7 \pm 2,04	29,9 \pm 5,65	28,8 \pm 6,34	27,8 \pm 4,34
Lapse parameetrid						
Sünnikaal	g	3703 \pm 392	2442 \pm 235*	4726 \pm 208*	2794 \pm 488*	4269 \pm 238*
Sünnipikkus	cm	51,3 \pm 1,89	46,3 \pm 1,04*	53,4 \pm 1,18*	47,6 \pm 1,51*	52,4 \pm 1,30
Ponderaal indeks	kg/m ³	2,74 \pm 0,27	2,48 \pm 0,29	3,11 \pm 0,26*	2,57 \pm 0,29	2,98 \pm 0,27
Platsenta kaal	g	571,3 \pm 115,8	397,5 \pm 89,9*	816,2 \pm 116,0*	476,9 \pm 119,9	658,1 \pm 185,2
Sugu	N/M	3/5	5/3	4/4	4/4	5/3

SGA – *small for gestational age*, väike gestatsiooniaja kohta, LGA – *large for gestational age*, suur gestatsiooniaja kohta, PE – preeklampsia, GD – gestatsioonidiabeet; * – p-väärtus <0,05 võrreldes kontrollidega

Tabel 3. Kliinilised parameetrid validatsioonivalimis (sisaldab pilootvalimi indiviide), keskmine \pm SD

	Ühik	Norm	SGA	LGA	PE	GD
Emade parameetrid						
Vanus	aasta	29,5 \pm 6,53	26,7 \pm 5,29	30,6 \pm 6,57	27,3 \pm 5,15	31,6 \pm 6,09
Pikkus	cm	166,2 \pm 4,94	166,3 \pm 5,73	168,4 \pm 6,72	167,6 \pm 5,68	166,5 \pm 6,35
KMI enne rasedust	kg/m ²	23,2 \pm 3,53	21,1 \pm 2,39*	25,6 \pm 5,67	24,0 \pm 4,39	25,8 \pm 6,50
Rasedusaegne kaaluiive	kg	15,7 \pm 4,74	12,7 \pm 3,00*	18,3 \pm 6,11	15,0 \pm 5,38	15,5 \pm 5,51
Eelnevaid rasedusi	0/1/>2	9/10/5	14/6/3	10/6/8	17/5/2	8/9/7
Suitsetamine	ei/jah	20/4	17/6	24/0*	21/3	18/5
Gestatsiooniaeg	päev	274,7 \pm 9,94	270,7 \pm 9,40	282,0 \pm 6,15*	261,7 \pm 13,0*	274,6 \pm 6,38
Keisrilõige/vagi-naalne sünnitus		3/4/17	6/3/14	1/9/14	18/0/6	3/7/14
Isade parameetrid						
Vanus	aasta	32,3 \pm 5,32	28,3 \pm 6,01*	34,2 \pm 7,81	30,6 \pm 6,56	33,5 \pm 6,51
KMI	kg/m ²	27,3 \pm 4,11	24,6 \pm 3,10*	27,8 \pm 4,60	26,6 \pm 4,78	26,5 \pm 4,11
Lapse parameetrid						
Sünnikaal	g	3568 \pm 419	2416 \pm 273*	4824,5 \pm 280*	2702 \pm 611*	4110 \pm 520*
Sünnipikkus	cm	50,9 \pm 1,86	46,1 \pm 1,71*	53,7 \pm 1,70*	47,1 \pm 3,22*	52,0 \pm 1,52*
Ponderaal indeks	kg/m ³	2,70 \pm 0,304	2,47 \pm 0,27*	3,12 \pm 0,29*	2,54 \pm 0,257	2,91 \pm 0,25*
Platsenta kaal	g	550 \pm 114,8	413,3 \pm 82,3*	807,5 \pm 141,3*	469 \pm 115,6*	677,8 \pm 152,5*
Sugu	N/M	12/12	13/10	12/12	14/10	12/12

SGA – *small for gestational age*, väike gestatsiooniaja kohta, LGA – *large for gestational age*, suur gestatsiooniaja kohta, PE – preeklampsia, GD – gestatsioonidiabeet; * – p-väärtus <0,05 võrreldes kontrollidega

2.2.3. Platsenta transkriptoomi diferentsiaalse ekspressiooni andmete top-geenide valideerimine ja replitseerimine

2.2.3.1 Käesolevas töös uuritavate geenide valik platsenta RNASeq andmetest

Uuritavad geenid valiti Söber at al uuringus (joonis 4). Enamus uuritavatest geenidest valiti preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseerunud geenide hulgast (n=41), kolm gestatsioonidiabeedi nimekirjast (STS, FAM65B, CRLF1). Valitud geenide puhul oli kriteeriumiks DESeq analüüsist $FDR < 0.1$ ja DESeq2 analüüsist $FDR < 0.05$. Geenid, mille ekspressioon platsentas oli madal (alla 100 normaliseeritud lugemi), ning geenid, millel puudus Taqmani assay, jäeti validatsioonist kõrvale. Lisaks võeti uuringusse 8 geeni, millel oli oluliselt erinev ekspressioon, kui võrreldi gestatsiooniaja kohta väikeste ning suurte vastsündinute platsentade geeniekspressiooniprofiile ning 1 geen GD ja LGA gruppide võrdlusest. Kõik uuringusse kaasatud geenid ning PE alusel valitud geenide DESeq analüüsis saadud p-väärtused on ära toodud tabelis 4.

Tabel 4. Uuringusse kaasatud geenide nimekiri ning kasutatud Taqman assay ID.

Geen	Geeni täisnimi (inglise keeles)	DESeq FDR p-väärtus PE vs Norm	Taqman Assay ID	Uuritavad grupid
UBC (referents- geen)	ubiquitin C	-	Hs00824723_m1	kõik
ABCA12	ATP-binding cassette; sub-family A member 12	0.0012	Hs00292421_m1	NSP
ADAMTSL4	ADAMTS-like 4	0.0002	Hs00417524_m1	NSP
ADM	adrenomedullin	0.0382	Hs00969450_g1	NSP
AQPEP	laeverin	0.0487	Hs01060572_m1	NSP
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	-	Hs00153368_m1	NSP
C10orf54	chr 10 open reading frame 54	0.0082	Hs00735289_m1	NSP
CDR2L	cerebellar degeneration-related protein 2- like	0.0052	Hs00412746_m1	NSP
CRLF1	cytokine receptor-like factor 1	-	Hs00191064_m1	NLG
CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0.0055	Hs00167918_m1	NSP
DACT2	dapper; antagonist of beta-catenin; homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	0.0052	Hs00915740_m1	NSP
DDX60L	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60-like	0.0055	Hs01016279_m1	NSP
DLX3	distal-less homeobox 3	0.0155	Hs00270938_m1	NSP
DLX4	distal-less homeobox 4	0.0052	Hs00231080_m1	NSP
DOT1L	DOT1-like; histone H3 methyltrans-ferase (<i>S. cerevisiae</i>)	0.0155	Hs01588547_m1	NSP
ECM1	extracellular matrix protein 1	0.0054	Hs00189435_m1	NSP
FAM65B	family with sequence similarity 65; member B	-	Hs00210599_m1	NLG
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	-	Hs01052961_m1	NSP
GDPD5	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	0.0052	Hs00229270_m1	NSP
GLTSCR1	glioma tumor suppressor candidate region gene 1	-	Hs00185249_m1	NSP
GRAMD1A	GRAM domain containing 1A	0.0047	Hs00385157_m1	NSP
HSD11B2	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	6.28 x10 ⁸	Hs00930759_g1	NSP
HSD17B1	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1	2.47 x10 ⁻⁵	Hs00166219_g1	NSP
HTRA4	HtrA serine peptidase 4	-	Hs01059836_m1	NSP
IGHA1	immunoglobulin heavy constant alpha 1	1.10 x10 ⁻⁷	Hs00733892_m1	NSP

<i>IPMK</i>	<i>inositol polyphosphate multikinase</i>	0.0044	Hs00852670_g1	NSP
<i>ITPK1</i>	<i>inositol-tetrakisphosphate 1-kinase</i>	0.0354	Hs00356546_m1	NSP
<i>ITPK1-AS1</i>	<i>ITPK1 antisense RNA</i>	0.0039	Hs01053867_s1	NSP
<i>KIAA1211</i>	<i>uncharacterized protein; KIAA1211</i>	0.0002	Hs00393402_m1	NSP
<i>KLC2</i>	<i>kinesin light chain 2</i>	0.0076	Hs00224491_m1	NSP
<i>LEP</i>	<i>leptin</i>	0.0052	Hs00174877_m1	kõik
<i>LTBP3</i>	<i>latent trans-forming growth factor beta binding protein 3</i>	0.0085	Hs01105746_m1	NSP
<i>MC1R</i>	<i>melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor)</i>	0.0055	Hs00267168_s1	NSP
<i>MIR205HG</i>	<i>MIR205 host gene</i>	0.0022	Hs03405498_m1	NSP
<i>MYO7B</i>	<i>myosin VIIB</i>	-	Hs00400099_m1	NSP
<i>OTUD5</i>	<i>OTU domain containing 5</i>	0.0052	Hs00380113_m1	NSP
<i>PLIN2</i>	<i>perilipin 2</i>	-	Hs00605340_m1	NLG
<i>RELL2</i>	<i>RELT-like 2</i>	0.0093	Hs00946747_g1	NSP
<i>RFX1</i>	<i>regulatory factor X; 1</i>	0.01	Hs00172561_m1	NSP
<i>SEMA3F</i>	<i>sema domain; immunoglobulin domain (Ig); short basic domain; secreted; (semaphorin) 3F</i>	0.0052	Hs00188273_m1	NSP
<i>SH3PXD2A</i>	<i>SH3 and PX domains 2A</i>	-	Hs00206037_m1	NSP
<i>SLC16A3</i>	<i>solute carrier family 16; member 3 (monocarboxylic acid trans-porter 4)</i>	-	Hs00358829_m1	NLG
<i>SLC25A35</i>	<i>solute carrier family 25; member 35</i>	0.0052	Hs01390367_m1	NSP
<i>SLC26A11</i>	<i>solute carrier family 26; member 11</i>	0.007	Hs00543412_m1	NSP
<i>SPINT1</i>	<i>serine peptidase inhibitor; Kunitz type 1</i>	0.0199	Hs00173678_m1	NSP
<i>SRCIN1</i>	<i>SRC kinase signaling inhibitor 1</i>	0.0079	Hs00382426_m1	NSP
<i>STS</i>	<i>steroid sulfatase (microsomal); isozyme S</i>	-	Hs00996676_m1	NLG
<i>STX1B</i>	<i>syntaxin 1B</i>	0.0085	Hs01041315_m1	NSP
<i>ZNF469</i>	<i>zinc finger protein 469</i>	0.0306	Hs00611441_s1	NSPG
<i>TEAD3</i>	<i>TEA domain family member 3</i>	0.0222	Hs00243231_m1	NSP
<i>TET3</i>	<i>tet methylcytosine dioxygenase 3</i>	-	Hs00379125_m1	kõik
<i>TMEM74B</i>	<i>trans-membrane protein 74B</i>	0.0044	Hs00217957_m1	NSP
<i>TMEM8A</i>	<i>trans-membrane protein 8A</i>	0.0055	Hs00430489_m1	NSP
<i>TMPRSS6</i>	<i>trans-membrane protease; serine 6</i>	0.0052	Hs00542184_m1	NSP

N – kontrollrühm, S – gestatsioonija kohta väikeste vastündinute grupp, L – gestatsioonija kohta suurte vastündinute grupp, PE – preeklampsia, GD – gestatsioonidiabeet.

2.2.3.2 cDNA süntees

cDNA süntees viidi läbi vastavalt firmapoolsele protokolile kasutades Invitrogen SuperScript III kitti. Jääl segati kokku reaktsioonisegu järgnevalt:

10 µl 2x RT Reaction Mix

2 µl RT Enzyme Mix

1 µg RNA

Kuni 20 µl-ni ddH₂O

Saadud reaktsioonisegu segati kergelt ning inkubeeriti 25°C juures 10 minutit, seejärel 50°C juures 30 minutit. Reaktsioon termineeriti inkubeerides 5 minutit 85°C juures ning seejärel jahutades jääle. Reaktsioonile lisati 1µl (2U) *E.Coli* RNAas H-d ning inkubeeriti 37°C juures 20 minutit.

Mina viisin läbi 35 indiviidi cDNA sünteesi neljas korduses ning 12 indiviidi cDNA sünteesi kahes korduses. Ülejäänud indiviidide cDNA sünteesi viis läbi Rain Inno.

2.2.3.3 Taqman RT qPCR

Taqman RT qPCR viidi läbi 54 geeni puhul vastavalt tootjapoolsele protokollile.

Esimese etapina tehti kõigile geenidele lahjendusrida kolmes korduses. Ühe geeni lahjendusrida koosnes seitsmest kannust, maksimaalse cDNA sisaldusega 2 µl ning järgnevad sisaldasid kaks korda vähem cDNA-d kui eelmine. Reaktsioonisegu ühe kannu kohta oli järgmine (kogumaht 10 µl):

2 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus

5.5 µl ddH₂O

0.5 µl 20x TaqMan® Gene Expression Assay

2 µl cDNA (algelt 2 µl-0.03 µl viidud 2 µl-ni ddH₂Oga)

Kõigi geenide efektiivsus jäi 90-110% vahele ning edasiseks tööks valiti 0,5 µl cDNA kogus.

Taqman RT-qPCR kvantitatiivseks reaktsiooniks kasutati järgnevat reaktsioonisegu ühe kannu kohta (kogumaht 10 µl):

2 µl	5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus
7 µl	ddH ₂ O
0.5 µl	20x TaqMan® Gene Expression Assay
0,5 µl	cDNA

Kõik reaktsioonid viidi läbi kolmes korduses. Valmis plaat tsentrifugeeriti ning loeti Applied Biosystems 7900 HT masinal järgneval programmil:

15 min	95°C	} 40 tsüklit
15 sek	95°C	
1 min	60°C	

2.2.3.4. RT-qPCR andmete analüüs

Taqmani RT-qPCR lahendusriidade analüüsi viis läbi Rain Inno kasutades SDS 2.4 programmi ning määras igale geenile *threshold*'i ning *baseline*'i. Lisaks arvutasin igale geenile efektiivsuse

(E) kasutades valemit $E(\%) = (10^{\frac{-1}{slope}} - 1) * 100$.

Taqman RT-qPCR kvantitatiivse reaktsiooni andmete primaaranalüüsi C_T (*threshold cycle*) väärtuste määramiseks viidi läbi Rain Inno poolt kasutades SDS v2.4 programmi (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4444202>). Edasises analüüsis kasutati indiviidide kolme korduse mediaani.

Normaliseerimiseks kasutati referentsgeeni UBC ning normaliseerimine toimus järgneva valemi alusel: $fc(UBC) = 2^{(C_{T_{UBC}} - C_{T_{uuritav\ geen}})}$, kusjuures $fc(UBC)$ märgib indiviidi uuritava geeni ekspressiooni erinevust referentsgeenist kordades.

Gruppidevaheline analüüs viidi läbi programmiga STATA 13 (<http://www.stata.com/>) kasutades Wilcoxon *rank-sum* testi. Gruppidevahelise FC (erinevus kordades) leidmiseks jagati uuritava grupi keskmine C_T kontrollgrupi keskmise C_T ga.

2.2.4 Rasedustüsistusele potentsiaalsete biomarkerite filtreerimise põhimõtted

Esmane valik uuritavatest geenidest pärines Siim Sõbra uurimistööst ning sisaldas preeklampsia korral normaalsest erineva ekspressioonitasemega geene, mille saadud p-väärtus oli DESeq analüüsist $FDR < 0.1$ ja DESeq2 analüüsist $FDR < 0.05$ ($n=215$). Neile lisati eelnevalt validatsiooniks valitud geenid, mis ei sisaldunud selles nimekirjas ($n=11$).

Esimese etapina filtreeriti välja geenid, mille produktid olid sekreteeritavad Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) andmebaasi alusel. Välja jäeti ka ekstratsellulaarse maatriksi valgud. Teiseks kriteeriumiks oli valkude ekspressioon platsentas The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) alusel. Kolmandaks kriteeriumiks oli ühe rasedustüsistuse põhine ekspressioonimuutus. Lisaks vaadati kirjanduse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) põhjal antud geenidega varasemalt seostatud informatsiooni.

2.2.5. Genotüpiseerimine Sequenom platvormil

SNPd genotüpiseeriti kasutades Sequenom® iPLEX GOLD protokolliga MassArray® jaoks. Genotüpiseerimiseks kasutati DNA lahjendusi $10\text{ng}/\mu\text{l}$. Esimese etapina amplifitseeriti uuritav piirkond kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). PCRi reaktsioonisegu lõppmahus $5\mu\text{l}$ sisaldas lisaks veele $0,5\mu\text{l}$ $10\times$ PCR puhvrit B1 (Solis BioDyne), $0,8\mu\text{l}$ 25mM MgCl_2 , $0,125\mu\text{l}$ 20mM dNTP segu, $0,1\mu\text{l}$ Sequenom PCR Enzyme DNA polümeraasi, $1\mu\text{l}$ $0,5\mu\text{M}$ *forward* ja *reverse* praimerite segu ja $1,5\mu\text{l}$ genoomset DNAd, mis oli eelnevalt lastud plaadile kuivada.

Sünteesireaktsioonid viidi läbi MJ Research PTC-225 Tetrad Thermal Cycler masinatega vastavalt etteantud protokollile järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	2 min	} 45 tsüklit
Denaturatsioon	95°C	30 sek	
Praimerite seondumine	56°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	60 sek	
Inkubatsioon	72°C	5 min	
Säilitamine	4°C		

PCR produktide pikkused olid vahemikus 83-103bp ning nende olemasolu kontrolliti 1% agarosgeelil (0,5x TBE).

PCR produktidele lisati SAP reaktsioonisegu lõppmahus 2 μ l, mis sisaldas lisaks veele 0,3 μ l 1,7U/ μ l SAP ensüümi ning 0,17 μ l SAP puhvrit. Proovid inkubeeriti vastavalt etteantud protokollile järgnevatel tingimustel:

37°C	40 min
85°C	5 min
4°C	∞

Järgnevalt valmistati iPlex ekstensioonisegu lõppmahus 2 μ l, mis lisati proovidele. Segu sisaldas lisaks veele 0,2 μ l iPlex GOLD puhvrit, 0,2 μ l iPlex terminatsioonisegu, 0,94 μ l iPlex ekstensioonipraimerite segu ja 0,041 μ l Sequenom iPlex Enzyme. Ekstensioon viidi läbi vastavalt etteantud protokollile järgnevatel tingimustel:

94C	30 sek		
94C	5 sek	}	40 tsüklit
52C	5 sek		
80C	5 sek		
		} 5 tsüklit	
72C	3 min		
4C	∞		

Neutraliseerimaks segusse jäänud soolasid, teostati töötlus resiiniga. Igasse reaktsioonikaevu lisati 16 μ l vett ning 6mg resiini.

Seejärel kanti proovid kiibile kasutades Sequenom Nanodispenser'it ning MALDI-TOF analüüs viidi läbi Sequenom MassArray4-ga. Genotüpiseerimise edukus oli 96,25%. Kokku genotüpiseeriti 337 platsenta DNAd, neist 120 eelnevalt analüüsitud Taqman RT-qPCRiga.

2.2.6 Kandidaatgeenide ekspressiooni mõjutavate platsenta *cis*-eQTL-ide tuvastamine

Kandidaatgeenide ekspressiooni mõjutavate SNPde leidmiseks kasutasin RNA sekveneerimisandmeid ning samade indiviidide (n=40) varasemat genotüpiseerimise andmestikku. Platsenta DNAd olid genotüpiseeritud Illumina HumanOmniExpress-12-v1 kiibil

(715 000 markerit, vahede mediaaniks 2,1kb) Eesti geenivaramu tuumiklaboris (<http://www.geenivaramu.ee>). Genotüpiseerimise üldine edukus oli 99,6%.

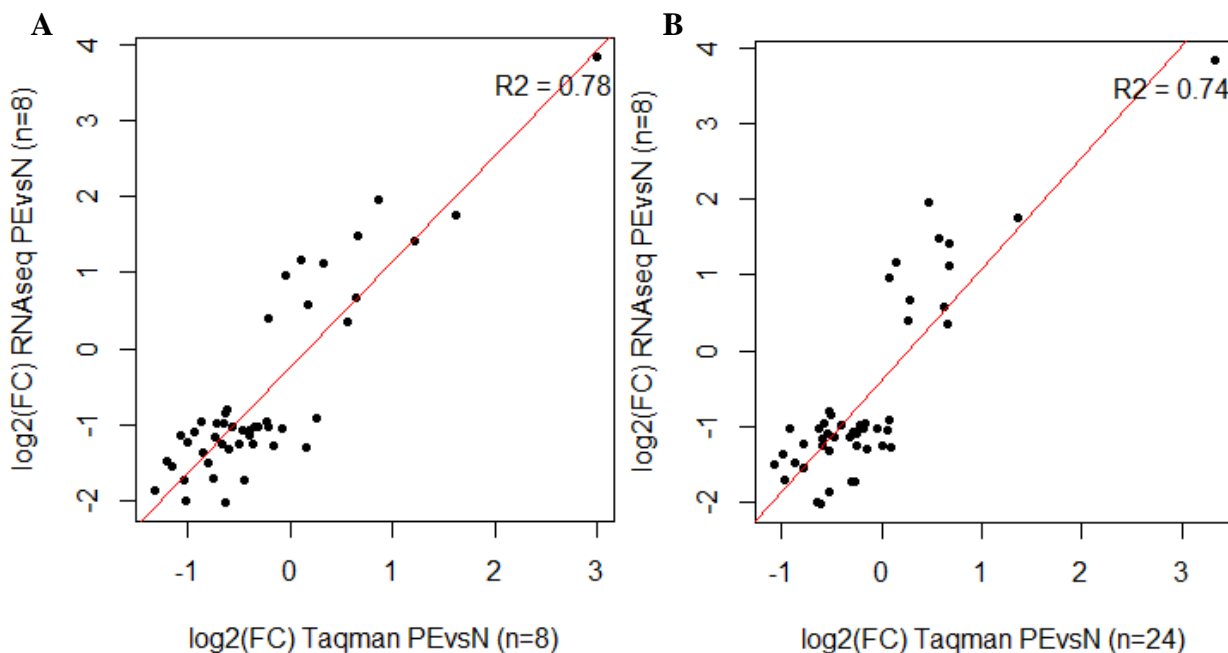
Cis-eQTLina defineerisime SNPd, mis asusid geeni algusest kuni 10kb ülesvoolu või geeni lõpust kuni 10 kb edasi. SNP ja geeniekspressiooni vahelist seost testiti PLINK 1.07 programmiga (Purcell *et al.* 2007, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) lineaarse regressiooniga. Analüüsis identifitseeritud eQTLide seast valiti viis edasiseks validatsiooniks laiendatud valimil.

Valideerimiseks kasutasin laiendatud valimi (n=120) Sequenom genotüpiseerimisandmeid viie SNP kohta ning RT-qPCR andmeid antud geenide ekspressiooni kohta. SNP ning geeniekspressiooni vahelist seost testisin lineaarse regressiooniga.

2.3 Tulemused

2.3.1 Kandidaatgeenide validatsioon

Replitseerimaks varasemalt läbiviidud platsenta transkriptoomi uuringus saadud tulemusi, teostati valitud kandidaatgeenidele Taqman RT-qPCRga samade indiviidide (n=40) cDNAGA. Kuna preeklampsiaga kaasneb tihti loote kasvupeetus (McCowan ja Horgan, 2009) teostasin preeklampsia alusel välja valitud geenidele (n=46) analüüsi lisaks ka väikeste vastsündinute grupis. Sarnaselt on makrosoomia esinemine kõrgem gestatsioonidiabeediga raseduste puhul (Kim *et al.*, 2014) ning seega uurisin viit geeni ühiselt neis gruppides. Lisaks vaatasin kahte geeni üle kõigi gruppide (*TET3*, *LEP*).



Joonis 5. RNA sekveneerimisandmete (Sõber *et al* uuringust) põhjal arvatud PE ja N gruppide vahelise log2FC (*fold change*) korrelatsioon valideeritud geenide (A) samade indiviididega (n=2x8) ja (B) laiendatud valimis (n=2x24) RT-qPCRis saadud log2FCga. PE – preeklampsia, N – kontrollgrupp

Esimese etapina arvutasin lahjendusridade põhjal efektiivsuse igale geenile, kontrollimaks katse korrektset töötamist. Kõigi geenide puhul jäi efektiivsus 90...110% vahele, mis on kooskõlas soovituslike tasemetega. Teises etapis analüüsisin gruppidevahelisi erinevusi. RT-qPCRis saadud preeklampsia ning kontrollgrupi vahelised FCd (gruppidevahelised erinevused kordades) ning RNA sekveneerimisandmete alusel leitud FCd korreleerusid omavahel olulisel määral ($R^2=0,78$;

lineaarne regressioon: $P=2,08 \cdot 10^{-14}$), mida iseloomustab joonis 5.A. Kõrge korrelatsioon kahe meetodi vahel kinnitab leitud tulemuste õigsust.

Saadud tulemuste valideerimiseks kordasin katset laiendatud valimis $n=120$. Suuremas valimis kinnitusid eelnevalt nähtud trendid ($R^2=0,74$; lineaarne regressioon: $P=1,22 \cdot 10^{-15}$, joonis 5.B). Kuigi 80,9% analüüsides oli ekspresiooni muutuse suund sama võrreldes RNAseq tulemusega, valideerus preeklampsia grupis (p -väärtus $<0,05$) 22 geeni ning hüpotroofia grupis andis tulemuse 9 geeni (tabel 5, lisa 1). Kõige madalama p -väärtusega olid PE grupis geenid *FLT1*, *TMEM74B*, *IGHA1*, *HSD17B1*, *CDR2L*, *LEP*; SGA grupis *FLT1*, *TMEM74B*, *CDR2L*, *TET3*, *GLTSCR1*. Lisaks valideerus gestatsioonidiabeedi grupis 1 geen (*SLC16A3*) (lisa 2). Lähemalt on top geenide bioloogilist tausta käsitletud järgnevad peatükis ning tabelis 6. Oluliste p -väärtuste vähesuse põhjuseks on ilmselt RT-qPCR meetodi andmete väiksem efekti suurus võrreldes RNA sekveneerimisandmetega, mis mõjutab testi võimsust (põhjalikum arutelu ptk 2.4.1).

RT-qPCR suur andmete kokkulangevus RNAseq andmetega tõendab tulemuste korrektsust ning seega on võimalik kasutada RNAseq andmeid edasises eQTL assotsiatsiooniuringus ning biomarkerite otsinguks.

Tabel 5. Taqman RT-qPCRiga teostatud validatsiooni olulised tulemused PE ja SGA gruppide võrdlusel kontrollgrupiga.

Geeni ID	PE vs kontrollgrupp (n=24/24)		SGA vs kontrollgrupp (n=24/24)	
	FC	P-väärtus Wilcoxon	FC	P-väärtus Wilcoxon
<i>FLT1</i>	2,578	1·10 ⁻⁴	1,799	0,002
<i>TMEM74B</i>	0,473	1·10 ⁻⁴	0,526	0,002
<i>IGHA1</i>	0,512	3·10 ⁻⁴	0,689	0,020
<i>HSD17B1</i>	0,505	4·10 ⁻⁴	0,739	0,126
<i>CDR2L</i>	0,687	5·10 ⁻⁴	0,707	0,003
<i>LEP</i>	10,017	5·10 ⁻⁴	3,081	0,033
<i>MC1R</i>	0,547	8·10 ⁻⁴	0,771	0,242
<i>DOT1L</i>	0,667	0,002	0,844	0,360
<i>STX1B</i>	0,580	0,004	0,911	0,718
<i>GRAMD1A</i>	0,581	0,009	0,695	0,217
<i>ZNF469</i>	0,652	0,009	0,737	0,475
<i>ITPK1-AS1</i>	0,696	0,009	0,790	0,120
<i>DLX4</i>	0,662	0,013	0,738	0,071
<i>SLC25A35</i>	0,664	0,014	0,694	0,024
<i>TMEM8A</i>	0,758	0,018	0,806	0,101
<i>GDPD5</i>	0,647	0,019	0,651	0,050
<i>ITPK1</i>	0,707	0,019	0,784	0,191
<i>TET3</i>	1,539	0,025	1,662	0,006
<i>ADM</i>	0,697	0,026	0,697	0,159
<i>OTUD5</i>	0,838	0,030	0,917	0,734
<i>RELL2</i>	0,529	0,041	0,643	0,242
<i>HTRA4</i>	1,391	0,043	1,051	0,991
<i>HSD11B2</i>	0,696	0,050	0,731	0,167
<i>KIAA1211</i>	0,638	0,070	1,135	0,496
<i>RFX1</i>	0,724	0,073	0,867	0,915
<i>SH3PXD2A</i>	1,580	0,080	1,428	0,024
<i>ECM1</i>	0,809	0,209	0,880	0,882
<i>BCL6</i>	1,196	0,496	1,308	0,071
<i>GLTSCR1</i>	1,002	0,869	0,643	0,006

Punaselt märgitud p-väärtused < 0,05, kollaselt p-väärtused < 0,1. PE – preeklampsia grupp, SGA – väikeste vastündinute grupp, FC – gruppidevaheline erinevus kordades.

2.3.2 Validatsiooni parimate geenide bioloogiline taust

Viie suurima statistilise olulisusega geenide seast kattusid preeklampsia ning hüpotroofia grupid kolm – *TMEM74B*, *FLT1* ning *CDR2L*. *TMEM74B* ja *CDR2L* funktsioon on seni teadmata, viimase puhul on näidatud seost paraneoplastilise väikeaju degeneratsiooniga (Eichler *et al.*, 2013). *FLT1* on aga juba varasemalt tuntud marker preeklampsia ning hüpotroofia korral (Plaisier *et al.*, 2008). Peale *FLT1* oli nende geenide seast varasemalt preeklampsiaga seotud veel kaks geeni (*HSD17B1*, *LEP*). Lisaks on nende geenide seas *IGHA1*, mille produkt on osa IgA valgust ning seetõttu võiks olla oluline immuunsüsteemis. Immuunsüsteem ning süsteemne põletik on olulised ka preeklampsia väljakujunemises (Rademacher *et al.*, 2007). Gestatsioonidiabeedi puhul kõrgema ekspressiooniga *SLC16A3* on varasemalt seostatud diabeetilise nefropaatiga tüüp 2 diabeediga malaides (Lokman *et al.*, 2011). Nende ning teiste statistiliselt kõige olulisemate geenide taustainformatsioon on ära toodud tabelis 6.

Viis geeni üheksast on varasemalt seostatud samade või sarnaste fenotüüpidega kui antud uuringus. See lisab kindlust, et ka nende geenide, mis varasemalt ei ole juba seostatud antud fenotüüpidega ekspressioonitaseme erinevus on tõene ning need vajaksid edasist uurimist rasedustüsistuste kontekstis.

Tabel 6. Preeklampsia, hüpotroofia ning gestatsioonidibeedi gruppides välja tulnud top geenide bioloogilised funktsioonid ning seostatud haigused.

Geeni ID	Geeni täisnimi	Funktsioon/seos haigusega	Viide
<i>CDR2L</i>	<i>cerebellar degeneration-related protein 2-like</i>	Paraneoplastiline väikeaju degeneratsioon	Eichler <i>et al.</i> 2013
<i>FLT1</i>	<i>fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)</i>	VEGF sidumine, inhibeerimine Veresoonte kasvu ja diferentseerumise regulatsioon hüpoksia indutseeritud endoteeli rakkude proliferatsioon normaalne ja kasvaja angiogenees hematopoeetiliste tüvirakkude ellujäämine ja diferentseerumine neutrofiilide ja makrofaagide kemotaksis CAM platsentas, hüpoksia/isheemia korral preeklampsia, FGR	Kendall & Thomas 1993 Kaipainen <i>et al.</i> 1993 Yamagishi 1995 Birnbau 1995 Casella <i>et al.</i> 2003 Kumazaki <i>et al.</i> 2002 Plaisier <i>et al.</i> 2008
<i>GLTSCR1</i>	<i>glioma tumor suppressor candidate region gene 1</i>	meningioom	Rajaraman <i>et al.</i> 2010
<i>HSD17B1</i>	<i>hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1</i>	oligodendroglioom preeklampsia rinnavähk östradioli süntees kortisooli tootev adenoom spermi kontsentratsioon, liikuvus Alzheimeri tõbi testosterooni süntees endometrioos	Yang <i>et al.</i> 2005 Ishibashi <i>et al.</i> 2012 Henderson & Feigelson 2000 Feigelson <i>et al.</i> 2001 Bassett <i>et al.</i> 2005 Lee <i>et al.</i> 2011 Luchetti <i>et al.</i> 2011 Saloniemi <i>et al.</i> 2007 Tsuchiya <i>et al.</i> 2005
<i>IGHA1</i>	<i>immunoglobulin heavy constant alpha 1</i>	Turneri sündroom	Kolialexi <i>et al.</i> 2010

LEP	<i>leptin</i>	vähendab lipogeenseid ja kolesterologeenseid transkriptsioonifaktoreid ja ensüüme, plasma ja koe lipiide; reguleerib intratsellulaarsete rasvhapete, glükoosi homeostaasi	Moon <i>et al.</i> 2013
		Raske ülekaalusisus ning sellega seotud diabeet, rasvkoe metabolism ja energia kasutamise regulatsioon	Uddin <i>et al.</i> 2014
		preeklampsia	Mise <i>et al.</i> 1998
SLC16A3	<i>solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid trans-porter 4)</i>	Laktaadi, ketokehade monokarboksülaadi transporter	Halestrap 2013
		Diabeetiline nefropaatia tüüp 2 diabeedis	Lokman <i>et al.</i> 2011
TET3	<i>tet oncogene family member 3</i>	Toetab O-GlcNAc transferaasi funktsiooni	Ito <i>et al.</i> 2014
		5mC konversioon 5hmC, 5fC, 5caC; Süsteemne erütematoosne luupus	Ito <i>et al.</i> 2011
TMEM74B	<i>trans-membrane protein 74B</i>	Teadmata	

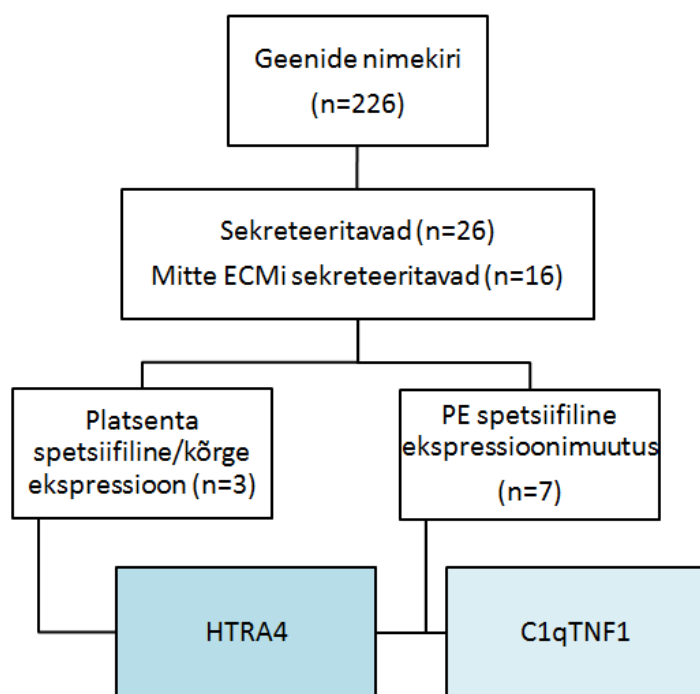
2.3.3 Potentsiaalsed biomarkerid

Leidmaks uudseid mitteinvasiivselt määratavaid biomarkereid kasutasin varasemast RNAseq katsest saadud preeklampsia top-geenidest ning eelnevalt RT-qPCRiga analüüsitud geenidest kokkupanud nimekirja (n=226), millest filtreerisin välja huvipakkuvad. Filtreerimise skeem on toodud joonisel 6. 226st geenist 26 produktid olid sekreteeritavad UniProt Swiss-Prot andmebaasi (<http://www.uniprot.org/>) alusel ning neist 16 olid geenid, mille produkt ei olnud sekreteeritav ekstratsellulaarsesse maatriksisse. Viimased produktid on küll märgitud kui sekreteeritavad, kuid ilmselt plasma või seerumi koostisse nad ei jõua ning seetõttu pole biomarkerina määratavad. Allesjäänud 16 geenist kolmel on platsentaspetsiifiline ekspressioon (The Human Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>) ning neist ainult ühel (*HTRA4*) oli preeklampsia spetsiifiline muutus geeniekspressioonis ja mitte teistes rasedustüsistustes RNA sekveneerimisandmete alusel. *HTRA4* on ka varasemalt seostatud preeklampsiaga nii geeni ekspressiooni kui ema plasma kontsentratsiooni alusel (Inagaki *et al.*, 2012).

Lisaks oli huvipakkuvaks geeniks *ClqTNF1*, mis sarnaselt tuntud preeklampsia markerile leptiinile, on adipokiin ning vähendab vere glükoositaset. *ClqTNF1*-t on varasemalt seostatud

diabeedi (Pan *et al.*, 2014) ning metaboolse sündroomiga (Chalupova *et al.*, 2013). Sarnaselt leptiinile aktiveerib C1qTNF1 valg AMP-aktiveeritava proteiinkinaasi, mille kaudu toimub rasvhapete metabolismi regulatsioon (Moon *et al.*, 2013; Peterson *et al.*, 2012). Seetõttu on võimalik, et *C1qTNF1* võiks omada sarnast efekti leptiinile ka preeklampsia korral.

Väljavalitud kaks geeni lähevad edasisele valideerimisele ema seerumist Luminex xMAP platvormil koostöös laborikaaslase Kaspar Ratnikuga ning synlab Eesti OÜga praegu käimasoleva projekti *Happy Pregnancy* (<http://www.happypregnancy.ut.ee/>) raames.

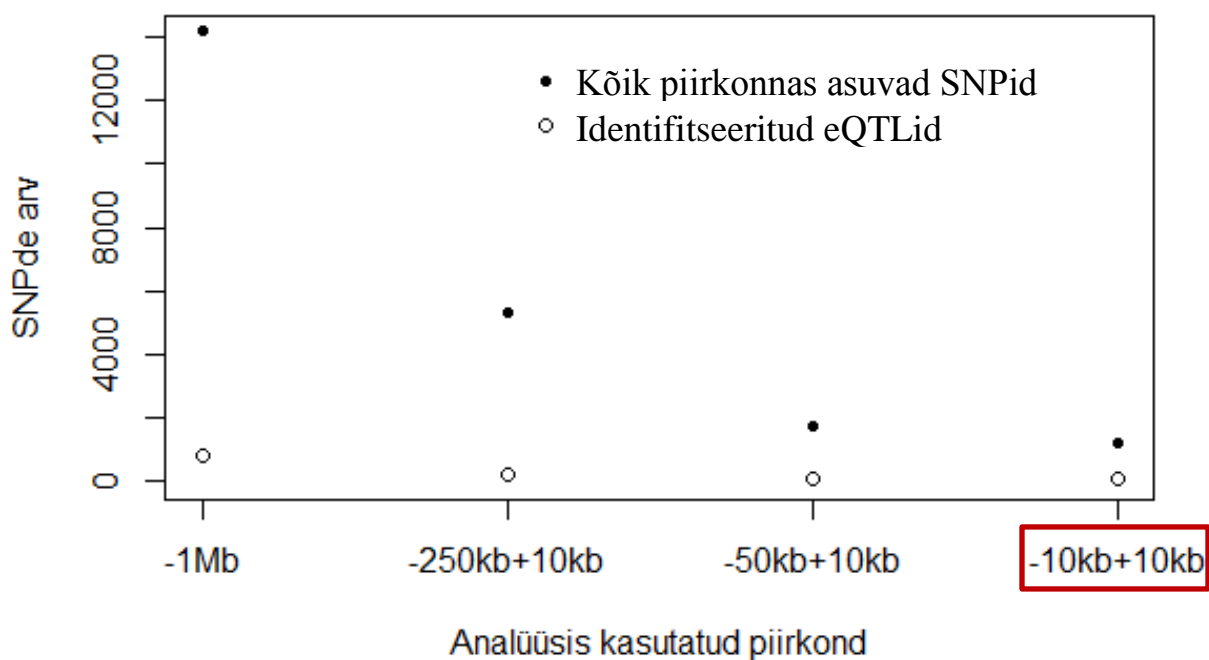


Joonis 6. Potentsiaalsete biomarkerite filtreerimise skeem algsest geenide nimekirjast. PE – preeklampsia, ECM – ekstratsellulaarne maatriks

2.3.4 Kandidaatgeenide *cis*-eQTL analüüs

Leidmaks SNPsid, mis võiksid mõjutada eelnevalt valideerimiseks valitud kandidaatgeenide (n=53) ekspressiooni ning seeläbi olla potentsiaalselt olulised rasedustüsistuste riskis, viisin läbi assotsiatsioonanalüüsi, kasutades replikatsioonivalimi (n=40) RNA sekveneerimisandmeid ning Illumina genotüpiseerimisandmeid.

Varasemalt on pakutud *cis*-eQTL definitsiooniks kuni +/-1Mb geeni transkriptsiooni saidist. Kuna antud uurimistöö valim on tunduvalt väiksem tavalisest eQTL analüüsi valimist, otsustasin suurendada analüüsi võimsust vähendades leitavat müra ning defineerida kitsam piirkond. Lisaks on lihtsam funktsionaalselt seletada lähemal asuvate SNPde efekti geeni ekspressioonile ning on tõenäolisem, et nähtav efekt on otseselt selle SNP tekitatud, mitte LDst tulenev. Teostasin analüüsi lineaarse regressiooniga (kofaktoriks grupp) nelja erineva vahemiku korral ning statistilise olulisuse piiriks lugesin p-väärtus <0,05 (joonis 7). Esimeseks piirkonnaks valisin tavapärase definitsiooni kohaselt 1 Mb geeni algusest ülesvoolu kuni geeni lõpuni. Teiseks piirkonnaks valisin 250 kb geeni algusest ülesvoolu kuni 10 kb geeni lõpust. Viimased uuritavad vahemikud olid vastavalt 50 ja 10 kb geeni algusest ülesvoolu kuni 10 kb geeni lõpust. Võrreldes erinevaid vahemikke, otsustasin kasutada vahemikku 10 kb ülesvoolu geeni algusest kuni 10 kb geeni lõpust, kuna selles vahemikus oli statistiliselt oluliste SNPde osakaal kõige suurem (6,3% võrreldes 3,7-5.87%).



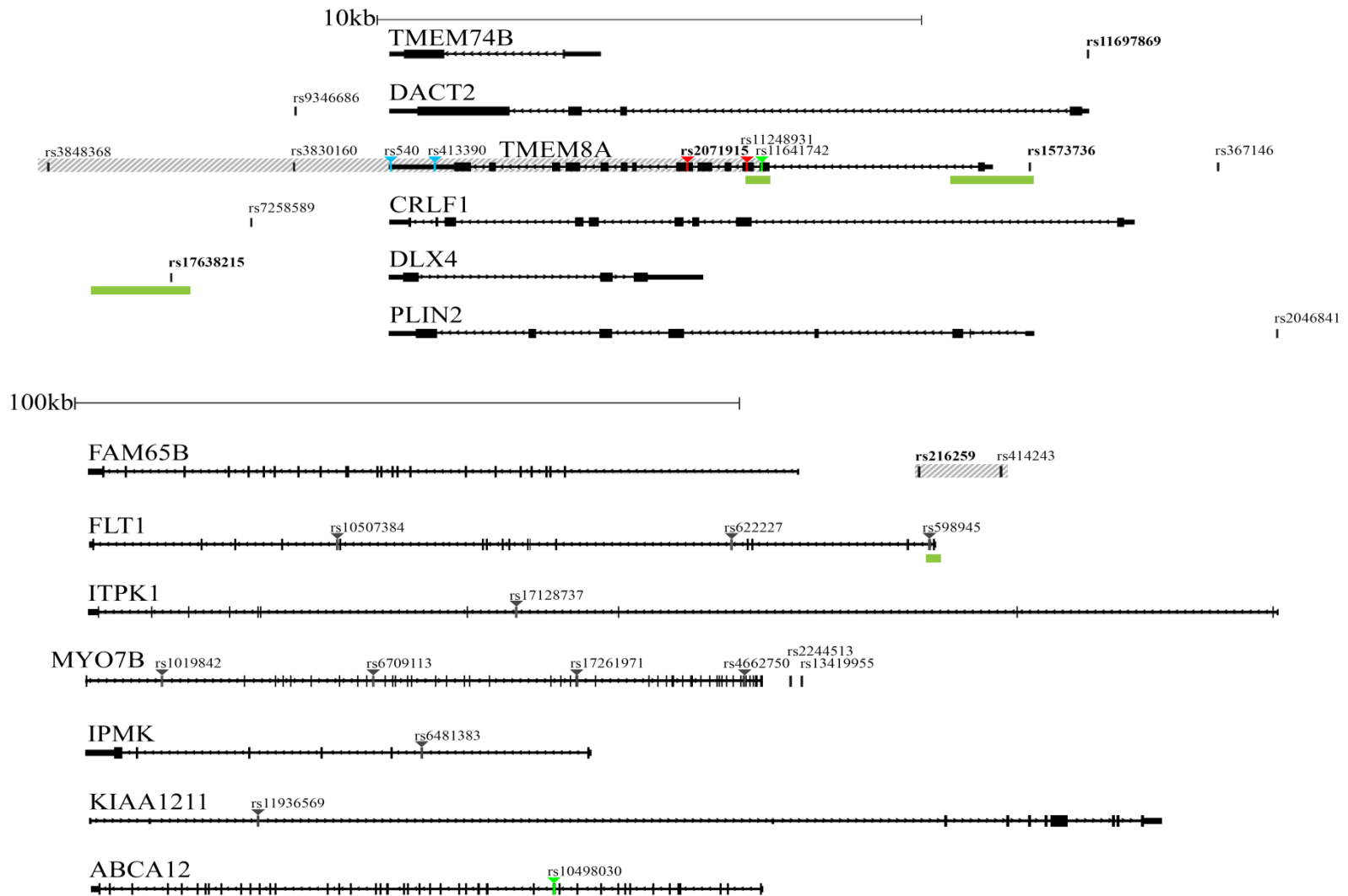
Joonis 7. Statistiliselt oluliste (p-väärtus < 0,05) SNPde osakaal kõigist antud piirkonnas analüüsitud SNPdest. Vahemike piirid on märgitud geeni algusest ülesvoolu miinusega ning geeni lõpust allavoolu plussiga. Punases kastis piirkond, mis valiti edasisteks analüüsideks.

Leidmaks robustseid eQTLs, viisin läbi mitu analüüsi erineva kofaktoriga (ilma kofaktoriteta, rasedustüsistus, platsenta kaal). Antud kofaktorid valisin tuginedes Siim Sõbra uuringule, kus näidati, et antud geenide ekspressiooni mõjutavad kõige rohkem just need faktorid (publitseerimata andmed). Ilma kofaktoriteta analüüsis identifitseerisin 61 geenide ekspressiooni oluliselt (p -väärtus $<0,05$) mõjutavat SNPd, kasutades kofaktorina rasedustüsistuse gruppi leidsin 75 SNPd ning kasutades kofaktorina platsenta kaalu leidsin 72 SNPd. SNPsid, mis andsid statistiliselt olulise tulemuse kõigis kolmes analüüsis oli 29 (tabel 7, lisa 3). Leitud 29 SNPd mõjutasid 13 geeni ekspressiooni. Tuginedes analüüsis saadud p -väärtustele ning SNPde genoomsele kontekstile, valisin empiiriliselt viis SNPd edasiseks valideerimiseks (joonis 8).

Tabel 7. *Cis*-eQTL analüüsis välja tulnud SNPd, millel oli nominaalne p-väärtus < 0,05 kõigi erinevate kofaktoritega analüüside puhul.

SNP ID	p-väärtus	FPKM/ min. alleel	p-väärtus kof: grupp	FPKM/ min. alleel	p-väärtus kof: pl. kaal	FPKM/ min. alleel	Mõjuta- tav geen
rs11697869	1,95·10 ⁻⁵	358.9	1.06·10 ⁻⁶	375.3	3.59·10 ⁻⁵	356.7	<i>TMEM74B</i>
rs9346686	2,60·10 ⁻⁵	2348	0.009	1649	3.72·10 ⁻⁵	2331	<i>DACT2</i>
rs414243	3,80·10 ⁻⁵	1075	0.003	763.7	4.83·10 ⁻⁵	1068	<i>FAM65B</i>
rs216259	7,87·10 ⁻⁵	1036	0.007	682.1	1,08·10 ⁻⁴	1026	<i>FAM65B</i>
rs1573736	8,30·10 ⁻⁴	-926.7	0.003	-716.8	0.001	-925	<i>TMEM8A</i>
rs11248931	9,87·10 ⁻⁴	880.4	0.001	711.9	0.001	887	<i>TMEM8A</i>
rs11641742	9,87·10 ⁻⁴	880.4	0.001	711.9	0.001	887	<i>TMEM8A</i>
rs2071915	9,87·10 ⁻⁴	880.4	0.001	711.9	0.001	887	<i>TMEM8A</i>
rs3830160	9,87·10 ⁻⁴	880.4	0.001	711.9	0.001	887	<i>TMEM8A</i>
rs7258589	0.002	-57.58	0.002	-49.66	0.002	-55.58	<i>CRLF1</i>
rs540	0.002	856.8	0.005	646.3	0.002	870	<i>TMEM8A</i>
rs3848368	0.003	790	0.005	641.9	0.004	797.2	<i>TMEM8A</i>
rs10507384	0.004	19550	0.005	15650	0.016	15510	<i>FLT1</i>
rs17128737	0.008	-854.9	0.016	-788.7	0.007	-877.6	<i>ITPK1</i>
rs17261971	0.008	253.8	0.029	189.4	0.007	223.7	<i>MYO7B</i>
rs598945	0.009	17050	0.023	12530	0.029	13550	<i>FLT1</i>
rs6481383	0.015	175.9	0.001	193.6	0.012	183.6	<i>IPMK</i>
rs2244513	0.018	318.1	0.010	288.9	0.005	323.6	<i>MYO7B</i>
rs13419955	0.018	248.9	0.030	216.8	0.030	201	<i>MYO7B</i>
rs11936569	0.019	-102.7	0.016	-85.36	0.013	-106.9	<i>KIAA1211</i>
rs6709113	0.020	280.3	0.018	246.5	0.008	271.2	<i>MYO7B</i>
rs413390	0.023	755.8	0.022	622.1	0.025	753.2	<i>TMEM8A</i>
rs10498030	0.023	-76.7	0.034	-68.67	0.010	-82.24	<i>ABCA12</i>
rs4662750	0.025	-207.8	0.022	-184.3	0.027	-178.2	<i>MYO7B</i>
rs1019842	0.026	239.1	0.024	200.4	0.028	205.2	<i>MYO7B</i>
rs17638215	0.027	-76.34	0.008	-88.89	0.027	-77.06	<i>DLX4</i>
rs367146	0.038	1821	0.048	1451	0.042	1811	<i>TMEM8A</i>
rs622227	0.039	11130	0.014	11190	0.043	9935	<i>FLT1</i>
rs2046841	0.048	3567	0.017	3912	0.025	3228	<i>PLIN2</i>

FPKM – *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*, fragmente kilobaasi eksoni kohta miljoni joondatud fragmendi kohta, min-alleel – minoorne alleel, kof – kofaktor, pl.kaal – platsenta kaal. Kõik toodud p-väärtused on nominaalsed.



Joonis 8. eQTL analüüsis leitud SNPde genomne kontekst. Rohelised kastid – leitud SNPsid sisaldavad CpG saared. Viirutatud alad – SNPde vaheline LD-d ($r^2 > 0,8$). SNPde värv: must – intergenoomne, hall – introonne, roheline – sünonüümne, punane – mittesünonüümne, sinine – UTRis asuv, *bold* – valideerimiseks valitud.

Valideerimiseks valisin p-väärtuse ja genoomse konteksti alusel järgnevad SNPd: rs11697869 (*TMEM74B*), rs216259 (*FAM65B*), rs1573736 (*TMEM8A*), rs2071915 (*TMEM8A*) ja rs17638215 (*DLX4*). Valideerimiseks kasutasin Sequenom genotüpiseerimisandmeid ning varasemalt saadud RT-qPCR ekspressiooniandmeid. Valitud viie SNP seast kahe puhul, mis valideerusid (p-väärtus < 0,05), oli näha p-väärtuse kahanemist valimi suuruse tõusuga, mis kinnitab saadud tulemuse õigsust (tabel 8). Ülejäänud SNPde puhul statistiliselt olulist tulemust ei leitud. Valideeritud SNPde seost rasedustüsistustega analüüsisin kasutades logistilist regressiooni, kuid statistiliselt olulist erinevust kontrollgrupist ühegi komplikatsiooni puhul ei leidnud, mis tuleneb ilmselt valimi väiksusest.

Tabel 8. *Cis*-eQTL analüüsi validatsiooni tulemused. Rasvases kirjas on märgitud p-väärtused < 0,05.

Mõjutatav geen	SNP ID	Analüüsitud indiviidide arv			keskmine	samasuunaline efekt piloodiga
		24	48	72	fc(UBC)/ min, alleel	
TMEM74B	rs11697869	0,019	8,76·10⁻⁵	2,76·10⁻⁶	0,044	jah
TMEM8A	rs1573736	0,480	0,776	0,555	-0,016	jah
DLX4	rs17638215	0,319	0,004	0,053	0,005	ei
TMEM8A	rs2071915	0,203	0,147	0,166	0,041	jah
FAM65B	rs216259	0,231	0,021	0,002	0,443	jah

Fc(UBC) – indiviidi uuritava geeni ekspressiooni erinevus UBC ekspressioonist kordades, min-alleel – minoorne alleel

Antud uuring oli esimene platsenta eQTLidele keskenduv uuring. Saadud tulemused viitavad, et kasutatud valimiga on võimalik identifitseerida robustseid SNPsid, mis mõjutavad geeniekspressiooni. Tulevikus on plaanis laiendada uuringuküsimust ning läbi viia ülegenoomne eQTL analüüs samal valimil.

2.4 Arutelu

2.4.1 RT-qPCR kui RNAseq validatsioonimeetod

RT-qPCRi on kasutatud ülegenoomsete metoodikatega saadud tulemuste valideerimiseks juba aastaid. Ka minu tulemuste põhjal on näha, et RT-qPCRiga saadud ekspressiooni muutuse efektid korreleeruvad hästi RNA-seq andmetest saadud efektidega (joonis 5). Sellegipoolest ei omandanud paljude geenide ekspressioonimuutus statistiliselt olulist tulemust.

Statistiliselt oluliste tulemuste (p-väärtus $<0,05$) vähesus RT-qPCR andmete analüüsil võib tuleneda selle analüüsi väiksemast statistilisest võimsusest. RT-qPCRil saadud andmestiku andmevahemik on kordades kitsam võrreldes RNA-seq andmestikuga. Kui RNA-seq andmete puhul on keskmine geeni ekspressioonitaseme maksimumi ja miinimumi vahe indiviididel umbes 10 kordne, siis RT-qPCRil saadavate andmete (C_T) vahe on keskmiselt 1,3 kordne. Sellest tulenevalt on ka efekti suurused nende meetoditega erinevad. Kui keskmine RNA-seq andmete analüüsist saadud geeniekspressiooni erinevus PE ja N grupi vahel oli 3207 ühikut siis RT-qPCR puhul oli see 0,22 ühikut. Efekti suurus on aga väga oluline faktor, mis mõjutab analüüsi võimsust ning selle võimet eristada olulisi tulemusi (Sham ja Purcell, 2014). Mitmetes artiklites, kus on kasutatud RT-qPCRi mikroibi tulemuste valideerimiseks, on samuti näidatud ainult efekti suundade kattumist, mitte statistiliselt olulisi p-väärtuseid (Meng *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013).

Teiseks põhjuseks, miks RT-qPCR ei andnud oodatud tulemusi, võib olla fakt, et bioloogilise materjali kokkuhoidu silmas pidades teostati referentsgeeni ekspressiooni määramine eraldi plaadil. Võimalik, et samas kannus tehes oleksime näinud veelgi paremaid tulemusi, kuna ei tekiks erinevatest katsetest tulenevat erisust. Samas kannus toimuksid reaktsioonid sama cDNA kontsentratsiooni juures ning täpselt samadel tingimustel. Lisaks toimub RT-qPCR andmete normeerimine referentsgeeni suhtes ning seejärel saadud vahe teisendamine kordseks erinevuseks referentsist, mille käigus võivad katsel tekkinud vead suurenedada.

2.4.2 Potentsiaalsed biomarkerid

Biomarkerite filtreerimisel osutus huvipakkuvaks kaks geeni *HTRA4* ning *ClqTNF1*, mille produktid on sekreteeritud ema vereseerumisse. *HTRA4* on platsentaspetsiifilise RNA ekspressiooniga, mistõttu on antud geeni produkt eriti hea biomarker rasedustüsistuste korral.

Geenide puhul, mis ekspresseeruvad paljudes kudedes, on keeruline selgitada, kust kohast nähtav erinevus pärineb. Platsentaspetsiifilise geeni korral on selge, et kogu nähtav kõrvalekalle ekspressioonis tuleneb platsenta geeniekspressiooni muutusest, mis omakorda viitab platsenta häirele. Lisaks on *HTRA4* geeni ka varasemalt seostatud preeklampsiaga mikrokiibi uuringus (Lapaire *et al.*, 2012) ning kandidaatgeeni uuringus, kus leiti seos preeklampsiaga nii platsenta geeniekspressioonil kui ka ema vereseerumis määrataval *HTRA4* tasemel (Inagaki *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015). Lisaks on näidatud *HTRA4* rolli platsenta trofoblasti invasiooni aktiveerimisel (Wang *et al.*, 2012). Antud geeni funktsiooni kohta ei ole veel väga palju teada ning väärrib kindlasti lähemat uuringut edaspidi.

C1qTNF1 ehk CTRP1 on adipokiin ning varasemalt on näidatud antud valgu roll glükoosi ning rasvhapete regulatsioonil. Viimane toimub läbi AMP-aktiveeritava proteiinkinaasi, mille kaudu toimub ka leptiini mõju rasvhapete regulatsioonile. Kuna C1qTNF1 omab mitmeid sarnaseid omadusi leptiiniga, on minu hüpotees, et C1qTNF1 võiks ka preeklampsia korral omada sarnast efekti kui leptiin. Kuigi antud geeni ekspressioon ei ole platsentaspetsiifiline on nii RNA kui valgu kontsentratsioon platsentas kõrged. C1qTNF1 on varasemalt seostatud tüüp 2 diabeedi (Chalupova *et al.*, 2013) ning metaboolse sündroomiga, kuid raseduse kontekstis seda seni uuritud ei ole.

2.4.3 Kandidaatgeenide *cis*-eQTLid

Antud uurimistöös identifitseerisin 29 SNPd, mis mõjutavad geeni ekspressiooni. Neist viis valisin edasiseks uurimiseks RT-qPCR meetodil ning kaks õnnestus valideerida statistiliselt olulise p-väärtusega.

TMEM74B geeni ekspressiooni mõjutav SNP rs11697869 (joonis 8) oli antud töös madalaima p-väärtusega nii pilootuuringus ($1,95 \cdot 10^{-5}$) kui validatsioonil ($2,76 \cdot 10^{-6}$). Lisaks oli validatsioonil statsistiliselt oluline p-väärtus nii pilootvalimi (n=24) kui ka ainult uute indiviidide puhul (n=48), mis toetab saadud tulemust. Samas asub antud SNP intergenoomsel alal ning on suhteliselt kaugel geeni algusest (~9kb). 80 aluspaari kaugusel SNP asupaigast on märgitud nõrk Dnaas I hüpersensitiivsussait, mis viitab, et antud genomne piirkond on DNAGA seonduvatele valkudele avatud. Lähim transkriptsioonifaktorite seondumiskoht on 2000 bp kaugusel, kuid on keeruline öelda, kas antud SNPI võiks mingit mõju olla antud faktorite seondumisele. Lisaks pole teada antud SNPIle ühtegi LD SNPd, mis võiks ise geeniekspressiooni mõjutada. SNP ise on üsna harv,

CEU populatsioonis 1000 genoomi projektis on minoorse alleeli sagedus 6%, kasutatud valimis on alleeli sagedus 6,5%. Seega tuleks antud SNPd kindlasti edasi uurida suuremas valimis.

FAM65B ekspressiooni mõjutav SNP rs216259 (joonis 8) valideerus laiendatud valimis. Antud SNP oli RT-qPCRiga uuritud SNPdest kõige suurem efekt geeni ekspressioonile. Rs216259 on LDs nelja samas piirkonnas asuva SNPga, nii et on raske öelda, milline neist tegelikku mõju geeniekspressioonile omab. Rs216259 minoorse alleeli sagedus CEU populatsioonis on 24%, kasutatud valimis 27%. Antud SNP asub nõrgas Dnaas I hüpersensitiivsussaidis ning 8 aluspaari kaugusel asub tugev Dnaas I hüpersensitiivsussait. Lisaks asub antud SNP transkriptsioonifaktori CEBPB seondumissaidis ning PRDM1 seondumissaidi vahetus läheduses. Mõlemale poole rs216259st jääb veel teisigi transkriptsioonifaktorite seondumissait. Seega võib järeldada, et antud piirkond on aktiivselt osaline *FAM65B* regulatsioonis. *FAM65B*-l on Ensembl andmebaasi alusel kümme transkripti, millest kaheksa on valku kodeerivad. Neist kolme puhul asub antud SNP esimeses intronis, seega vajaks lähemat uurimist, millis(t)e transkripti(de) ekspressiooni antud SNP mõjutab.

Lisaks on väga huvitav suur klaster LD SNPsid (joonis 8), mis asusid *TMEM8A* geenis, kuna nende seas oli kaks mittesünonüümset asendust ning üks sünonüümne asendus. Kahjuks aga ei õnnestunud nende seast valitud SNP (rs2071915) valideerimine. Kuna validatsioonil ja pilootuuringus oli leitud efekti suund sama, võib valimi suurendamisel olla võimalik näha statistiliselt olulist efekti.

SNPd, mis hetkel jäid kõrvale edasisest uuringust, tuleks samuti tulevikus valideerida ning kõigi tuvastatud SNPde puhul viia läbi funktsionaalne analüüs, mis kinnitaks antud SNPde mõju ka valgu tasemel.

2.4.4. Potentsiaalsed uurimistöö arengusuunad

Tulevikus uurime antud töö käigus valitud biomarkerite perspektiivi kliinilises kasutuses ning sobivust liita multimarker-testile koostöös synlab Eesti OÜ ja doktorandi Kaspar Ratnikuga Happy Pregnancy projekti (<http://www.happypregnancy.ut.ee/>) raames. Kui antud markerite kontsentratsioon on määratav ka ema seerumist piisava gruppidevahelise erinevusega, on võimalik need valgud lisada preeklampsia markerite paneelile, mis on plaanis välja töötada edasiste projektide raames.

Lisaks on käesoleva töö autoril plaanis läbi viia ülegenoomne platsenta eQTL analüüs. Selline analüüs võimaldab leida hüpoteesivabalt gene, mille ekspressioon on platsentas geneetiliselt reguleeritud. SNPde poolt reguleeritavad geenid on osa normaalsest geeniregulatsioonist, mis võimaldab raseduse normaalset arengut. Leides uusi gene, mille ekspressioon on platsentas reguleeritud, saame täpsema sissevaate platsenta ning raseduse arengusse. Lisaks on võimalik analüüsida leitud geenide ning SNPde seoseid rasedustüsistustega, mis võivad tekkida ebanormaalse regulatsiooni tagajärjel.

KOKKUVÕTE

Käesolevas magistritöös anti kirjanduse alusel ülevaade erinevatest rasedustüsistustest (preeklampsia, gestatsioonidiabeet, gestatsiooniaja kohta väiksed ning suured vastündinud) ning nende tüsistuste puhul varasemalt läbiviidud ülegenoomsetest geeniekspressiooniuuringutest platsentas. Lisaks käsitleti geeniekspressiooni mõjutavate eQTLide olemust ning profiili inimeses. Antud töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli valideerida varasemalt transkriptoomi uuringus (Sõber *et al*) tuvastatud kandidaatgeenid ning identifitseerida nende ekspressiooni mõjutavaid *cis*-eQTL. Teiseks peamiseks eesmärgiks oli filtreerida normaalsest erineva ekspressiooniga geenide hulgast välja potentsiaalseid biomarkereid.

Kasutades RT-qPCR meetodit valideeriti varasema uuringu tulemused ning kinnitati nende korrektsus. Tulemuste võrdlemiseks kasutati erinevate meetoditega saadud andmete põhjal arvutatud gruppidevahelisi erinevusi kordades, mis korreleerusid omavahel statistiliselt olulisel määral (pilotvalimis: $R^2=0,78$; lineaarne regressioon: $P=2,08 \cdot 10^{-14}$; laiendatud valimis $R^2=0,74$; lineaarne regressioon: $P=1,22 \cdot 10^{-15}$). Analüüsidis nende geenide läheduses (± 10 kb) asuvate SNPde seoseid vastava geeni ekspressiooniga lineaarset regressiooni kasutades, identifitseeriti 29 *cis*-eQTLi. Nende seast valideeriti *TMEM74B* ekspressiooni mõjutav rs11697869 ning *FAM65B* ekspressiooni mõjutav rs216259. Tulevikus oleks vajalik ka teiste SNPde valideerimine ning funktsionaalsete katsete läbiviimine. Lisaks on plaanis läbi viia ülegenoomne eQTL analüüs, et tuvastada nii *cis*- kui *trans*-eQTL, mis reguleerivad platsenta geeniekspressiooni.

Diferentsiaalselt ekspresseerunud geenide seast filtreeriti kaks geeni (*HTRA4*, *ClqTNF1*), mis lähevad tulevikus edasisele uurimisele koostöös doktorant K. Ratnikuga ning synlab Eesti OÜga.

Biomarkers for pregnancy complications and eQTLs that modulate the expression of candidate genes

Triin Kikas

SUMMARY

Placenta is very unique organ being the only temporary organ in humans. Therefore it has a very specific gene expression regulation to accommodate the fetal interests. It has been shown that in preeclampsia and other pregnancy complications, there are several changes in placental gene expression. Genes that are differentially expressed in placentas complicated with disease could be used as biomarkers if the protein is measurable in maternal serum.

Expression quantitative trait loci (eQTL) are SNPs, both in *cis*- and *trans*-positions, that can determine or alter the RNA transcript expression of given genes tissue-specifically. Therefore to find SNPs that may contribute to gene expression changes in normal and complicated pregnancy it is necessary to conduct eQTL analysis specific to placenta.

The aims of this study were (1) to validate previous results of differentially expressed genes in placenta from RNA-seq study by Sõber *et al*; (2) to identify *cis*-eQTLs for validated genes; (3) to filter potential biomarkers from differentially expressed genes.

In this study we found statistically significant correlation between fold changes calculated from RNA-seq study and our study which used data from RT-qPCR. We identified 29 SNPs that were associated with expression of 13 genes and were classified as *cis*-eQTLs. We were able to validate rs11697869 (*TMEM74B*) and rs216259 (*FAM65B*). Among differentially expressed genes we found two potential biomarkers for preeclampsia: *HTRA4* and *C1qTNF1*.

In future we plan to conduct a whole genome eQTL analysis to identify both *cis*- and *trans*-eQTLs that regulate the placental gene expression. Selected genes for biomarkers will be validated in cooperation with K.Ratnik and synab Eesti OÜ.

KIRJANDUSE LOETELU

Ahlsson, F., Gustafsson, J., Tuvemo, T., and Lundgren, M. (2007). Females born large for gestational age have a doubled risk of giving birth to large for gestational age infants. *Acta Paediatr.* *96*, 358–362.

American Diabetes Association (2003). Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* *26*, S103–S105.

Bamberg, C., and Kalache, K.D. (2004). Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. *Semin. Fetal Neonatal Med.* *9*, 387–394.

Bassett, M.H., Mayhew, B., Rehman, K., White, P.C., Mantero, F., Arnaldi, G., Stewart, P.M., Bujalska, I., and Rainey, W.E. (2005). Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 5446–5455.

Bhasin, P., and Kapoor, S. (2014). Pregnancy complications and calculated cardiovascular risk in urban women: do we envisage an association? *J. Urban Health* *91*, 162–175.

Birnbaum, D. (1995). VEGF-FLT1 receptor system: a new ligand-receptor system involved in normal and tumor angiogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* *86*, inside cover.

Bryois, J., Buil, A., Evans, D.M., Kemp, J.P., Montgomery, S.B., Conrad, D.F., Ho, K.M., Ring, S., Hurler, M., Deloukas, P., et al. (2014). Cis and trans effects of human genomic variants on gene expression. *PLoS Genet.* *10*, e1004461.

Casella, I., Feccia, T., Chelucci, C., Samoggia, P., Castelli, G., Guerriero, R., Parolini, I., Petrucci, E., Pelosi, E., Morsilli, O., et al. (2003). Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* *101*, 1316–1323.

Catalano, P.M., McIntyre, H.D., Cruickshank, J.K., McCance, D.R., Dyer, A.R., Metzger, B.E., Lowe, L.P., Trimble, E.R., Coustan, D.R., Hadden, D.R., et al. (2012). The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. *Diabetes Care* *35*, 780–786.

Chaddha, V., Viero, S., Huppertz, B., and Kingdom, J. (2004). Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin. Fetal Neonatal Med.* *9*, 357–369.

Chalupova, L., Zakovska, A., and Adamcova, K. (2013). Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of serum CTRP1: a pilot study: measurement of serum CTRP1 in healthy donors and patients with metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* *46*, 73–78.

Chang, S.-D., Chao, A.-S., Peng, H.-H., Chang, Y.-L., Wang, C.-N., Cheng, P.-J., Lee, Y.-S., Chao, A., and Wang, T.-H. (2011). Analyses of placental gene expression in pregnancy-related hypertensive disorders. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* *50*, 283–291.

Cheung, V.G., Spielman, R.S., Ewens, K.G., Weber, T.M., Morley, M., and Burdick, J.T. (2005). Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association. *Nature* 437, 1365–1369.

CLASP Collaborative Group (1994). CLASP: a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. CLASP (Collaborative Low-dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Group. *Lancet* 343, 619–629.

Cross, J.C. (2003). The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin. Genet.* 64, 96–103.

Ding, Y., Xu, L., Jovanovic, B.D., Helenowski, I.B., Kelly, D.L., Catalona, W.J., Yang, X.J., Pins, M., and Bergan, R.C. (2007). The methodology used to measure differential gene expression affects the outcome. *J. Biomol. Tech.* 18, 321–330.

Eichler, T.W., Totland, C., Haugen, M., Qvale, T.H., Mazengia, K., Storstein, A., Haukanes, B.I., and Vedeler, C.A. (2013). CDR2L Antibodies: A New Player in Paraneoplastic Cerebellar Degeneration. *PLoS One* 8, e66002.

English, F.A., Kenny, L.C., and McCarthy, F.P. (2015). Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integr. Blood Press. Control* 8, 7–12.

Enquobahrie, D.A., Meller, M., Rice, K., Psaty, B.M., Siscovick, D.S., and Williams, M.A. (2008). Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 566.e1–e11.

Enquobahrie, D.A., Williams, M.A., Qiu, C., Meller, M., and Sorensen, T.K. (2009). Global placental gene expression in gestational diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200, 206.e1–e13.

Feigelson, H.S., McKean-Cowdin, R., Coetzee, G.A., Stram, D.O., Kolonel, L.N., and Henderson, B.E. (2001). Building a Multigenic Model of Breast Cancer Susceptibility: CYP17 and HSD17B1 Are Two Important Candidates. *Cancer Res.* 61, 785–789.

Finotello, F., and Di Camillo, B. (2015). Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. *Brief. Funct. Genomics* 14, 130–142.

Founds, S.A., Conley, Y.P., Lyons-Weiler, J.F., Jeyabalan, A., Hogge, W.A., and Conrad, K.P. (2009). Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta* 30, 15–24.

Grundberg, E., Small, K.S., Hedman, Å.K., Nica, A.C., Buil, A., Keildson, S., Bell, J.T., Yang, T.-P., Meduri, E., Barrett, A., et al. (2012). Mapping cis- and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. *Nat. Genet.* 44, 1084–1089.

Göring, H.H.H., Curran, J.E., Johnson, M.P., Dyer, T.D., Charlesworth, J., Cole, S.A., Jowett, J.B.M., Abraham, L.J., Rainwater, D.L., Comuzzie, A.G., et al. (2007). Discovery of expression

- QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat. Genet.* *39*, 1208–1216.
- Halestrap, A.P. (2013). The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med.* *34*, 337–349.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* *6*, 986–994.
- Henderson, B.E., and Feigelson, H.S. (2000). Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* *21*, 427–433.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. (N. Y). *10*, 413–417.
- Hoegh, A.M., Borup, R., Nielsen, F.C., Sørensen, S., and Hviid, T.V.F. (2010). Gene expression profiling of placentas affected by pre-eclampsia. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 787545.
- Hui, P., Martel, M., and Parkash, V. (2005). Gestational trophoblastic diseases: recent advances in histopathologic diagnosis and related genetic aspects. *Adv. Anat. Pathol.* *12*, 116–125.
- Inagaki, A., Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Inuzuka, H., Miyamura, H., Sekiya, T., Kurahashi, H., and Udagawa, Y. (2012). Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia. *Placenta* *33*, 919–926.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* *4*, 249–264.
- Ishibashi, O., Ohkuchi, A., Ali, M.M., Kurashina, R., Luo, S.-S., Ishikawa, T., Takizawa, T., Hirashima, C., Takahashi, K., Migita, M., et al. (2012). Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* *59*, 265–273.
- Ito, R., Katsura, S., Shimada, H., Tsuchiya, H., Hada, M., Okumura, T., Sugawara, A., and Yokoyama, A. (2014). TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells* *19*, 52–65.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* *333*, 1300–1303.
- Jarvenpaa, J., Vuoristo, J.T., Savolainen, E.-R., Ukkola, O., Vaskivuo, T., and Ryyanen, M. (2007). Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol. Endocrinol.* *23*, 351–355.

- Kaipainen, A., Korhonen, J., Pajusola, K., Aprelikova, O., Persico, M.G., Terman, B.I., and Alitalo, K. (1993). The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J. Exp. Med.* *178*, 2077–2088.
- Karro, H., and Allvee, K. (2014). Eesti Meditsiiniline Sünniregister 1992-2013, Eesti Abordiregister 1996-2013.
- Karro, H., Rahu, M., Gornoi, K., and Baburin, A. (1997). Sünnikaalu jaotumine raseduse kestuse järgi Eestis aastail 1992–1994 - Eesti Arst. *Eesti Arst* *4*, 299–303.
- Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10705–10709.
- Kim, S.Y., Sharma, A.J., Sappenfield, W., Wilson, H.G., and Salihu, H.M. (2014). Association of Maternal Body Mass Index, Excessive Weight Gain, and Gestational Diabetes Mellitus With Large-for-Gestational-Age Births. *Obstet. Gynecol.* *123*, 737–744.
- Kolialexi, A., Anagnostopoulos, A.K., Papantoniou, N., Vougas, K., Antsaklis, A., Fountoulakis, M., Mavrou, A., and Tsangaris, G.T. (2010). Potential biomarkers for Turner in maternal plasma: possibility for noninvasive prenatal diagnosis. *J. Proteome Res.* *9*, 5164–5170.
- Koopmann, T.T., Adriaens, M.E., Moerland, P.D., Marsman, R.F., Westerveld, M.L., Lal, S., Zhang, T., Simmons, C.Q., Baczko, I., dos Remedios, C., et al. (2014). Genome-wide identification of expression quantitative trait loci (eQTLs) in human heart. *PLoS One* *9*, e97380.
- Kumazaki, K., Nakayama, M., Suehara, N., and Wada, Y. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum. Pathol.* *33*, 1069–1077.
- Lahti, M., Eriksson, J.G., Heinonen, K., Kajantie, E., Lahti, J., Wahlbeck, K., Tuovinen, S., Pesonen, A.-K., Mikkonen, M., Osmond, C., et al. (2015). Late preterm birth, post-term birth, and abnormal fetal growth as risk factors for severe mental disorders from early to late adulthood. *Psychol. Med.* *45*, 985–999.
- Lapaire, O., Grill, S., Lalevee, S., Kolla, V., Hösli, I., and Hahn, S. (2012). Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. *Fetal Diagn. Ther.* *31*, 147–153.
- Leavey, K., Bainbridge, S.A., and Cox, B.J. (2015). Large scale aggregate microarray analysis reveals three distinct molecular subclasses of human preeclampsia. *PLoS One* *10*, e0116508.
- Lee, G.S.R., Joe, Y.S., Kim, S.J., and Shin, J.C. (2010). Cytokine-related genes and oxidation-related genes detected in preeclamptic placentas. *Arch. Gynecol. Obstet.* *282*, 363–369.
- Lee, I.-W., Kuo, P.-H., Su, M.-T., Kuan, L.-C., Hsu, C.-C., and Kuo, P.-L. (2011). Quantitative trait analysis suggests polymorphisms of estrogen-related genes regulate human sperm concentrations and motility. *Hum. Reprod.* *26*, 1585–1596.

- Lokman, F.E., Seman, N.A., Ismail, A.A.-S., Yaacob, N.A., Mustafa, N., Khir, A.S.M., Hussein, Z., and Wan Mohamud, W.N. (2011). Gene expression profiling in ethnic Malays with type 2 diabetes mellitus, with and without diabetic nephropathy. *J. Nephrol.* *24*, 778–789.
- Luchetti, S., Bossers, K., Van de Bilt, S., Agrapart, V., Morales, R.R., Frajese, G.V., and Swaab, D.F. (2011). Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *32*, 1964–1976.
- Madeleneau, D., Buffat, C., Mondon, F., Grimault, H., Rigourd, V., Tsatsaris, V., Letourneur, F., Vaiman, D., Barboux, S., and Gascoin, G. (2015). Transcriptomic analysis of human placenta in intrauterine growth restriction. *Pediatr. Res.*
- Mayor-Lynn, K., Toloubeydokhti, T., Cruz, A.C., and Chegini, N. (2011). Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod. Sci.* *18*, 46–56.
- McCowan, L., and Horgan, R.P. (2009). Risk factors for small for gestational age infants. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *23*, 779–793.
- Meng, T., Chen, H., Sun, M., Wang, H., Zhao, G., and Wang, X. (2012). Identification of differential gene expression profiles in placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays. *OMICS* *16*, 301–311.
- Mise, H., Sagawa, N., Matsumoto, T., Yura, S., Nanno, H., Itoh, H., Mori, T., Masuzaki, H., Hosoda, K., Ogawa, Y., et al. (1998). Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 3225–3229.
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 656–663.
- Moon, H.-S., Dalamaga, M., Kim, S.-Y., Polyzos, S.A., Hamnvik, O.-P., Magkos, F., Paruthi, J., and Mantzoros, C.S. (2013). Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr. Rev.* *34*, 377–412.
- Männik, J., Vaas, P., Rull, K., Teesalu, P., Rebane, T., and Laan, M. (2010). Differential expression profile of growth hormone/chorionic somatomammotropin genes in placenta of small- and large-for-gestational-age newborns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *95*, 2433–2442.
- Männik, J., Vaas, P., Rull, K., Teesalu, P., and Laan, M. (2012). Differential placental expression profile of human Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin genes in pregnancies with pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus. *Mol. Cell. Endocrinol.* *355*, 180–187.
- Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Kato, T., Sekiya, T., Kurahashi, H., and Udagawa, Y. (2011). Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *9*, 107.
- O'Neill, K.A., Murphy, M.F., Bunch, K.J., Puumala, S.E., Carozza, S.E., Chow, E.J., Mueller, B.A., McLaughlin, C.C., Reynolds, P., Vincent, T.J., et al. (2015). Infant birthweight and risk of

childhood cancer: international population-based case control studies of 40 000 cases. *Int. J. Epidemiol.* *44*, 153–168.

Pan, X., Lu, T., Wu, F., Jin, L., Zhang, Y., Shi, L., Li, X., and Lin, Z. (2014). Circulating complement-C1q TNF-related protein 1 levels are increased in patients with type 2 diabetes and are associated with insulin sensitivity in Chinese subjects. *PLoS One* *9*, e94478.

Peterson, J.M., Aja, S., Wei, Z., and Wong, G.W. (2012). CTRP1 protein enhances fatty acid oxidation via AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibition. *J. Biol. Chem.* *287*, 1576–1587.

Plaisier, M., Streefland, E., Koolwijk, P., van Hinsbergh, V.W.M., Helmerhorst, F.M., and Erwich, J.J.H.M. (2008). Angiogenic growth factors and their receptors in first-trimester human decidua of pregnancies further complicated by preeclampsia or fetal growth restriction. *Reprod. Sci.* *15*, 720–726.

Pletcher, M.J., and Pignone, M. (2011). Evaluating the clinical utility of a biomarker: a review of methods for estimating health impact. *Circulation* *123*, 1116–1124.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 559–575.

Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P., and Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* *52*, 2951–2958.

Rademacher, T.W., Gumaa, K., and Scioscia, M. (2007). Preeclampsia, insulin signalling and immunological dysfunction: a fetal, maternal or placental disorder? *J. Reprod. Immunol.* *76*, 78–84.

Rajaraman, P., Hutchinson, A., Wichner, S., Black, P.M., Fine, H.A., Loeffler, J.S., Selker, R.G., Shapiro, W.R., Rothman, N., Linet, M.S., et al. (2010). DNA repair gene polymorphisms and risk of adult meningioma, glioma, and acoustic neuroma. *Neuro. Oncol.* *12*, 37–48.

Rasmussen, F., and Johansson, M. (1998). The relation of weight, length and ponderal index at birth to body mass index and overweight among 18-year-old males in Sweden. *Eur. J. Epidemiol.* *14*, 373–380.

Redman, C.W., Sargent, I.L., and Staff, A.C. (2014). IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia - two placental causes of preeclampsia? *Placenta* *35 Suppl*, S20–S25.

Rossant, J., and Cross, J.C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 538–548.

SA Tartu Ülikooli Kliinikum Ühendlabor Geneetikakeskus Sünnieelne diagnostika.

- Saloniemi, T., Lamminen, T., Huhtinen, K., Welsh, M., Saunders, P., Kujari, H., and Poutanen, M. (2007). Activation of androgens by hydroxysteroid (17beta) dehydrogenase 1 in vivo as a cause of prenatal masculinization and ovarian benign serous cystadenomas. *Mol. Endocrinol.* *21*, 2627–2636.
- Schramm, K., Marzi, C., Schurmann, C., Carstensen, M., Reinmaa, E., Biffar, R., Eckstein, G., Gieger, C., Grabe, H.-J., Homuth, G., et al. (2014). Mapping the genetic architecture of gene regulation in whole blood. *PLoS One* *9*, e93844.
- Schwartz, N., Nachum, Z., and Green, M.S. (2015). The prevalence of gestational diabetes mellitus recurrence - effect of ethnicity and parity: a meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
- Sealfon, S.C., and Chu, T.T. (2011). RNA and DNA microarrays. *Methods Mol. Biol.* *671*, 3–34.
- Sham, P.C., and Purcell, S.M. (2014). Statistical power and significance testing in large-scale genetic studies. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 335–346.
- Singh, H., Zhao, M., Chen, Q., Wang, Y., Li, Y., Kaitu'u-Lino, T.J., Tong, S., and Nie, G. (2015). Human Htra4 expression is restricted to the placenta, significantly up-regulated in early-onset preeclampsia and high levels of Htra4 cause endothelial dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* jc20143969.
- Sitras, V., Paulssen, R.H., Grønaas, H., Leirvik, J., Hanssen, T.A., Vårtun, Å., and Acharya, G. (2009). Differential Placental Gene Expression in Severe Preeclampsia. *Placenta* *30*, 424–433.
- Song, Y., Liu, J., Huang, S., and Zhang, L. (2013). Analysis of differentially expressed genes in placental tissues of preeclampsia patients using microarray combined with the Connectivity Map database. *Placenta* *34*, 1190–1195.
- Staff, A.C., Benton, S.J., von Dadelszen, P., Roberts, J.M., Taylor, R.N., Powers, R.W., Charnock-Jones, D.S., and Redman, C.W.G. (2013). Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension* *61*, 932–942.
- Struwe, E., Berzl, G., Schild, R., Blessing, H., Drexel, L., Hauck, B., Tzschope, A., Weidinger, M., Sachs, M., Scheler, C., et al. (2010). Microarray analysis of placental tissue in intrauterine growth restriction. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. *72*, 241–247.
- Söber, S., Reiman, M., Kikas, T., Rull, K., Inno, R., Vaas, P., and Teesalu, P. Extensive shift in placental transcriptome profile in preeclampsia and placental origin of adverse pregnancy outcomes.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.-P., Bittner, A., Ngo, K., and Liu, X. (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One* *9*, e78644.
- Zhao, Y.-H., Wang, D.-P., Zhang, L.-L., Zhang, F., Wang, D.-M., and Zhang, W.-Y. (2011). Genomic expression profiles of blood and placenta reveal significant immune-related pathways and categories in Chinese women with gestational diabetes mellitus. *Diabet. Med.* *28*, 237–246.

- Tannetta, D.S., Dragovic, R.A., Gardiner, C., Redman, C.W., and Sargent, I.L. (2013). Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One* 8, e56754.
- Toft, J.H., Lian, I.A., Tarca, A.L., Erez, O., Espinoza, J., Eide, I.P., Bjørge, L., Draghici, S., Romero, R., and Austgulen, R. (2008). Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* 21, 267–273.
- Tsai, S., Hardison, N.E., James, A.H., Motsinger-Reif, A.A., Bischoff, S.R., Thames, B.H., and Piedrahita, J.A. (2011). Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signalling pathways. *Placenta* 32, 175–182.
- Tsuchiya, M., Nakao, H., Katoh, T., Sasaki, H., Hiroshima, M., Tanaka, T., Matsunaga, T., Hanaoka, T., Tsugane, S., and Ikenoue, T. (2005). Association between endometriosis and genetic polymorphisms of the estradiol-synthesizing enzyme genes HSD17B1 and CYP19. *Hum. Reprod.* 20, 974–978.
- Uddin, S., Hussain, A.R., Khan, O.S., and Al-Kuraya, K.S. (2014). Role of dysregulated expression of leptin and leptin receptors in colorectal carcinogenesis. *Tumour Biol.* 35, 871–879.
- Uusküla, L., Männik, J., Rull, K., Minajeva, A., Kõks, S., Vaas, P., Teesalu, P., Reimand, J., and Laan, M. (2012). Mid-gestational gene expression profile in placenta and link to pregnancy complications. *PLoS One* 7, e49248.
- Wang, L.-J., Cheong, M.-L., Lee, Y.-S., Lee, M.-T., and Chen, H. (2012). High-temperature requirement protein A4 (HtrA4) suppresses the fusogenic activity of syncytin-1 and promotes trophoblast invasion. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3707–3717.
- Várkonyi, T., Nagy, B., Füle, T., Tarca, A.L., Karászi, K., Schönleber, J., Hupuczi, P., Mihalik, N., Kovalszky, I., Rigó, J., et al. (2011). Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta* 32 Suppl, S21–S29.
- Veyrieras, J.-B., Kudaravalli, S., Kim, S.Y., Dermitzakis, E.T., Gilad, Y., Stephens, M., and Pritchard, J.K. (2008). High-Resolution Mapping of Expression-QTLs Yields Insight into Human Gene Regulation. *PLoS Genet.* 4, e1000214.
- Winn, V.D., Gormley, M., Paquet, A.C., Kjaer-Sorensen, K., Kramer, A., Rumer, K.K., Haimov-Kochman, R., Yeh, R.-F., Overgaard, M.T., Varki, A., et al. (2009). Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. *Endocrinology* 150, 452–462.
- Voelker, R., Small, C., Bassham, S., Catchen, J., Sydes, J., and Cresko, B. (2014). RNA-seqlopedia.

World Health Organization (2005). The World Health Report 2005 Make every mother and child count.

Xiang, Y., Cheng, Y., Li, X., Li, Q., Xu, J., Zhang, J., Liu, Y., Xing, Q., Wang, L., He, L., et al. (2013). Up-regulated expression and aberrant DNA methylation of LEP and SH3PXD2A in pre-eclampsia. *PLoS One* 8, e59753.

Yamagishi, S. -i. (1995). Possible Participation of Autocrine and Paracrine Vascular Endothelial Growth Factors in Hypoxia-induced Proliferation of Endothelial Cells and Pericytes. *J. Biol. Chem.* 270, 28316–28324.

Yang, P., Kollmeyer, T.M., Buckner, K., Bamlet, W., Ballman, K. V, and Jenkins, R.B. (2005). Polymorphisms in GLTSCR1 and ERCC2 are associated with the development of oligodendrogliomas. *Cancer* 103, 2363–2372.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>

<http://rnaseq.uoregon.edu/> (9.11.2014-2.05.2015)

<http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-testing/electsys-preeclampsia-assays-sFlt-1-PlGF.html> (19.05.2015)

<http://www.happypregnancy.ut.ee/>

<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4444202> (22.05.2015)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

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

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

<http://www.kliinikum.ee/geneetikakeskus/suennieelne-diagnostika> (10.05.2015)

<http://www.kryptor.net/Default.aspx?tabindex=8&tabid=247> (26.05.2015)

LISAD

LISA 1. Taqman RT-qPCRiga teostatud validatsiooni statistiliselt mitteolulised tulemused PE ja SGA gruppide võrdlusel kontrollgrupiga.

Geeni ID	PE vs kontrollgrupp (n=24/24)		SGA vs kontrollgrupp (n=24/24)	
	FC	P-väärtus Wilcoxon	FC	P-väärtus Wilcoxon
DLX3	0.805961	0.1013	0.868621	0.3601
HSD11B2	0.655854	0.1033	1.061703	0.6704
SLC26A11	0.833803	0.1124	0.920265	0.9153
KLC2	0.816825	0.1376	0.814245	0.1479
ABCA12	1.491932	0.1489	1.133445	0.187
AQPEP	1.589283	0.2745	0.906514	0.3946
SPINT1	0.865486	0.3123	2.310009	0.8315
LTBP3	0.969333	0.3429	0.911652	0.7657
CSF3R	0.83123	0.4705	0.970267	0.8604
TMPRSS6	0.897656	0.4958	0.926918	0.3519
TEAD3	1.057891	0.4962	1.054275	0.307
DACT2	0.885334	0.5094	0.856649	0.58
MYO7B	1.209637	0.5227	0.86921	0.6549
SRCIN1	0.842436	0.5499	1.028092	0.7657
C10orf54	0.894736	0.6952	0.846549	0.5513
ADAMTSL4	1.070326	0.7415	1.061883	0.5513
MIR205HG	1.591747	0.869	0.932945	0.7657
IPMK	1.101632	0.9015	1.034302	0.7984
SEMA3F	1.042616	0.9015	1.059862	0.5513
DDX60L	1.048025	0.9507	0.852327	0.2251

PE – preeklampsia grupp, SGA – väikeste vastsündinute grupp, FC – gruppidevaheline erinevus kordades.

LISA 2. Taqman RT-qPCRiga teostatud validatsiooni tulemused GD ja LGA gruppide võrdlusel kontrollgrupiga.

	GD vs norm (n=24/24)		LGA vs norm (n=24/24)	
	FC	P-väärtus Wilcoxon	FC	P-väärtus Wilcoxon
SLC16A3	1.462	0.0126	1.090	0.2778
CRLF1	0.654	0.1105	1.033	0.5094
FAM65B	1.300	0.2482	1.167	0.665
LEP	1.406	0.4579	2.388	0.6801
TET3	1.431	0.2482	1.936	0.1609
PLIN2	1.128	0.5227	0.881	0.3325
STS	1.032	0.7571	0.902	0.6207

GD – gestatsioonidiabeedi grupp, LGA – suurte vastsündinute grupp, FC – gruppidevaheline erinevus kordades. Punaselt märgitud p-väärtus <0.05.

LISA 3. *Cis*-eQTL analüüsis välja tulnud SNPd, millel oli nominaalne p-väärtus < 0,05 erinevate kofaktoritega analüüside puhul.

SNP	P-väärtus	FPKM/ min. alleel	p-väärtus kof: grupp	FPKM/ min. alleel	p-väärtus kof: pl. kaal	FPKM/ min. alleel	Mõjutatav geen
rs487700	0.001	877.4	-	-	0.002	864.8	FAM65B
rs6930916	0.002	934.4	-	-	0.003	926.7	FAM65B
rs419288	0.003	-1104	-	-	0.004	-1087	FAM65B
rs216258	0.004	-743.7	-	-	0.004	-733.3	FAM65B
rs12338361	0.006	4992	0.030	3836	-	-	PLIN2
rs10937320	0.008	395.2	-	-	0.039	259.4	BCL6
rs644748	0.010	-855.6	-	-	0.015	-835.6	FAM65B
rs7759489	0.012	-858.1	-	-	0.018	-847.8	FAM65B
rs2747685	0.016	-801.4	-	-	0.016	-821.3	FAM65B
rs2296192	0.019	22280	-	-	0.043	17910	FLT1
rs3802335	0.019	3963	-	-	-	-	PLIN2
rs10791865	0.023	121.5	-	-	0.025	121.5	KLC2
rs4364477	0.025	703.7	-	-	0.029	689.5	FAM65B
rs17086609	0.027	-12350	-	-	0.024	-11390	FLT1
rs11648458	0.028	581.5	-	-	0.027	592.7	TMEM8A
rs7579031	0.032	-74	-	-	0.005	-91.61	ABCA12
rs4733895	0.033	1410	-	-	0.046	1198	HTRA4
rs4733961	0.033	1410	-	-	0.046	1198	HTRA4
rs228910	0.035	-58.77	-	-	0.032	-60.63	TMPRSS6
rs4793624	0.035	-125.9	-	-	0.037	-126.3	DLX3
rs10791863	0.036	-143.2	-	-	0.037	-144.3	KLC2
rs2276036	0.036	-143.2	-	-	0.037	-144.3	KLC2
rs228909	0.036	80.77	-	-	0.040	80.34	TMPRSS6
rs606162	0.037	-779.3	-	-	0.045	-758.2	FAM65B
rs13294	0.038	317.9	-	-	0.037	325.4	ECM1
rs6655975	0.039	-3113	-	-	0.035	-3261	ADAMTSL4
rs598126	0.039	-4732	-	-	0.035	-4767	HASD17B1
rs615942	0.039	-4732	-	-	0.035	-4767	HASD17B1
rs10507386	0.042	11740	-	-	-	-	FLT1
rs529648	0.043	-742.7	-	-	-	-	FAM65B
rs11132268	0.046	-763.6	-	-	0.050	-760.7	DDX60L
rs6546891	0.046	209.7	-	-	-	-	TET3
rs13207327	0.049	-1085	-	-	0.046	-1107	DACT2
rs2244507	0.049	-177.1	-	-	0.015	-187.6	MYO7B
rs7217421	-	-	0.005	126	-	-	SLC26A11
rs743962	-	-	0.010	-768	-	-	TMEM8A
rs11006074	-	-	0.010	253.4	-	-	IPMK
rs5934670	-	-	0.011	8367	-	-	STS
rs9659073	-	-	0.013	2907	-	-	ADAMTSL4

rs6826795	-	-	0.013	-94.81	-	-	KIAA1211
rs7593050	-	-	0.015	-180.6	-	-	TET3
rs11733474	-	-	0.017	-86.85	-	-	KIAA1211
rs3796547	-	-	0.017	-89.79	-	-	KIAA1211
rs3822003	-	-	0.017	-89.79	-	-	KIAA1211
rs10177052	-	-	0.018	210.5	-	-	MYO7B
rs10803589	-	-	0.018	210.5	-	-	MYO7B
rs1401904	-	-	0.019	-73.71	-	-	KIAA1211
rs939293	-	-	0.019	-73.71	-	-	KIAA1211
rs9379692	-	-	0.022	-746.4	-	-	FAM65B
rs2471630	-	-	0.023	-91.02	-	-	SRCIN1
rs1994530	-	-	0.024	721.4	-	-	DDX60L
rs7690043	-	-	0.024	92.01	-	-	KIAA1211
rs33955609	-	-	0.025	-87.36	-	-	SRCIN1
rs777433	-	-	0.026	152.8	-	-	MYO7B
rs9554309	-	-	0.026	13270	-	-	FLT1
rs2245711	-	-	0.027	150.6	-	-	MYO7B
rs7589197	-	-	0.027	-183.4	-	-	TET3
rs7695701	-	-	0.028	70.43	-	-	KIAA1211
rs7823125	-	-	0.032	-1044	-	-	HTRA4
rs7840270	-	-	0.032	-1044	-	-	HTRA4
rs9513112	-	-	0.035	-8815	-	-	FLT1
rs3859153	-	-	0.035	-815.8	-	-	TMEM8A
rs11619230	-	-	0.040	12010	-	-	FLT1
rs1055518	-	-	0.040	1049	-	-	C10orf54
rs12601558	-	-	0.040	727.6	-	-	SLC16A3
rs11095437	-	-	0.041	7842	-	-	STS
rs16853241	-	-	0.042	-55.84	0.025	-63.22	ABCA12
rs3783925	-	-	0.042	-296.4	-	-	ITPK1
rs12435423	-	-	0.042	-673.4	-	-	ITPK1
rs41371051	-	-	0.042	-97.33	-	-	SRCIN1
rs1811329	-	-	0.042	-69.03	-	-	DLX4
rs2030627	-	-	0.044	-53.89	0.017	-69.12	ABCA12
rs1986369	-	-	0.045	-819.4	-	-	DDX60L
rs743961	-	-	0.045	-755	-	-	TMEM8A
rs6836618	-	-	0.046	570.5	-	-	DDX60L
rs2030628	-	-	0.048	-53.8	0.025	-64.99	ABCA12
rs2888330	-	-	0.048	-53.8	0.025	-64.99	ABCA12
rs2379207	-	-	0.048	7137	-	-	STS
rs11205387	-	-	0.049	-407	-	-	ECM1
rs4533467	-	-	-	-	0.012	-75.15	ABCA12
rs1464678	-	-	-	-	0.013	-88.11	ABCA12
rs10786772	-	-	-	-	0.018	-1827	SH3PXD2A
rs7575071	-	-	-	-	0.027	-69.15	ABCA12

rs1403826	-	-	-	-	0.031	-63.38	ABCA12
rs6744831	-	-	-	-	0.041	-57.55	ABCA12
rs2747676	-	-	-	-	0.047	-693.6	FAM65B
rs10498027	-	-	-	-	0.047	-66.5	ABCA12
rs2244042	-	-	-	-	0.047	-143.7	MYO7B

FPKM – *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*, fragmente kilobaasi eksoni kohta
 milioni joondatud fragmendi kohta, min-alleel – minornne alleel, kof – kofaktor, pl.kaal – platsenta kaal,
 grupp – rasedustüsistuse grupp

LIHTLITSENTS

Mina Triin Kikas (sünnikuupäev: 7. november 1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Raseduskomplikatsioonide biomarkerid ning leitud geenide ekspressiooni mõjutavad eQTLid“,

mille juhendajad on prof Maris Laan ja Kristiina Rull,

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 26.05.2020 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. mai 2015