

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND, MOLEKULAAR- JA
RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARSTITEADUSKOND, BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Julia Koskar

Imprintingu kandidaatgeenide *RHOBTB3* ja *PAPPA2* ekspressioon platsentas

Magistritöö

Juhendaja: prof. Andres Salumets, PhD

Kaasjuhendajad: Martin Kärner, MSc

Triin Viltrop, MSc

Tartu 2014

SISUKORD

1 KASUTATUD LÜHENDID	3
2 SISSEJUHATUS	5
3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
3.1 PLATSENTA KUI ORGAN.....	6
3.1.1 PLATSENTA EHTUS JA ARENG	6
3.1.2 PLATSENTA FUNKTSIOON	10
3.2 GEENIEKSPRESSIOON PLATSENTAS.....	12
3.2.1 GEENIEKSPRESSIOONI EPIGENEETILINE REGULATSIOON	13
3.2.1.1 Genoomne imprinting.....	15
3.2.1.2 Imprinting platsentas	16
3.2.1.3 Imprintitud geenidega seotud haigused	17
3.2.1.4 Imprintitud geenide uurimismeetodid	19
4 EKSPERIMENTAALOSA.....	20
4.1 TÖÖ EESMÄRK.....	20
4.2 MATERJAL JA METOODIKA	20
4.2.1 UURITAVAD JA PROOVIDE KOGUMINE	20
4.2.2 DNA JA RNA ERALDAMINE	20
4.2.2.1 DNA eraldamine.....	20
4.2.2.2 RNA eraldamine	21
4.2.2.3 RNA-Seq, SNP genotüpiseerimine ja bioinformaatiline analüüs.....	22
4.2.3 IMPRINDITUD GEENIDE RHOBTB3 JA PAPP2 VALIDEERIMINE.....	22
4.2.3.1 SNP' de valimine genotüpiseerimiseks	22
4.2.3.2 Komplementaarse DNA (cDNA) süntees	23
4.2.3.3 Sangeri sekveneerimine.....	23
4.2.4 GEENIEKSPRESSIOONI ANALÜÜS NORMAALSE SÜNNIKAALUGA LASTEL JA KASVUPEETUSEGA LASTEL.....	24
4.2.4.1 qRT- PCR.....	24
4.3 TULEMUSED	27
4.4 ARUTELU	30
5 KOKKUVÕTE	37
6 SUMMARY.....	38
7 TÄNUAVALDUSED.....	39
8 KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....	40
9 KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
10 LISAD.....	50

1 KASUTATUD LÜHENDID

ABP1 – auxin binding protein 1
AIM1 – absent in melanoma 1
AS – Angelman'i sündroom
ASE – alleelspetsiifiline geeniekspressioon (*allele-specific gene expression*)
BCLAF1 – *BCL2*-associated transcription factor 1
BWS – Beckwith-Wiedemann'i sündroom
CpG – tsütosiin-fosfodiester-guanoosiin
dbSNP – database of single nucleotide polymorphisms
DMR – differentially methylated region
DNMT – DNA (cytosine-5) –methyltransferase
DNMT1 – DNA (cytosine-5) –methyltransferase 1
DNMT3a – DNA (cytosine-5) –methyltransferase 3a
DNMT3b – DNA (cytosine-5) –methyltransferase 3b
EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat
EtBr – etiidiumbromiid
GPC3 – heparin-sulfate proteoglycan
H19 – imprinted maternally expressed transcript
hCG – inimese koorioni gonadotropiin (*human chorionic gonadotropin*)
HELLP – hemolytic anemia, elevated liver enzymes, and low platelet count
HIF – hypoxia-inducible factor
HIF2 – hypoxia-inducible factor 2
HSAN IE – hereditary sensory and autonomic neuropathy type IE
ICM – sisemine rakumass (*inner cell mass*)
ICR – imprinting control region
IFI30 – interferon, gamma-inducible protein 30
IFIT1 – interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IGF2 – insulin-like growth factor 2
IGFBP – insulin-like growth factor-binding proteins
IUGR – üsasisene kasvupetus (*intrauterine growth restriction*)
JAK1 – janus kinase 1
KCNQ1 – potassium voltage-gated channel, *KQT*-like subfamily, member 1
KvDMR1 – oletatav imprintingu kontrollregion *KCNQ1* geenis

LEP – leptin
LGA – suur gestatsiooniaja kohta (*large for gestational age*)
LGALS14 – lectin, galactoside-binding, soluble, 14
LGALS8 – lectin, galactoside-binding, soluble, 8
LOI – imprintingu kadu (*loss of imprinting*)
MEG3 – maternally expressed 3
MEST – mesoderm specific transcript
MUC1 – mucin protein 1
mUPD7 – maternal uniparental disomy of chromosome 7
MX1 – myxovirus resistance 1
PAPPA – pregnancy-associated plasma protein A
PAPPA2 – pregnancy-associated plasma protein A2
PEG10 – paternally expressed 10
PHLDA2 – pleckstrin homology-like domain, family A, member 2
hPL – inimese platsenta laktogeen
PTM – post-translatsioonilised modifikatsioonid
PWS – Prader-Willi sündroom
RHOBTB3 – Rho-related BTB domain containing 3
RIN – RNA integrity number
RNA-Seq – RNA sekveneerimine
RT-PCR (qRT-PCR) – kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative real-time polymerase chain reaction*)
SDHA – succinate dehydrogenase complex, subunit A
SPTLC3 – serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3
SRS – Silver-Russell'i sündroom
ZFAT – zinc finger and AT hook domain containing
ZFAT-AS1 – ZFAT antisense RNA 1
TAE – tris-acetate-EDTA

2 SISSEJUHATUS

Mõlemad vanemad annavad võrdse panuse oma järeltulija geneetilise informatsiooni kujunemisesse. Genoomne imprinting on nähtus, mis muudab traditsioonilist ettekujutust mendelistlikust pärandumisest, ehk mille puhul on võimalik ka vaid ühe vanema päritoluga geeni ekspressioon. Seda protsessi kirjeldati esimest korda 1980ndatel aastatel, kui leiti emapoolsel ja isapoolsel kromosoomi alleelil epigeneetilisi erinevusi, mille tagajärjel toimus ainult ühe geenikoopia ekspressioon. Imprintitud geenide ekspressioon on monoalleelne ja ekspresseeritav alleel sõltub sellest, kas see on päritud isalt või emalt.

Imprintingu mõistmiseks on tarvis keskenduda väiksematele kromosoomi regioonidele ning konkreetsetele geenidele. Paljude diploidsete geenide puhul aitab ühelt vanemalt päritud koopia defekti puhul teine koopia, kuid imprintingu puhul on olukord keerulisem. Geenikoopiaid on küll kaks, kuid ekspresseeritakse vaid üht ning tegemist oleks justkui haploidse geeniga. Seega on imprintitud geenid eriti tundlikud mutatsioonidele.

Imprintitud geenid omavad tähtsat rolli platsenta arengus. Platsenta on loote arengu seisukohalt väga oluline organ, mis vahendab suhtlust ema ja loote vahel ning nendevaheliste signaalide abil reguleerib loote kasvu. Platsentas imprintitud geene on seostatud mitmete loote kasvu ja arenguga seotud haiguste ning sündroomidega, nt Prader–Willi, Silver–Rusell'i ja Beckwith–Wiedemann'i sündroomidega, kuid ka loote üsasisesse kasvupeetusega.

Imprintitud geene on platsentas palju uuritud, kuna neil on tähtis funktsioon platsenta ja loote arengus. Sellest tulenevalt uute imprintitud geenide otsing jätkub ning nimekiri imprintitud geenidest pole kindlasti lõplik. Kõige sobivamat meetodit imprintitud geenide tuvastamiseks on raske leida, kuna imprinting on suure varieeruvusega nähtus, mis võib erineda erinevates arengustaadiumites ning olla koespetsiifiline.

Käesolev uurimustöö keskendub platsentas ekspresseeritud imprintitud geenide kandidaatide hulka kuuluvate *RHOBTB3* geeni imprintingu ning *PAPPA2* geeni võimaliku imprintingu uurimisele. Uurimustöö teine osa on suunatud imprintitud geenide ekspressiooni kvantitatiivsele analüüsile normaalse kasvuga loote ning kasvupeetusega loote platsentas.

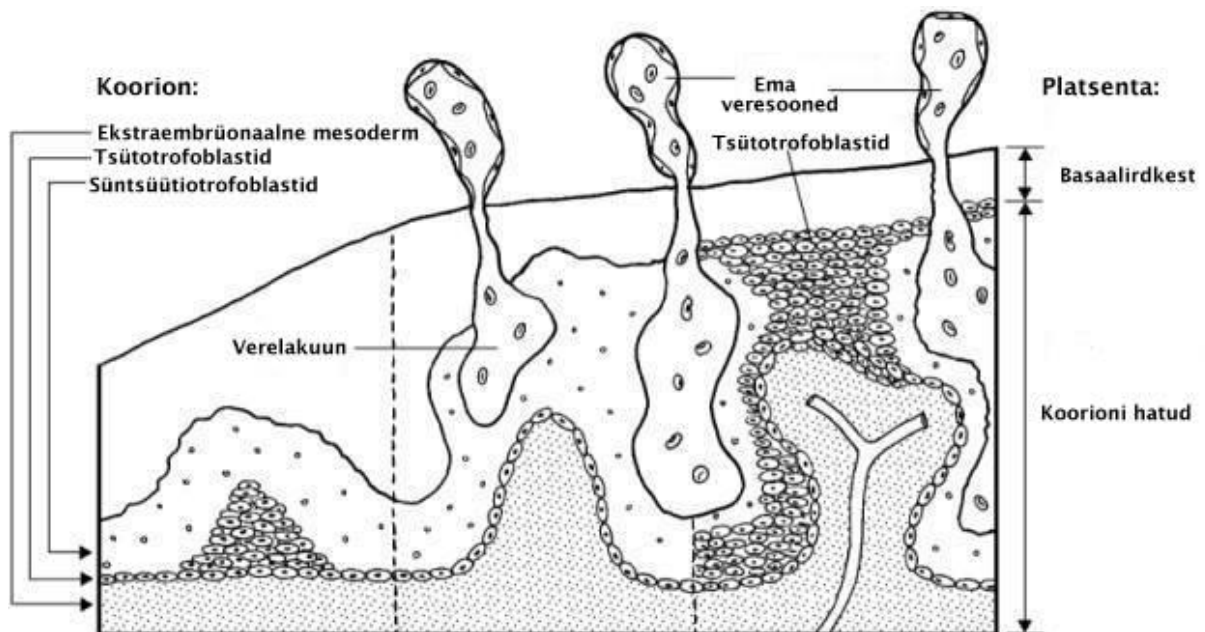
3 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1 Platsenta kui organ

Platsenta ehk emakook on plaatjas, sagaraline elund, mis moodustub emaka limaskestast ja loote trofoblastidest. Platsenta on kõrgelt spetsialiseeritud ajutine organ, mis areneb täielikult välja 16. rasedusnädalaks ning vastutab ema ja lapse tervise eest raseduse ajal ning võib mõjutada lapse tervist ka kogu tema elu jooksul (Neil *et al.*, 2004; Tehver *et al.*, 2007; Guttmacher *et al.*, 2014). Platsenta ühendab lootekesta ja emaka limaskesta ning vahendab nende vahelist suhtlust. Platsentaga toimuvad histoloogilised ja funktsionaalsed muutused mõjutavad otseselt loote arengut (Bauer *et al.*, 1998; Nienstedt *et al.*, 2005).

3.1.1 Platsenta ehitus ja areng

Platsenta moodustavad loodet ümbritsev ja emaka limaskestaga kontakteeruv välimine lootekest ehk koorion, mis on kaetud hattudega (Joonis 1.), ning emaka limaskesta muutunud väliskiht. Koorioni moodustavad trofoblastid koos mesodermi ja veresoontega ning selle kaudu toimub loote toitumine ja hingamine (Tehver *et al.*, 2007).



Joonis 1. Koorioni hattude läbilõige.

(<http://www.med.umich.edu/lrc/coursepages/m1/embryology/embryo/06placenta.htm> [1])

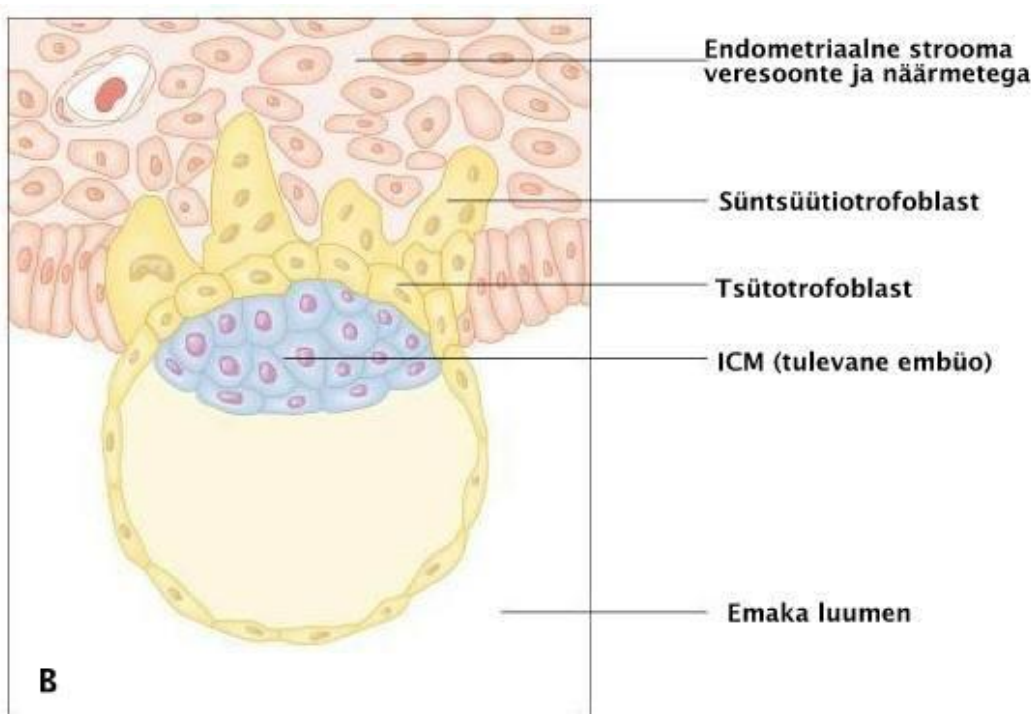
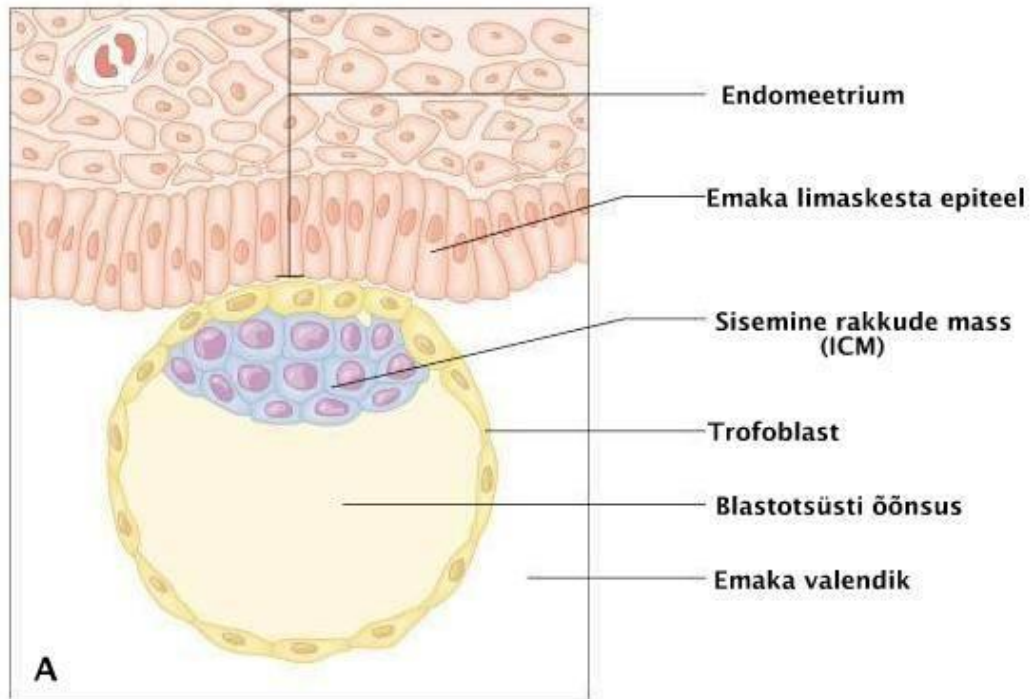
Hattude kogupindala raseduse lõpus on 10 – 15 m² (Tehver *et al.* 2007). Sarnaselt soolestikule katab hatte umbes ühe mikromeetri pikkuste mikrohattude tihe kiht. Kolmandas trimestris õhenevad hattude seinad ja suureneb platsenta läbilaskvus: seda läbib 500–750 ml ema verd minutis. Viimasel raseduskuul aga hakkab platsenta nekrotiseeruma ja selle läbilaskvus väheneb (Nienstedt *et al.*, 2005).

Vastavalt koekihtide arvule, mis jäävad püsima koorioni epiteeli ehk trofoblasti ja ema vere vahele, eristatakse:

- epiteliokoriaalset (hobune, siga, veis);
- sündesmokoriaalset (lammas);
- endoteliokoriaalset (kiskjalised);
- hemokoriaalset (närilised, putuktoidulised, primaadid, k.a. inimene);
- hemoendoteliaalset platsentat (jänes).

Inimesel on hemokoriaalne platsenta (*placenta hemochorialis*), milles puudub emaka veresoonte endoteelkate ja koorioni epiteeli vastas on vahetult ema veri (Nienstedt *et al.*, 2005). Ühegi platsenta vormi puhul ei puutu loote ja ema veri otseselt kokku. Hemokoriaalses platsentas eraldab loote ja ema verd kolmekihiline koriaalne barjäär, mille kaudu toimub toitainete, ainevahetusproduktide ning gaaside vahetus ema ja loote vere vahel (Tehver *et al.* 2007).

Raseduse kaheksandaks päevaks on blastotsüst osaliselt endomeetriumi stroomasse kinnitunud. Embrioblasti ümbritseb kaks diferentseerunud trofoblastide kihti: sisemine ehk tsütotrofoblastide ning välimine ehk süntsüütiotrofoblastide kiht. Rakud tsütotrofoblastide kihis jagunevad ja migreeruvad süntsüütiotrofoblasti kihti, kus nad kaotavad oma individuaalse rakumembraani. Implantatsiooni alguses (Joonis 2.) koosneb blastotsüst 107 – 256 rakust (Benirschke *et al.*, 2006). Esimeseks rakupopulatsiooniks on embrioblast ehk sisemine rakkude mass (*inner cell mass*, ICM), mis areneb edasi embriooks (Kärner, 1997).



Joonis 2. Blastotsüst implantatsiooni alguses (A) ning implantatsioon (B).

(<http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcapan/anat2/notes/APIINotes2%20human%20development2.htm> [2])

Platsenta areng algab hetkest, mil emaka limaskestal tekib stabiilne kontakt loote membraanidega ehk blastotsüsti implantatsioonil. Normaalseks platsenta arenguks on tarvis

mitmeid angiogeenseid kasvufaktoreid, tsütokiine, hormone ja transkriptsioonifaktoreid (Regnault *et al.*, 2002). Nii embrüoblasti mesenhüüm kui ka veresooned aitavad kaasa platsenta moodustumisele (Benirschke *et al.*, 2006).

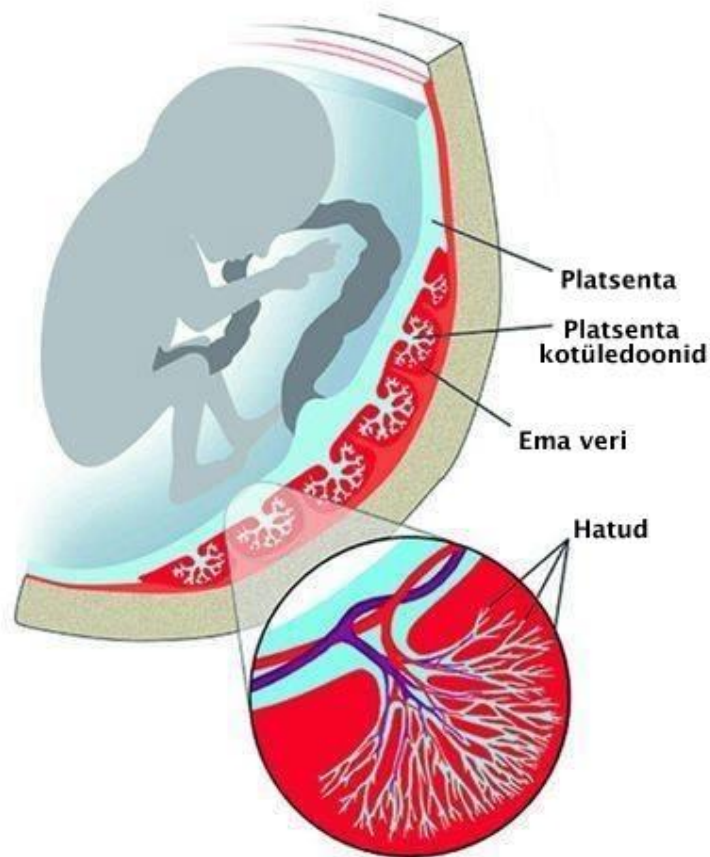
Platsenta olulisemaks struktuuriks on hatustik. Teise rasedusnädala lõpuks hakkavad moodustuma primaarsed hatud. Ühtlasi moodustub koorioni õõs. Ekstraembrüonaalne mesoderm katab tsütotrofoblasti. Kolmanda nädala lõpuks on välja kujunenud sekundaarsed hatud, mis ulatuvad ema verega täidetud lakuunidesse. Mesodermi rakud hattude sees hakkavad diferentseeruma väikesteks veresoonteks, moodustades hattude kapillaarsüsteemi. Kapillaarid ühenduvad embrüonaalse vereringega, ühendades platsenta embrüoga. Neljandal nädalal hakkab lööma süda ning platsenta on valmis loodet varustama hapniku ning toitainetega (Sadler, 2012).

Raseduse esimese trimestri jooksul platsenta diferentseerub ja kasvab madala hapnikusisaldusega keskkonnas. Hüpoksilist kasvukeskkonda raseduse varajases staadiumis peetakse tsütotrofoblastide funktsiooni tähtsaks regulaatoriks (Jaffe *et al.*, 1997). Genbacev *et al.* (1997) on näidanud, et inimese tsütotrofoblastide proliferatsioon ja diferentseerumine on reguleeritud hapniku hulgaga.

Järgnevate kuude jooksul toimub hattude edasine areng ning hattudele tekivad lisaharud. Teise kuu lõpuks on hatud ühelt koorioni poolelt taandarenenud ning sile koorion on välja kujunenud. Kolmanda kuu lõpuks on amnion ja koorion liitunud (Sadler, 2012).

Neljanda kuu alguseks on platsental kaks selgelt eristuvat osa: koorionist moodustunud lootepoolse päritoluga osa ning basaaldetsiiduast moodustunud emapoolse päritoluga osa. Intervilloosne ruum on täidetud ema verega. Hattude seinad on muutunud õhemaks ning süntsüütium ja endoteeli rakud moodustavad ainsad kihid ema ja loote vereringete vahel (Sadler, 2012).

Neljanda kuu jooksul moodustuvad detsiiduast vaheseinad, milles kulgevad veresooned. Vaheseinte moodustumisega jaguneb platsenta osadeks – kotüledooneideks (Joonis 3.). Neljanda raseduskuu lõpuks on platsenta täielikult välja kujunenud (Tehver *et al.*, 2007).



Joonis 3. Sagaraline platsenta ning üks suurendatud kotüledoov, kus on näha peenikesi hattusid. (http://www.kliinik.ee/haiguste_abc/platsenta/id-1362 [3])

3.1.2 Platsenta funktsioon

Platsenta täidab loote jaoks elutähtsaid funktsioone, olles lootele nii toitumis-, hingamis-, sisesekretoorseks kui ka erituseelundiks.

- Toitainete transport ja metabolism

Toitainete transport on reguleeritud kontsentratsiooni gradiendi, platsenta metabolismi ning verevarustuse kaudu (Jones *et al.*, 2007). Aminohappeid, rasvhappeid, glükoosi ja teisi loote jaoks vajalikke toitaineid sisaldav ema veri liigub platsentasse ja läbi nabaväädi looteni (Nienstedt *et al.*, 2005).

Aminohapped liiguvad lootesse aktiivse transportsüsteemi kaudu (Bröer, 2002). Inimese platsenta ekspresseerib rohkem kui 20 erinevat aminohappe transporterit (Jansson, 2001). Lootel on aminohapete kontsentratsioon kõrgem kui emal, mis viitab aktiivse transpordi toimimisele (Cetin *et al.*, 1992).

Glükoos on loote põhiline energiaallikas. Loode ise produtseerib glükoosi minimaalselt ja seega sõltub suuresti ema vereringest kättesaadavast glükoosist (Baumann, 2002). Raseduse lõppfaasis läbib platsentat enam kui gramm glükoosi tunnis. Loote vere glükogeeni sisaldus on siiski 20–30% madalam, kui emal, sest nad mõlemad tarbivad pidevalt glükoosi (Nienstedt *et al.*, 2005).

Teiseks tähtsaks energiaallikaks loote jaoks on rasvhapped. Need moodustavad ka rakumembraanide põhilisi struktuurseid elemente ning omavad suurt rolli spetsiifiliste kudede ja organite arengus. Rasvhapete transport emalt lootele toimub kontsentratsioonigradiendi kaudu (Haggarty, 2010).

Kui loode ei saa piisavalt toitaineid, siis võib tagajärjeks olla loote üsisisene kasvupeetus (*intrauterine growth restriction*, IUGR). Toitainete ülekülluses on lootel risk ülekasvuks (*large for gestational age*, LGA), mis omakorda võib soodustada diabeedi teket tulevikus (Jones *et al.*, 2007).

Platsenta sarnaneb maksataolise toitainete ladustajaga, kuid see osaleb ka teisel moel loote ainevahetuses, näiteks ainevahetusjääkide väljutamises (Nienstedt *et al.*, 2005).

- Loote varustamine hapnikuga

Platsenta varustab loodet hapnikuga. Hapniku osarõhk emapoolses platsenta osas on 5–8 kPa, kuid loote nabaveenis ainult 3–4 kPa (Nienstedt *et al.*, 2005). Loote hemoglobiin on suurema afiinsusega hapniku suhtes ja väiksema afiinsusega süsihappegaasi suhtes kui ema hemoglobiin. See tagab hapniku liikumise lootesse ning süsihappegaasi liikumise ema vereringesse (Neil *et al.*, 2004).

- Hormonaalne regulatsioon

Platsenta on tähtis endokriinorgan, sekreteerides nii peptiid- kui steroidhormoone. Platsenta trofoblastid varustavad emapoolset vereringet hormoonide ja tsütokiinidega, programmeerides ema füsioloogiat ümber loote kasvu soodustavaks (Nienstedt *et al.*, 2005). Süntsüütiotrofoblast produtseerib inimese koorioni gonadotropiini (hCG) (Donnelly *et al.*, 2014), mis indutseerib munasarjas progesterooni produktsiooni. Progesteroon omakorda on vajalik raseduse säilitamiseks, hoides üheaegselt endomeetriumi hüpertroofilises ja müomeetriumi lõtvunud olekus (Tehver *et al.*, 2007).

Lisaks sekreteerib süntsüütiotrofoblast inimese platsenta laktogeeni (*human placental lactogen*, hPL) (Donnelly *et al.*, 2014), mille ülesandeks on emaka kontraktsioonide

peatamine enne sünnitust ning emaka ettevalmistamine tuhudeks ja sünnituseks. Samuti soodustab see piimanäärmete arengut (Tehver *et al.*, 2007).

Platsenta osaleb ema immuunsüsteemi pärssimises ja kaitseb loodet ema immuunsüsteemi rünnaku eest. Trofoblasti rakud toetavad emakasisest arengut ning ekspresseerivad suurel hulgal antigeene (Hemberger, 2013). Sekreteeritavad valgud tõkestavad antikehade produktsiooni. Koorion indutseerib ka lümfotsüütide diferentseerumist, mis omakorda surub alla immuunreaktsiooni emakas (Tehver *et al.*, 2007).

Platsenta kaudu liiguvad ema organismist lootesse antikehad (nt difteeria, poliomüeliidi ja sarlakite vastu), mikroobide toksiinid, mitmed ravimid ning toksilised ühendid. Suurem osa väikemolekulaarseid aineid läbivad platsentat. Loodet mõjutavad ema manustatud alkohol, nikotiin ja ravimid (Nienstedt *et al.*, 2005).

3.2 Geeniekspressioon platsentas

Platsenta normaalne funktsioneerimine sõltub selle struktuurist, kasvust ja arengust ning korrektsest geeniregulatsioonist. Varasemalt on näidatud erinevusi platsenta geeniekspressioonis raseduse eri aegadel (Mikheev *et al.*, 2008) ning erinevate patoloogiliste seisundite, näiteks preeklampsia korral (Sitras *et al.*, 2009). Samuti on leitud tõenäoliselt erinevast funktsioonist tingitud geeniekspressiooni erinevusi ka amnionis, koorionis ja detsiiduas. Igal platsenta osal on unikaalne geeniekspressioon, mis sõltub selle koe funktsioonist ja bioloogilisest aktiivsusest (Kim *et al.*, 2012).

Hatustikus ekspresseeritakse rohkelt *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*), *HIF2* (*hypoxia-inducible factor 2*) ja *PAPPA* (*pregnancy-associated plasma protein A*) gene. *IGF2* alaekspressiooni seostatakse loote kasvu piiranguga (Sood *et al.*, 2006), kuna *IGF2* vastutab platsenta transportsüsteemide eest ning selle ülesandeks on modulleerida nii platsenta varustamist toitainetega kui ka loote nõudlust toitainete järele (Reik *et al.*, 2003). *PAPPA* geenidel on aga funktsionaalne roll raku proteolüütilise aktiivsuse reguleerimisel (Laursen *et al.*, 2002). HIF transkriptsioonifaktorid indutseerivad gene, mille funktsiooniks on vastutada glükolüüsi ja angiogeneesi eest. Mitmed kasvuga seotud geenid ekspresseeruvad hattudes teiste kudede võrreldes eriti kõrgelt. Üheks nendest geenidest on näiteks *GPC3* (*heparin-sulfate proteoglycan*), mis on muteerunud Simpson–Golabi–Behmel sündroomiga patsientidel. Seda sündroomi seostatakse platsenta ja loote ülekasvuga ning embrüonaalsete kasvajatega (Sood *et al.*, 2006).

Amnioni membraanil on unikaalne füsioloogiline roll. See on barjääriks loote ja ümbritseva keskkonna vahel. Amnionis on kõrgelt ekspresseeritud *MUC1* (*mucin protein 1*). See on kõrgelt glükosüleeritud transmembraanne valk, mida seostatakse osade eriti agressiivsete kasvajatega. Arvatakse, et see glükoproteiin soodustab metastaaside teket rakkude kleepumise inhibitsiooni kaudu. Eelduste kohaselt annab *MUC1* ekspressioon amnionile antibakteriaalseid ja antiadhesiivseid omadusi (Levi *et al.*, 2004).

Koorionis ekspresseeritud geenide funktsiooniks on rakkude diferentseerumise, signaali transduktsiooni ja immuunsuse kontroll. Koorioni geeniklaster sisaldab koe remodelleerimisgeene ning interferoonide poolt indutseeritud geene (*IFIT1*, *MX1*, *JAK1*). Immuunsusega seostatud geenid ekspresseeruvad koorionis eriti kõrgelt (Sood *et al.*, 2006).

Varasemalt on näidatud, et geenid, mis osalevad sellistes bioloogilistes protsessides nagu nukleiinhapete metabolism, proteiinide modifikatsioonid ja mRNA transkriptsioon, on kõrgelt üleekspresseeritud esimese trimestri platsentas. Samas geenid, mis osalevad raua transpordis ja neuronite aktiivsuses, on kõrge ekspressioonitasemega kolmandal trimestril. Lisaks on näidatud imprintsitud geenide *IGF2* ning *PHLDA2* ekspressiooni erinevust raseduse eri etappidel (Sitras *et al.*, 2012). Ka loote kasvu ja arengu ning humoraalse immuunsusega seotud imprintsitud geeni *MEG3* puhul on näidatud ajalist ekspressiooni erinevust. See tõuseb märgatavalt alles poole gestatsiooniaja möödudes (Uusküla *et al.*, 2012).

3.2.1 Geeniekspressiooni epigeneetiline regulatsioon

Geeniekspressiooni reguleeritakse transkriptsiooni ja translatsiooni tasemel. Transkriptsiooniline regulatsioon jaguneb geneetiliseks ja epigeneetiliseks. Epigeneetiline regulatsioon hõlmab pärilikke muutusi DNA struktuuris, mis ei ole seotud nukleiinhapete järjestusega, kuid mis mõjutavad transkriptsiooni (Waterland, 2006). Erinevad keskkonnafaktorid nagu toitainete vaegus, stress või toksiinid võivad esile kutsuda epigeneetilisi modifikatsioone. Tulenevalt nendest kõrvalekalletest võib muutuda kromatiini kokkupakituse tase ning seeläbi ka geeniekspressioon, mis omakorda võib viia mitmete haiguste avaldumiseni (Jaenisch *et Bird*, 2003). Epigeneetilised modifikatsioonid, mis loovad aktiivse kromatiini oleku, reguleerivad geeniekspressiooni positiivselt. Kromatiini maha surutud oleku korral on tegemist modifikatsioonidega, mis reguleerivad ekspressiooni negatiivselt (Piedrahita, 2011).

Organismide individuaalses arengus toimub eri rakutüüpides pidev kromatiini pakkimine ja ümberpakkimine, histoonide modifitseerimine ja DNA metüleerimine, mis on kõik olulise tähtsusega geenide avaldumisel ja organismi arengus (Nienstedt *et al.*, 2005).

5'-positsiooni tsütosiinjäägi metülatsioon on DNA pöörduv kovalentne modifikatsioon, mille produktiks on 5-metüül-tsütosiin (Newell-Price *et al.*, 2000) ja umbes 3% tsütosiinidest on inimese DNA's metüleeritud (Nafee *et al.*, 2008). Metüülrühmad võimaldavad normaalset vesiniku seondumist ning samuti vastutavad need ka DNA biofüüsikaliste muutuste eest (Prokhortchouk *et Defossez*, 2008). Imprintitud geenide klastreid seostatakse erinevate DMR regioonidega (*differentially methylated regions*). DNA metülatsioon nendes regioonides on vajalik alleelspetsiifiliseks ekspressiooniks enamikes imprintitud geenides (Li *et al.*, 1993).

DMR'e, mis kontrollivad monoalleelset ekspressiooni, kutsutakse ICR'ideks (*imprinting control regions*). Need omakorda osalevad kromatiini organiseerimises (Yoon *et al.*, 2002).

Eukarüootide rakkudes moodustavad histoonide proteiinid koos DNA'ga kromatiini. Histoonid aitavad DNA'd pakkida nii, et see mahuks tuuma, kuid on näidatud ka nende tähtsust geeniekspressiooni regulatsioonis. Histoonide modifikatsioonid mõjutavad transkriptsiooni kolme printsiibi järgi:

- post-translatsioonilised modifikatsioonid (PTM) mõjutavad kromatiini struktuuri, reguleerides selle kõrgemat konformatsiooni.
- PTM häirivad kromatiiniga seotud valkude seondumist;
- PTM tõmbavad kromatiinile ligi nn efektorvalke (Kouzarides *et Berger*, 2007).

Nende protsesside tulemusel tekib inimese konkreetse genotüübi põhjal suur hulk epigeneetilisi tunnuseid, mille tekkepõhjused ei pärandu järglastele sugurakke kaudu (Nienstedt *et al.*, 2005).

Koespetsiifiline geeniekspressioon annab hea ettekujutuse epigeneetilisest geeniregulatsioonist. Kui ühe indiviidi hepatotsüüdid ja enterotsüüdid mõlemad sisaldavad sama DNA komplementi ehk kogu inimgenoomi, siis hepatotsüüdid ekspresseerivad enterotsüütidest väga erinevaid gene. Nende rakuspetsiifiline ekspressioon säilitatakse täie täpsusega. Epigeneetilised mehhanismid on tähtsad reguleerimaks koespetsiifilist geeniekspressiooni läbi järjestikuste DNA replikatsioonitsükli. Paljudes kudedes algab protsess varases arengustaadiumis ning jätkub kogu elu. Epigeneetiline geeniregulatsioon toimub läbi mitme molekulaarse mehhanismi koostöö. DNA kondenseeritakse histooni valkudega kõrgelt organiseeritud kompleksiks – kromatiiniks. See võimaldab suurt DNA

hulka mahutada väiksesse rakutuuma. Kromatiin toimib kui dünaamiline regulaator (Prickett *et* Oakey, 2012; Waterland, 2006). Koe- ja rakuspetsiifilisuse korral on osad kromosomaalsed regioonid tihedalt kondenseeritud heterokromatiiniks ning teised avatud ja transkriptsiooniliselt aktiivseks eukromatiiniks (Vermaak *et al.*, 2003). Kromatiini konformatsiooni ja transkriptsioonilist aktiivsust juhivad mehhanismid, milleks on tsütosiinide metülatsioon koos tsütosiin-fosfodiester-guanosiin (CpG) dinukleotiididega, mitmed histoonvalkude modifikatsioonid ja autoregulaatorsed DNA-siduvad valgud (Jaenisch *et* Bird, 2003).

3.2.1.1 Genoomne imprinting

Genoomne imprinting on geneetilise info valikuline ekspressioon (genoomi, kromosoomi, alleeli jne tasandil) sõltuvalt sellest, kas see geneetiline materjal pärineb isalt või emalt, mis ei ole tingitud muutusest DNA nukleotiidses järjestuses. Imprinting tõestab, et peale DNA nukleotiidses järjestuses võivad ka teised DNA iseärasused edasi päranduda (Alberts *et al.*, 2008).

Imetajarakud on diploidsed rakud, mis on pärinud ühe geenikogumiku isalt ja teise emalt (Alberts *et al.*, 2008). Enamus autosoomseid geene diploidsetes imetajarakkudes on ekspresseeritud bialleelselt ema- ja isapoolsetelt alleelilt. Osade geenide puhul on näidatud monoalleelset või kõrgelt ebasümmeetrilist ekspressiooni (Ishida *et* Moore, 2013). Idutee rakkude väljakujunemisel on imprintitud geenid märgitud metülatsiooniga sõltuvalt sellest, kas need on esindatud spermis või munarakus. DNA metülatsioon on vajalik selleks, et märgistada ja eristada kahte geenikoopiat, mis muidu võivad olla täiesti identsed. Imprintitud geenid ei ole mõjutatud pärast viljastumist aset leidva demetülatsiooni poolt. See märgi võimaldab somaatilistel rakkudel meelde jätta kummagi geenikoopia päritolu ja reguleerida nende ekspressiooni vastavalt sellele (Alberts *et al.*, 2008).

Inimeses on kõrgelt ekspresseeritud imprintitud geene detekteeritud arenevas ning täiskasvanud ajus, kus need mõjutavad aju funktsiooni ja käitumist (Davies *et al.*, 2005), platsentas (Yuen *et al.*, 2011), maksas (Davies, 1994) ning diferentseerumata tüvirakkudes, kus imprintitud geenid omavad olulist rolli rakkude diferentseerumises ning pre- ja postimplantatsioonilises embrüonaalses arengus (Sun *et al.*, 2006). Täiskasvanud vererakkudes on imprintitud geenid aga vähem ekspresseeritud (Frost *et al.*, 2010).

Imprintitud geene on tõenäoliselt genoomis umbes 1% (100–200 geeni). Tänapäevaks on inimeses tuvastatud 95 imprintitud geeni (*Genomic Imprinting Website*

<http://www.geneimprint.com> [4]) ning nimekiri täieneb pidevalt. Imprinditud geenide arvu on raske määrata, kuna monoalleelne ekspressioon võib avalduda vaid ühel isovormil, spetsiifilises koes või ainult konkreetses arengustaadiumis (Monk *et al.*, 2006; Lambertini *et al.*, 2008).

Imprinditud geenide düsregulatsiooni ja imprintingu kaoga (*loss of imprinting* – LOI) on seostatud ka suurt hulka inimestel esinevaid haigusi, sh sünnidefektid, neuroloogilised kõrvalekalded ja vähk (Diplas *et al.*, 2009; Jelinic *et Shaw*, 2007).

3.2.1.2 Imprinting platsentas

Imprinditud geenidel on oluline roll platsenta ning loote kasvus ja arengus. Need aitavad reguleerida loote kasvu üsasiseste ema ja loote vaheliste signaalide kaudu (Frost *et Moore*, 2010). Varasemalt on näidatud üle 50 geeni imprintingut inimese platsentas (Lisa 1.). Imprinditud geenid mängivad olulist rolli lapse tervise kujunemisel ning enamus tähtsaid genee on reguleeritud genoomse imprintingu poolt just embrüo ning loote arengu jooksul (Metsalu *et al.*, 2014).

Enamik teadaolevaid imprinditud genee on platsentas ekspresseerunud ja spetsiifiliselt platsentas imprinditud. Seletamaks imprintingu esinemist platsentas on püstitatud nn „vanema ja loote geneetilise konflikti teooria“. Selle teooria kohaselt soodustavad isapoolselt alleelilt ekspresseeritud geenid järglase kasvu sünnieelsel perioodil ning emapoolselt ekspresseeritud geenid käituvad kui loote kasvu pidurdajad, et toetada ema organismi raseduse jooksul (Badcock *et Crespi*, 2006). Seega on imprintingu kaoga seostatud ka sünnidefekte (sh IUGR) (Diplas *et al.*, 2009).

Platsentas imprinditud geenide seas on näiteks geen *PEG10* (*paternally expressed 10*) (Smallwood *et al.*, 2003), mis reguleerib varajast embrüonaalset arengut (Ono *et al.*, 2006). Seda geeni ekspresseeritakse süntsüütio- ning tsütotrofoblastides, endoteelirakkudes ning stroomas. *PEG10* kõrget ekspressioonitaset on märgatud preeklampsia puhul (Chen *et al.*, 2012) ning maksavähi puhul on *PEG10*'l näidatud imprintingu kadu (Gao *et al.*, 2010).

RHOBTB3 geeni imprintingut näidati DNA metülatsiooni profiili analüüsil baseerivas uuringus (Yuen *et al.*, 2011). *RHOBTB3* võtab osa mitmetes rakulistes protsessides, nt endotsütoos, morfogenees, tsütokinees, transkriptsiooni aktivatsioon, apoptoos jne (Ramos *et al.*, 2002). Metsalu *et al.* (2014) näitasid, et *RHOBTB3* ekspressioon on oluliselt kallutatud isapoolse alleeli ekspressiooni suunas ja kinnitasid varasemalt esitatud tulemusi. Varasemalt ei ole *RHOBTB3* geeni kasvu kontekstis uuritud, kuid see on uus imprinditud geen ning selle

kohta on vähe teada. See annab alust seda geeni ja tema funktsioone lähemalt uurida.

PAPPA2 (*pregnancy-associated plasma protein A2*) geeni ekspresseeritakse platsenta hattude süntsüütiotrofoblastides ning see osaleb platsenta normaalses arengus. *PAPPA2* mõjutab inimese pikkust (Allen *et al.*, 2010). Seda geeni on uuritud ka preeklampsia puhul, kuna raseduse komplikatsioonid sel juhul on seotud just *PAPPA2* geeni üleekspressiooniga, ning HELLP (*Hemolytic anemia, Elevated Liver enzymes, and Low Platelet count*) sündroomiga (Buimeret *et al.*, 2008). Metsalu *et al.* (2014) tõi esmakordselt välja võimaliku *PAPPA2* geeni imprintingu, ning leidis emapoolse alleeli ekspressiooni. Samuti toodi selles uuringus välja, et *IGF2* võib olla reguleeritud *PAPPA2*'e emapoolse selektiivse ekspressiooni kaudu, mis omakorda limiteerib *IGFBP*'d (*insulin-like growth factor-binding proteins*) ning *IGF2*'e vabanemist. *PAPPA2* omab olulist rolli ka koe arengus, metaboolses regulatsioonis ning immuunsüsteemi mehhanismide kontrollis (Metsalu *et al.*, 2014).

3.2.1.3 Imprinditud geenidega seotud haigused

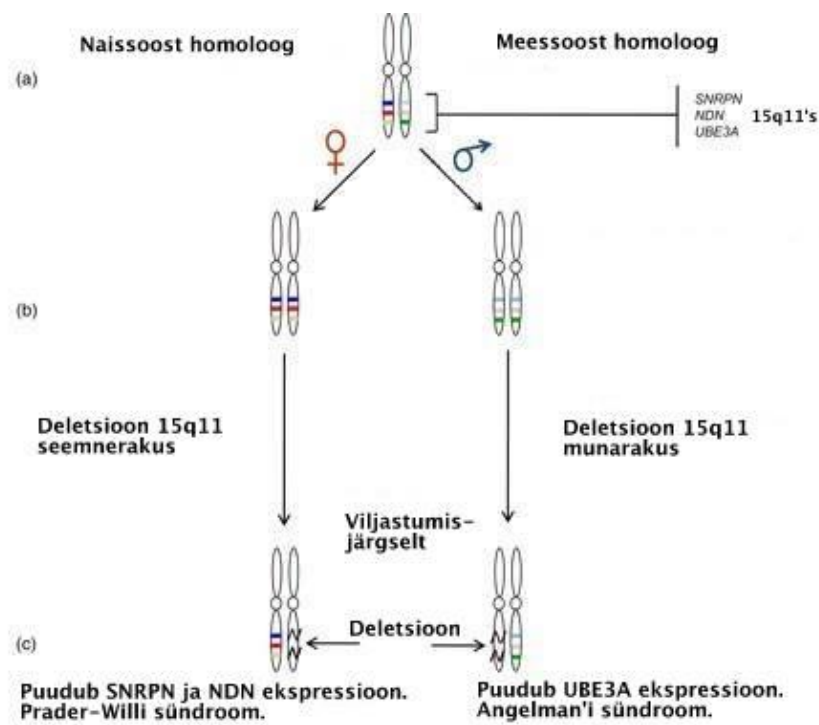
Imprinditud geenidel on inimese tervise ja normaalse arengu seisukohast väga oluline roll. Häired epigeneetiliste geenide töös ning seal esinevad epimutatsioonid viivad mitmete haigusteni. Muutusi nendes geenides on mitmesuguseid, enamasti kromosomaalne duplikatsioon ja deletsioon. Ka ebanormaalsel metülatsioonimustril on kirjeldatud kui gametogeneesi käigus tekkinud defekti (Ishida *et Moore*, 2013).

Imprinditud geenidega seotud haigused on haruldased, kuid tõsised ning suurt hulka neist arvatakse vastutavat inimese normaalse kasvu ning arengu eest. Imprinditud geenidega seotud haigusi:

- Prader–Willi ja Angelman'i sündroom (PWS ja AS)

PWS sümptomiteks on vaimne alaareng, väike sünnikaal ja –kasv, hüpotoonia ning hiljem ka ülekaalulisus (Cassidy *et Driscoll*, 2009). 70% PWS'i patsientidest esineb deletsioon isapoolse 15. kromosoomi 15q11-13 piirkonnas (Joonis 4.).

AS'i puhul on tegemist haigusega, mida iseloomustab intellektuaalne mahajäämus, mikrotsefaalia ehk pisipeasus ning sageli ebaadekvaatselt rõõmus meeleolu. Kromosomaalne deletsioon 15q11-13 piirkonnas esineb samuti umbes 70% patsientidest, kuid erinevalt PWS'st on deletsioon alati emapoolsele kromosoomil (Buiting, 2010).



Joonis 4. PWS'i ning AS'i puhul toimuvad kromosomaalsed muutused. (Biliya *et Bulla*, 2010)

- Silver–Russell'i sündroom (SRS)

SRS'i sümptomiteks on sünnieelne ja -järgne kasvupiirang koos skeletaalse asümmeetrilisuse ning väikese kolmnurgakujulise näoga (Abu-Amero *et al.*, 2008). mUPD'd (*maternal uniparental disomy of chromosome 7*) geenis esineb 10% ja isapoolne hüpometülatsioon *H19* DMR's kromosoomi 11p15.5 piirkonnas moodustab 35-65% haigusjuhtumitest (Abu-Amero *et al.*, 2008, 2010).

- Beckwith–Wiedemann'i sündroom (BWS)

BWS'i iseloomustab sünnieelne ja sünnijärgne ülekasv, platsenta ülekasv ja eelsoodumus embrüonaalsetele kasvajatele (Choufani *et al.*, 2010). Enamikel (85%) juhtudest on tegemist 11p15.5 imprintingu regiooni düsregulatsiooniga (Weksberg *et al.*, 2005). Pooltel patsientidest esineb hüpometülatsioon KvDMR1's, mis leiab aset *KCNQ1* imprintingu domääni ICR (*imprinting control region*) 11p15.5 regioonis, mis on normaalsel juhul emapoolselt metüleeritud (Azzi *et al.*, 2009; Bliet *et al.*, 2009; Rossignol *et al.*, 2006).

- Üsasisene kasvupeetus (IUGR)

Üsasisest kasvupeetust (*intrauterine growth restriction*) esineb peaaegu 10% kõigist rasedustest Ameerika Ühendriikides. Seda seostatakse põhiliste kasvu ja arenguga seotud

sünnieelsete haigestumiste ning suremuse juhtumitega (Apostolidou *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2001). Üsasisesse kasvupeetuse puhul võib imprintsitud geenid jagada kaheks: negatiivse efektiga (soodustavad IUGR'i teket ning vähendavad loote kasvu) ning positiivse efektiga (kompenseeriva mehhanismi kaudu tunnevad ära, et loode on ohus ja suurendavad loote kasvu) (Piedrahita, 2011).

Üsasisesse kasvupeetuse põhjustab platsenta puudulikkus ehk tasakaalu puudumine loote toitainete vajaduse ja platsenta varude vahel (Chaddha *et al.*, 2004). Platsenta transportfunktsiooni modifikatsioonid mõjutavad otseselt loote kasvu. Ema toitainete kättesaadavuse vähenedes (nt madal insuliin, lehtiin jne) kahaneb toitainete transport lootele, mis aeglustab tema kasvu (Lager *et Powell*, 2012). Kuna *IGF2* vastutab platsenta transportsüsteemide eest (Reik *et al.*, 2003), siis deletsioonid isapoolselt ekspresseeritud *IGF2* geenid viivad IUGR'i tekkeni (Mohamed *et al.*, 2012).

Platsenta puudulikkust seostatakse ebanormaalse embrüo implantatsiooniga koos kaasneva hüpoksilise emakasisese keskkonnaga. Selline esimene trimestri trofoblastide platsentatsioon on seotud ka ebanormaalse geeniekspressiooniga (Koklanaris *et al.*, 2006). Kasvupeetus suurendab ka metaboolsete haiguste kujunemise riski, nt ülekaalulisus, kardiovaskulaarsed haigused ning tüüp II diabeet (Sandler, 2012).

3.2.1.4 Imprintsitud geenide uurimismeetodid

Imprintsitud geenide detekteerimiseks on mitu strateegilist meetodit: võimalike imprintsitud geenidega regioonide molekulaarne iseloomustamine (Barlow *et al.*, 1991; Ferguson-Smith *et Grealley*, 2007), ülegenoomsed uuringud (Kaneko-Ishino *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2008) ning geenikaardistamise eksperimendid (DeChiara *et al.*, 1991).

Imprintsitud geenide uurimiseks ja tuvastamiseks on rakendatud kogu transkriptoomi RNA-sekveneerimise (RNA-Seq) meetodit, kuna see võimaldab uurida kogu genoomi ning annab täpsemaid tulemusi (Wang *et al.*, 2009), SNP genotüpiseerimist mikrokiibil (Gurgul *et al.*, 2014), ning kvantitatiivset reaalaaja PCR'i (qRT-PCR), mis võimaldab kvantitatiivselt hinnata geeniekspressiooni (Heid *et al.*, 1996).

4 EKSPERIMENTAALOSA

4.1 Töö eesmärk

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli uurida võimalike imprintitud geenide *RHOBTB3* ja *PAPPA2* ekspressiooni ning imprintingut inimese platsentas.

4.2 Materjal ja meetodika

4.2.1 Uuritavad ja proovide kogumine

Uuring on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt (luba nr. 213/T-21). Kõik proovid on kogutud Tartu Ülikooli Kliinikumi Naistekliiniku patsientidelt ajavahemikus aprill 2012 – jaanuar 2014. Uuringusse kaasatud emad ja isad täitsid küsimustiku ning allkirjastasid uuringus osalemise nõusoleku vormi. Osalenute keskmine vanus (keskmine \pm standardhälve) emal ja isal oli vastavalt $28,2 \pm 5,7$ ja $31,3 \pm 6,9$ aastat. Keskmine gestatsiooniaeg oli $39+3$ nädalat. Kõikidest uuringus osalenud vastsündinutest oli 22 normaalse kaaluga ning 14 vastsündinul oli diagnoositud üsasisene kasvupeetus. Normaalse kaaluga laste keskmine sünnikaal oli 3606 ± 418 g ning üsasisese kasvupeetusega lastel 2296 ± 392 g. Lapsed sündisid 26 juhul vaginaalselt, üheksal korral keisrilõikega ning ühel korral vaakumsünnitusega. Uuritavate andmed Lisas 3.

Platsenta proovid võeti esimesel võimalusel pärast keisrilõiget või vaginaalsünnitust. Kolmest erinevast kohast platsental võeti 1 cm läbimõõduga koeproovid, sel moel, et proov hõlmab kogu platsenta läbilõiget. Platsenta proovid asetati *RNAlater*'isse (Ambion®, Life Technologies™, Ameerika Ühendriigid) 24 h säilitamiseks $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures ning külmutati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures RNA eraldamiseks. Sünnituse järgselt koguti nabaväädi veri (4ml) ning vanemate perifeerne veri (9ml) DNA eraldamiseks.

4.2.2 DNA ja RNA eraldamine

4.2.2.1 DNA eraldamine

Vanemate perifeerne ja nabaväädi veri koguti etüleendiamiintetraatsetaati (EDTA) sisaldavatesse tuubidesse (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Co, Ameerika Ühendriigid) DNA eraldamiseks. Uuritavate P001-P012 verest eraldati DNA väljasadestamise meetodiga

(Lahiri *et* Nurnberger, 1991). Uuritavate P018-P134 verest eraldati DNA järgmise protokollil alusel:

- Veri sulatada, 15 ml tuubi pipeteerida 1 ml verd.
- Lisada 3 ml lüüsipuhvrit A (0,32 M sahharoos; 1 mM TrisHCl; 5 mM MgCl₂; 1% TritonX-100). Segada.
- Tsentrifugida rakud põhja 2500×g 10 minutit 4°C, eemaldada supernatant.
- Lisada sademele 1 ml MilliQ vett, loksutada tuubi käes ja kallata segu 2 ml tuubi, raputada käes.
- Tsentrifugida 13 000×g 2 minutit. Eemaldada supernatant, kuivatada tuubi serv puhta paberiga.
- Lisada sademele uuesti 1 ml mQ'd, korrata pesu kuni äravisatav supernatant on selge ja läbipaistev (3-4 korda).
- Kanda tuubi 745 µl lahust B (160 µl proteinaas K puhver (375 mM NaCl; 120 mM EDTA); 85 µg/ml proteinaas K; 1% SDS).
- Inkubeerida 55°C 30-60 minutit sademe lahustumiseni.
- Lisada tuubi 300 µl 5M NaCl'i, raputada kuni lahus läheb vahtu.
- Tsentrifugida 13 000×g 5 minutit.
- Kallata supernatant 15 ml tuubi, milles on 3 ml külma etanooli (96%).
- Kuivatada kuni etanool on aurustunud (~ 1 minut), lahustada DNA 200 µl mQ's. Inkubeerida toatemperatuuril loksutil, hoida üleöö +4 °C juures kuni DNA on täielikult lahustunud.

DNA kontsentratsioon mõõtmiseks kasutati NanoDrop 2000 Spectrophotometer'it (Thermo Fisher Scientific Inc., Ameerika Ühendriigid) ja proovid säilitati -20°C juures.

4.2.2.2 RNA eraldamine

RNA eraldati külmutatud platsenta koest. Proovid sulatati jääl ning 50-250 mg kudet kasutati RNA eraldamiseks *mirVana*TM miRNA Isolation Kit'iga (Ambion®, Life TechnologiesTM, Ameerika Ühendriigid) vastavalt tootja juhistele. Lõpuks elueeriti RNA 100 µl eelsoojendatud Elution Solution'is.

RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni määrati Agilent 2100 Bioanalyzer'i the RNA 6000 Nano Kit'iga (Agilent Technologies, Ameerika Ühendriigid).

Samast platsentast eraldatud kolm RNA proovi (iga proovi 5 µg) segati kokku. RNA proovide kokku segamisele järgnes DNAasi töötlus DNA-free™ Kit'iga (Invitrogen™, Life Technologies™, Ameerika Ühendriigid) vastavalt tootja juhistele. DNAasi töötlust järgselt saadi 96 µl RNAd. RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni määrati Agilent 2100 Bioanalyzer'i the RNA 6000 Nano Kit'iga (Agilent Technologies, Ameerika Ühendriigid).

RNA proovid säilitati -80 °C juures. Edasises uuringus kasutati proove, mille RIN (*RNA integrity number*) oli vähemalt 4.

4.2.2.3 RNA-Seq, SNP genotüüpiseerimine ja bioinformaatiline analüüs

RNA-Seq teostati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonnas Kliinilise genoomika tuumiklaboris. RNA amplifitseeriti Ovation RNA-Seq System V2 Kit'iga (NuGen). Kaheaahelalist cDNA'd kasutati SOLiD 5500 System DNA fragmendi raamatukogu ettevalmistamiseks vastavalt tootja juhistele (Life Technologies™, Ameerika Ühendriigid).

SNP genotüüpiseerimine toimus Tartu Ülikooli Eesti geenivaramus. Selleks genotüüpiseeriti kõigi uuringus osalejate (ema, isa, laps) eksoomi SNP'd Illumina HumanExome BeadChip v1.1 SNP mikrokiibiga (Illumina®, Ameerika Ühendriigid). Genotüüpiseeritud proovide ja markerite *call rate* (tegelike signaalide arvu suhe kõigi võimalike signaalide arvuga protsentuaalselt) oli 95%.

Bioinformaatilise analüüsi teostas Tauno Metsalu (MSc) Tartu Ülikooli Arvutiteaduste Instituudist.

4.2.3 Imprinditud geenide RHOBTB3 ja PAPP2 valideerimine

4.2.3.1 SNP'de valimine genotüüpiseerimiseks

PEG10, *PAPP2* ja *RHOBTB3* imprintingu detekteerimiseks genotüüpiseerimisega valiti informatiivsed SNP'd välja varasemalt kogutud RNA-Seq'i andmete põhjal (Metsalu *et al.*, 2014). Otsiti 500 bp geenipiirkondi, mis sisaldaks võimalikult palju SNP'e, mis RNA-Seq'i analüüsi tulemusena näitasid olulist alleelspetsiifilist ekspressiooni. Lisaparameetrina jälgiti, et nende SNP'de minoorse alleeli sagedus on dbSNP andmebaasis vähemalt 0,01 ja RNA-Seq'i andmete põhjal vähemalt 0,03. *PAPP2* geeni jaoks tuvastati selliseid piirkondi kolm ja

neis piirkondades oli kokku seitse informatiivset SNP'i, *RHOBTB3* geeni puhul samuti vastavalt kolm ja seitse. *PEG10* geenil uuriti kahte informatiivset SNP'i (Lisa 2.).

4.2.3.2 Komplementaarse DNA (cDNA) süntees

Platsenta RNA'st sünteesiti cDNA Sangeri sekveneerimiseks ja kvantitatiivseks PCR'iks ThermoScientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'iga (K1622) (Thermo Fisher Scientific Inc., Ameerika Ühendriigid) juhuslikult valitud heksameersete praimeritega. Iga cDNA sünteesiks kasutati 144-500 ng RNA'd. Reaktsioon viidi läbi MyCycler Thermal Cycler'is (Bio-Rad Laboratories Inc., Ameerika Ühendriigid) järgmistel tingimustel: 25 °C 5 minutit, 42 °C 60 minutit ja 70 °C 5 minutit.

4.2.3.3 Sangeri sekveneerimine

Genotüüpiseerimiseks kasutati Sangeri sekveneerimise meetodit (Adams, 2008). Esmalt kasutati PCR-i sekveneeritavate genoomi osade amplifitseerimiseks. Selleks disainiti praimerid *PAPPA2*, *RHOBTB3* ja *PEG10* geenide informatiivsete SNP'de jaoks (Lisa 2.).

Praimerite disainimisel kasutati järgnevaid andmebaase ja programme:

- NCBI SNP andmebaas
- SNP masker
- Primer3Plus
- GenomeTester (praimerite kontroll)
- OligoCalc (praimerite kontroll)

PCR'i 10 µl mahuga reaktsioonis kasutati 1 × Hot FirePol[®] Buffer B1 (Solis BioDyne, Eesti), 0,25 mM dNTP segu (dATP, dGTP, dTTP ja dCTP) (Thermo Fisher Scientific Inc., Ameerika Ühendriigid), 2,5 mM MgCl₂'i (Thermo Fisher Scientific Inc., Ameerika Ühendriigid), 1 U Hot FirePol[®] DNA polymerase (Solis BioDyne, Eesti), 31-177 ng DNA või 1 µl cDNA ja 0,8 µM kumbagi praimerit (Microsynth AG, Šveits). Reaktsioon viidi läbi Aeris[™] Thermal Cycler'is (Esco, Ameerika Ühendriigid) järgmistel tingimustel: 95 °C 15 minutit (esmane denaturatsioon), 35 tsükli: 95 °C 30 sekundit, 61°C 30 sekundit ja 72 °C 50 sekundit, millele järgnes lõppekstensioon 72 °C 5 minutit.

PCR'i järgselt kontrolliti produkti suurust geelelektroforeesil, kasutades 1,5% agarosgeeli, millele lisati etiidiumbromiidi (EtBr), mis seondub DNA'ga ning ergastub ultraviolett-

kiirguses. Elektroforees viidi läbi Mupid®-exU foreesiaparaadil (Advance Co., Jaapan) 0,5% TAE puhvris 135 W juures 10 minutit. DNA visualiseeriti geelil 260 nm juures UV illuminaatori abil.

Sekveneerimise tulemusena saadud järjestustest määrati informatiivsete SNP' de genotüübid. *RHOBTB3*, *PAPPA2* ja *PEG10* geeni sekveneeriti varasemalt Metsalu *et al.* töös uuritud perekondadel (Lisa 3.). Varem analüüsitud perekondade hulgast (P001-P014) valiti perekonnad valideerimiseks välja selle järgi, kas RNA-Seq'i analüüsil leiti alleelspetsiifilise geeniekspressiooniga SNPsid. *PAPPA2* geeni analüüsiks lisati veel 13 normaalse vastsündinuga perekonda (Lisa 3.), kus esmalt sekveneerisime lapse nabavädi DNA. Lapse heterosügootsuse puhul sekveneeriti platsenta cDNA. Kui platsenta genotüüp samas positsioonis oli homosügoot, siis viitas see imprintingule ning sekveneeriti lisainformatsiooni saamiseks vanemate DNA, et võimalusel määrata platsentas ekspresseeritud alleeli päritolu.

Sekveneerimine viidi läbi Eesti Biokeskuse sekveneerimise tuumiklaboris ning selleks kasutati BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i (Life Technologies Inc., Ameerika Ühendriigid). Reaktsioonis kogumahuga 10 µl kasutati 1 µl PCR produkti. Elektroforees viidi läbi ABI Prism 3730 DNA Analyzer'iga (Life Technologies Inc., Ameerika Ühendriigid). Tulemusi analüüsiti 4peaks genotüpiseerimisprogrammiga.

4.2.4 Geeniekspressiooni analüüs normaalse sünnikaaluga lastel ja kasvupeetusega lastel

4.2.4.1 Kvantitatiivne RT-PCR

Viie geeni (*LEP*, *MEST*, *DNMT1*, *RHOBTB3*, *PAPPA2*) ekspressiooni analüüsiti kvantitatiivse RT-PCR'iga (qRT-PCR) 20 normaalse kaaluga ja 14 üsasisese kasvupeetusega vastsündinu platsentas. *SDHA* geeni (*succinate dehydrogenase complex, subunit A*) kasutati referentsgeenina. qRT-PCR'i jaoks vajalik cDNA sünteesiti nagu eelnevalt kirjeldatud.

qRT PCR'i jaoks disainiti praimerid (Tabel 1.) kasutades andmebaase:

- NCBI Gene
- Primer3Plus
- Ensembl
- UCSC Genome Bioinformatics

Tabel 1. RT-PCR'i jaoks kasutatud praimerite järjestused.

Geen	Fw praimer	Rev praimer
<i>DNMT1</i>	5'-GTGGGGGACT GTGTCTCTGT-3'	5'-TGAAAGCTGC ATGTCCTCAC-3'
<i>LEP</i>	5'-TGACACCAAA ACCCTCATCA-3'	5'-CCAGCACGTG AAGAAGATCC-3'
<i>MEST</i>	5'-AACCGCAGGA TCAACCTTCT-3'	5'-TGACAGCACA CCTCCATCTT-3'
<i>RHOBTB3</i>	5'-GATGCTTGCC GATGTTGTCT-3'	5'-CACCATAAAC GGGAATCAGG-3'
<i>SDHA</i>	5'-TGGGAACAAG AGGGCATCTG-3'	5'-CCACCACTGC ATCAAATTCATG-3'
<i>PAPPA2</i>	5'-AGAACAACCC AGCCATCATC-3'	5'-AGATGGTGCC TTTCTTCACG-3'

qRT-PCR'i 20 µl mahuga reaktsioonis kasutati 1 × HOT FIREPol® EvaGreen® HRM ROX Mix (Solis Biodyne, Eesti), 250 nM iga praimerit (Microsynth AG, Šveits) ning 2 µl eelnevalt lahjendatud (1:10) cDNA'd. Kõik proovid analüüsiti kahes korduses. RT-PCR viidi läbi 7500 Fast Real-Time PCR Systems'iga (Life Technologies, Ameerika Ühendriigid).

qRT-PCRi tulemusi analüüsiti ABI Prism 7900HT Sequence Detection System tarkvaraga ja määrati lävetsükkel (C_T). Seejärel leiti C_T , mille puhul lahutati uuritava geeni C_T väärtusest referentsgeeni *SDHA* C_T väärtus. Arvutati ka keskmine C_T väärtus iga geeni ning kahe paralleelkatse kohta ning seejärel võrreldi ekspressiooni taset kahes erinevas uuringugrupis. Ekspressioonitaseme korduse erinevused tsüklifaaside vahel arvutati kasutades 2^{-C_T} valemit (Bubner *et* Baldwin, 2004), kus: $C_T = (\text{normaalse kaaluga } C_T - \text{üsisisese kasvupeetusega } C_T)$.

Andmete statistiliseks analüüsiks kasutati t-testi. Statistiliselt oluliseks loeti p-väärtust $<0,05$.
T-test sooritati Microsoft Excel-is.

4.3 Tulemused

RNA-Seq'i ning SNP mikrokiibi genotüpiseerimisel saadud andmete analüüsi tulemusena detekteeriti 33 imprintingu kandidaatgeeni, mis läbisid viimase bioinformaatilise selektsiooni etapi. Selleks vaadati kõiki nendes geenides paiknevaid SNP'sid, lisaks mikrokiibil analüüsitutele need SNP'd, mida oli võimalik RNA-Seq'il detekteerida ja leida dbSNP andmebaasis (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP [5]) Eeldati, et kõik heterosügootsed SNPd, mis paiknevad imprinditud geenis, on alleelspetsiifilise ekspressiooniga. Geenid, mille kõikidest heterosügootsetest SNPdest 75% näitasid olulist alleelspetsiifilist ekspressiooni, nimetati imprinditud geenideks. Sel moel kärbitud nimekirja jäi 12 imprinditud geeni: viis varasemalt tuvastatud imprinditud geeni (*AIM1*, *PEG10*, *RHOBTB3*, *ZFAT*, *ZFAT-AS1*) ning seitse uut imprinditud geeni (*ABP1*, *BCLAF1*, *IFI30*, *LGALS8*, *LGALS14*, *PAPPA2*, *SPTLC3*). Kinnitamaks saadud tulemusi ja rakendatud meetodi töökindlust, viidi läbi kolme geeni Sangeri sekveneerimine.

RHOBTB3 imprintingu valideerimiseks uuriti seitset *RHOBTB3* geeni informatiivset SNP'i (rs6815, rs7622, rs3184188, rs6697, rs12351, rs34898 ja rs34899) kaheksas normaalse sünnikaaluga lapsega perekonnas. Ühe SNP'i (rs3184188) puhul informatiivseid genotüüpe ei saadud. Viie perekonna lapsel esines heterosügootsust kõigis ülejäänud kuues SNP'is. Sekveneeriti juurde samade perekondade platsenta cDNA'd ning tulemuseks oli homosügootne genotüüp kõigil viiel juhul. Vanemate DNA sekveneerimise tulemusena saime määrata, et platsentas ekspresseeritud alleel on isapoolse päritoluga. Sellega kinnitasime, et *RHOBTB3* geen on platsentas imprinditud ning omab isapoolset ekspressiooni.

Platsentas imprinditud *PEG10* geeni analüüsimiseks Sangeri sekveneerimisega genotüpiseeriti kahte SNP'i (rs13073 ja rs13226637) seitsmes perekonnas. Neljas perekonnas saadi tulemuseks lapse heterosügootsus ning monoalleelne platsenta cDNA genotüüp. Kõigil juhtudel olid platsentas detekteeritav alleel päritud isal. Ülejäänud kolmes perekonnas olid kõik määratud genotüübid homosügootsed ning ei osutunud imprintingu seisukohast informatiivseks. Antud valideerimise eksperimendi tulemusena kinnitasime samuti *PEG10* geeni imprintingut platsentas, mis oli vajalik selleks, et näidata meie eksperimentaalse lähenemise korrektsust uute imprinditud geenide tuvastamisel.

PAPPA2 imprintingu valideerimiseks kasutati 20 normaalse kaaluga vastsündinuga perekonda (Lisa 3.). Nabaväadi DNA sekveneerimise tulemusena saadud järjestustest määrati informatiivsete SNP'de genotüübid. Heterosügootsust esines kolmel lapsel (15%) viies

erinevas SNP'is (rs12137448, rs1044299, rs12137517, rs726252, rs10913241). Perekonna P002 puhul esines heterosügootsust neljas (rs12137448, rs1044299, rs12137517, rs10913241), P008 puhul kolmes (rs12137448, rs12137517, rs726252) ning P073 puhul ühes (rs726252) SNP'is.

Sekveneriti kolme platsenta cDNA'd (P002, P008, P073). Platsenta genotüüp informatiivsete SNP'ide puhul oli kõigil juhtudel homosügootne. Saamaks lisainformatsiooni platsentas ekspresseeritud alleelide päritolu kohta, sekveneriti P002, P008, P073 perekondade vanemate DNAd.

P002 perekonna esimese SNP'i (rs12137448) puhul saime ema genotüübiks C/G ehk sama, mis lapsel, ning isa genotüübiks G/G. Platsenta cDNA genotüüp samas SNP's oli homosügootne G/G. See näitas isapoolse alleeli ekspressiooni. Teise ja neljanda SNP'i (rs1044299, rs10913241) puhul ei olnud imprintingu alleelspetsiifilist ekspressiooni võimalik määrata. Kolmanda SNP'i (rs12137517) puhul oli tegemist samuti isapoolse alleeli ekspressiooniga.

P008 perekonna esimese SNP'i (rs12137448) puhul saime tulemuseks emapoolse alleeli ekspressiooni. Teise ja kolmanda SNP'i (rs12137517, rs726252) tulemused ei olnud piisavalt informatiivsed andmaks infot alleelspetsiifilise ekspressiooni kohta.

P073 perekonna ainukese SNP'i (rs726252) puhul oli tegemist imprintinguga, kuid vanemate heterosügootse genotüübi tõttu ei olnud võimalik määrata, kummalt vanemalt alleel pärit on.

Seega, vaatamata sellele, et ühel perekonnal tuvastati *PAPPA2* geeni imprinting ja emapoolne ekspressioon, siis teistes perekondades vastavat geeni regulatsiooni ei tuvastatud. Seetõttu võib olla tegemist mosaiikse imprintinguna, mille korral emapoolne monoalleelne geeniekspressioon esineb ainult vähestel perekondadel.

Geeniekspressiooni analüüs

Platsentas imprintsitud geenide *MEST*, *LEP*, *DNMT1*, *PAPPA2* ning *RHOBTB3* geeniekspressiooni uuriti kasutades qRT-PCR'i 20 normaalse sünnikaaluga ja 14 üsasisesse kasvupeetusega lapse platsenta RNA'st sünteesitud cDNA analüüsiks.

Võrreldes valitud geenide ekspressiooni normaalse sünnikaaluga laste ja kasvupeetusega laste grupis ei leitud statistiliselt olulist erinevust (kõikidel juhtudel $p > 0,05$; Tabel 2.).

Statistilise analüüsi tulemusena leiti, et *LEP* geen on normaalsete laste platsentas 2,6 korda kõrgemalt ekspresseeritud kui kasvupeetusega laste platsentas (Tabel 2.). Kuna *LEP* geeni

ekspressioonitaseme varieeruvus on suur, siis ei ole saadud erinevus ekspressioonis statistiliselt oluline.

Tabel 2. Normaalse kaalu ja üsasisese kasvupeetusega laste geeniekspressiooni võrdlemisel t-testiga saadud p-väärtused ning ekspressioonitaseme erinevus. $p < 0.05$ annab statistiliselt olulise tulemuse.

Geen	p-väärtus	Ekspressioonitaseme erinevus
<i>MEST</i>	0,07	0,7
<i>LEP</i>	0,15	2,6
<i>RHOBTB3</i>	0,42	1,2
<i>DNMT1</i>	0,17	0,8
<i>PAPPA2</i>	0,9	1,0

4.4 Arutelu

Imprintingu puhul on tegemist vanemlikust päritolust sõltuva monoalleelse geeniekspressiooniga. Täheldatud on tervist mõjutavaid tegureid imprinditud geenide ekspressioonis esinevate kõrvalekallete puhul. Platsentas imprinditud geenid osalevad platsenta ning loote kasvu ja arengu regulatsioonis ning mõjutavad närvisüsteemi funktsiooni (Davies *et al.*, 2005; Yuen *et al.*, 2011).

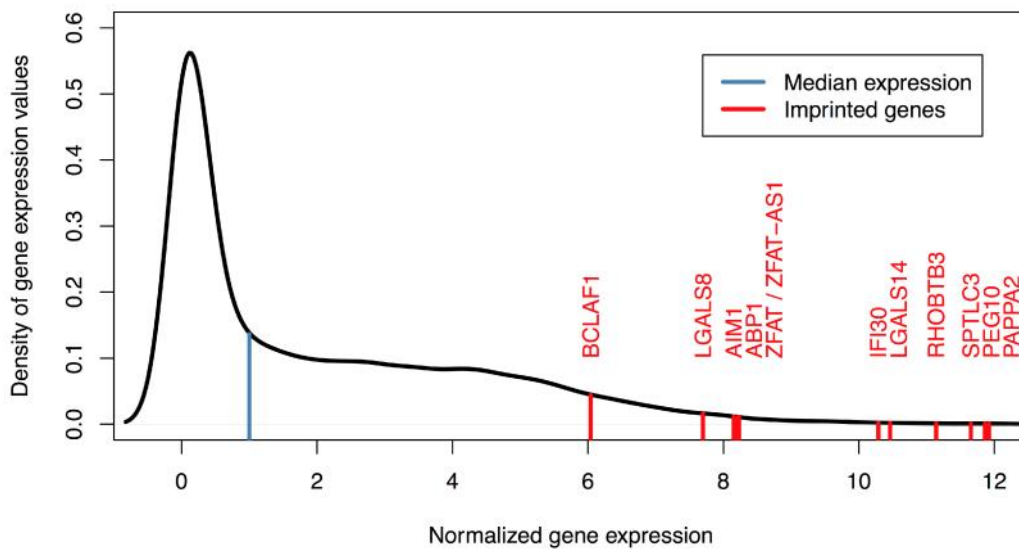
Imprinditud geene seostatakse mitmete inimestel esinevate patoloogiatega, kuna nende haploidne olek võimaldab epigeneetilisi muutusi, reguleerides geenide funktsiooni ning põhjustades potentsiaalselt kahjulikke terviserikkeid (Falls *et al.*, 1999). Imprintingu anomaaliad on tihti seotud just kasvu ja arengu ning neuroloogiliste kõrvalekalletega varajases arengustaadiumis. Imprinditud geene on analüüsitud Angelman'i ja Prader-Willi sündroomide, diabeedi, ülekaalulisuse ning erinevate vähivormide uuringutes.

RNA-Seq'i saab imprintingu uurimiseks kasutada vaid juhul, kui vanemate edasipäranduvad alleelid on selgelt erinevad. Samuti võivad geeniekspressiooni *cis*-regulatsioon, X-kromosoomi inaktivatsioon ja juhuslik monoalleelne ekspressioon mõjutada RNA-Seq'i tulemusi (Wang *et Clark*, 2014).

RNA-Seq'i ning SNP genotüpiseerimise kombineeritud analüüsil leiti antud töös seitse uut imprinditud geeni (*ABP1*, *BCLAF1*, *IFI30*, *LGALS8*, *LGALS14*, *PAPPA2* ja *SPTLC3*) ja kinnitati viie varasemalt publitseeritud imprinditud geeni monoalleelset ekspressiooni (*AIM1*, *PEG10*, *RHOBTB3*, *ZFAT* ja *ZFAT-ASI*). Tuvastatud imprinditud geenide poolt kodeeritud valkude põhilised funktsioonid on jaotatud kolmeks:

- rakulise apoptoosi ning kudede arengu vahendamine
- rakutsükli regulatsioon
- metaboolsete protsesside lihtsustamine

Tuvastatud imprinditud geenide ekspressioonitase oli kõrgem kui kõikide teiste geenide keskmine ekspressioon (Joonis 5.). Võimalik, et imprinditud geenide ekspressioon on kõrgem just seetõttu, et selles platsenta arenguetapis on nende geenide funktsioon olulisem. Lisaks võib tuvastatud imprinditud geenide kõrge ekspressioonitase näidata seda, et väljatöötatud meetod on sobilik just kõrge ekspressiooniga imprinditud geenide tuvastamiseks ja madalama ekspressiooniga geenid jäävad detekteerimata.

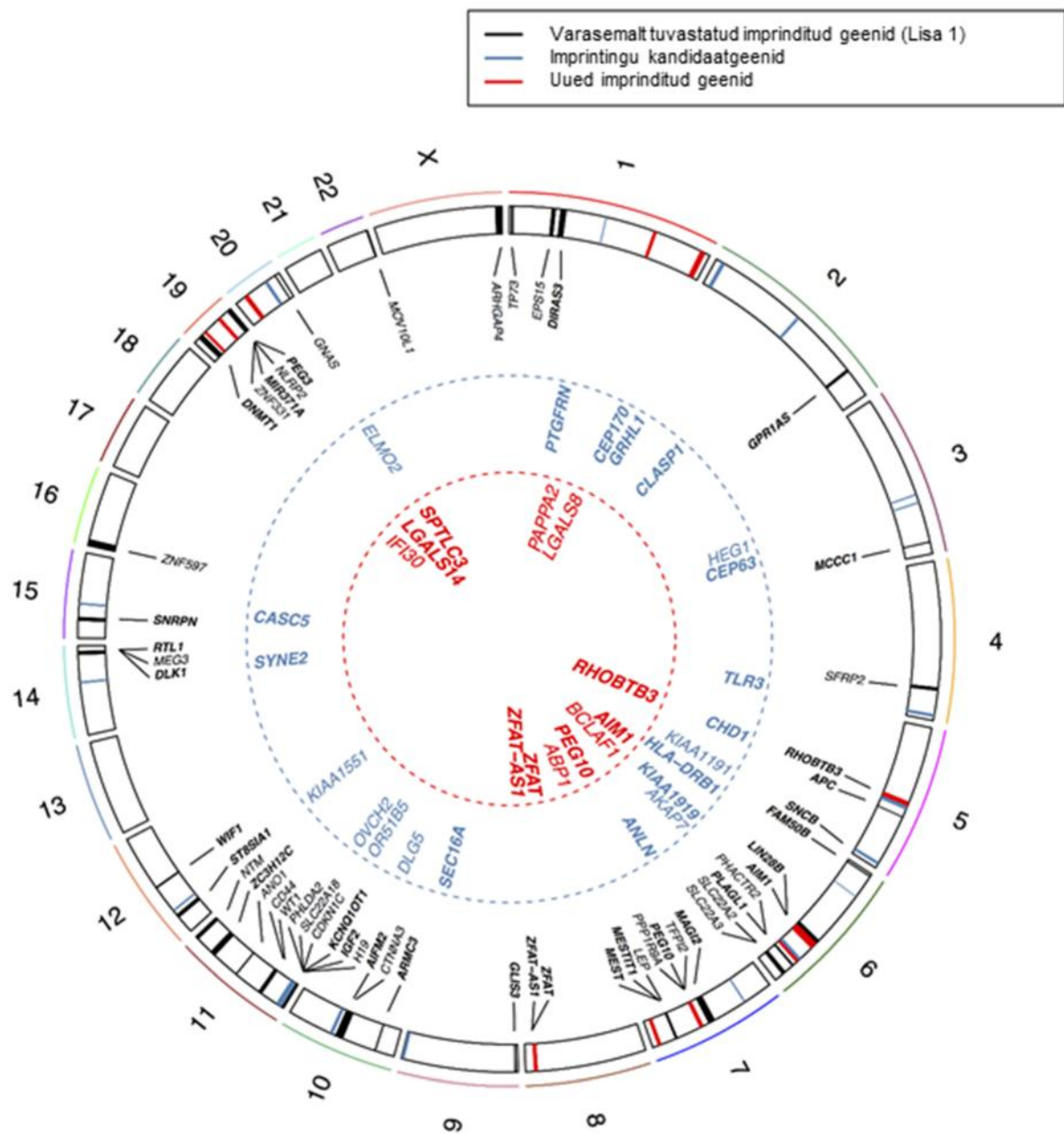


Joonis 5. Imprinditud geenide ekspressioonitase võrreldes kõikide teiste platsentas ekspresseeritud geenide ekspressioonitasemega (Metsalu *et al.*, 2014).

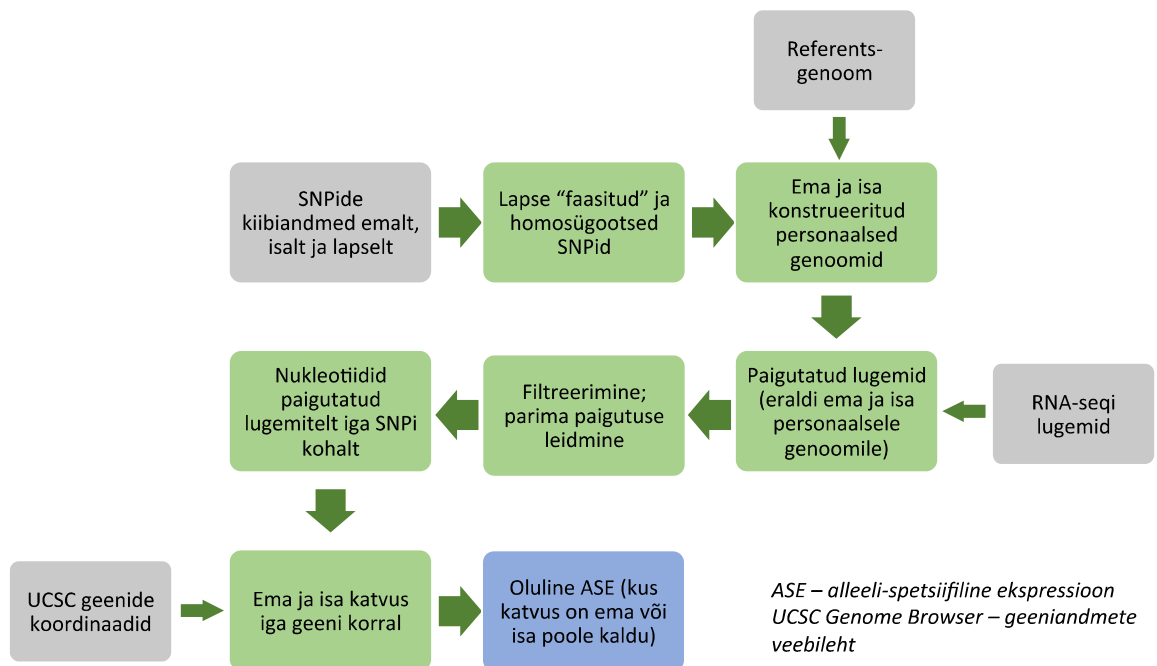
Varasemates uuringutes on oletatud, et imprinditud geenid asetsevad klastritena ning mitmeid selliseid klastreid on tuvastatud (Babak *et al.*, 2008). Uusi imprinditud gene on otsitud juba tuvastatud klastrite lähedusest, kuid sel moel hõlmatakse otsingusse ainult piiratud osa genoomist. Kogu transkriptoomi RNA-Seq'i kasutades saab uuringuid teostada ülegenoomselt ning võimalus leida uusi imprinditud gene klastritest kaugemal on suurem. RNA-Seq'i ja SNP genotüpiseerimise kombineeritud analüüsiga leitud uued imprinditud geenid (*ABPI*, *BCLAF1*, *IFI30*, *LGALS8*, *LGALS14*, *PAPPA2* ja *SPTLC3*) (Joonis 6.) ei asu varasemalt kirjeldatud imprinditud geenide klastrites ega nende läheduses. See kinnitab seisukohta, et tõenäoliselt enamik veel tuvastamata imprinditud gene paiknevad üksikult, geeniklastritest eemal ja on üle genoomi juhuslikult laiali (Wang *et al.*, 2013).

RNA-Seq'i puuduseks on vajadus paigutada lühikesi lugemeid referentsgenoomile. Paigutades lugemeid, milles on heterosügootsed SNP'd võib tekkida kallutatus referentsgenoomil esineva SNP'ga alleeli suunas. Referentsgenoomist erineva SNP'ga lugemid jääksid paigutamata ja tundub, et rohkem on ekspresseeritud referentsgenoomil esineva SNP'ga alleel (Degner *et al.*, 2009). Selleks, et ei tekiks kallutatust referentsalleeli poole, lähtuti Rozowsky *et al.* (2011) meetodist, mis integreeris nii isa kui ema genoomivariatsioonide informatsiooni diploidse referentsjärjestusse. See aitab ära hoida valepositiivsete imprinditud geenide detekteerimist. Metsalu *et al.* kasutatud tööjada (Joonis

7.) erines Rozowsky *et al.* omast analüüsitud informatsioonitüübi ja lugemite paigutamiseks kasutatud programmi poolest. Vanemate genoomide konstrueerimisel kasutati vaid SNP'ed mitte struktuuralseid modifikatsioone.



Joonis 6. Varasemalt kirjeldatud platsentas imprintsitud geenid, tuvastatud imprintingu kandidaatgeenid ning uued imprintsitud geenid (Metsalu *et al.*, 2014).



Joonis 7. Metsalu *et al.* kasutatud tööjada imprinditud geenide tuvastamiseks RNA-Seq'i ja SNP genotüpiseerimisega.

Varasemalt kirjeldatud imprinditud geenidest tuvastati viis. Uuringus kasutati SNP genotüpiseerimiseks mikrokiipi, millel oli esindatud 78% kõikidest geenidest vähemalt ühe SNP'ga. Kui välja sõeluda geenid, mille jaoks oli kiibil olemas informatiivne SNP, jääb alles 43% geenidest. Seega ei võimalda mikrokiibi uuring analüüsida kõiki gene, sh varem tuvastatud imprinditud gene. Selleks, et näha kogu geneetilist varieeruvust ning pärandumist, on vajalik tulevastes uuringutes kasutada kõikide pereliikmete kogu eksoomi järjestusi.

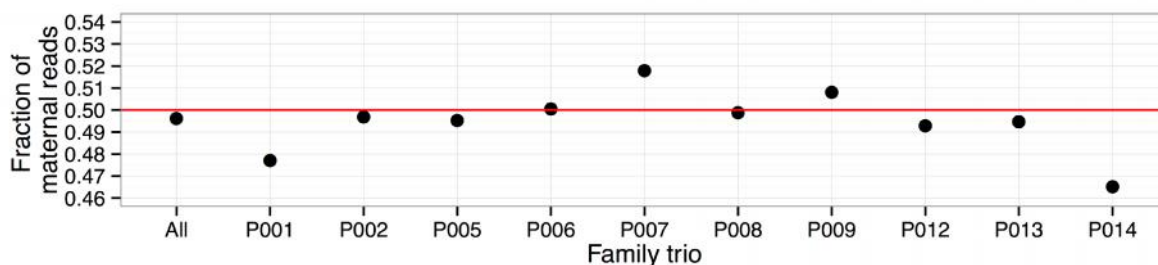
Ükski uuringus leitud imprinditud geenidest ei näidanud täielikku ühe alleeli vaigistamist, kõigi 12 imprinditud geeni puhul detekteeriti ka supresseeritud alleeli ekspressiooni. Varasemalt on näidatud, et vaigistatud alleeli ekspressiooni määr võib olla 5-35% (Daelemans *et al.*, 2010).

Kasutades ema, isa ja lapse DNA ning platsenta cDNA sekveneerimist on võimalik informatiivsete SNP'de genotüpiseerimisega kinnitada või ümber lükata geenide imprintingut. Informatiivseks on sellisel juhul SNP'd, mille genotüüp lapse DNA'l on heterosügootne ja platsenta cDNA'l homosügootne. Lisainfot platsentas ekspresseeritud alleeli päritolu kohta annab ema ja isa DNA sekveneerimine.

Varasemalt saadud RNA-Seq'i tulemuste kinnitamiseks sekveneeriti kandidaatgeenide *PAPPA2* ja *RHOBTB3* ning imprinditud geeni *PEG10* informatiivseid piirkondi.

Valideerimise tulemused näitasid 100% imprintingut *RHOBTB3* ja *PEG10* geeni korral ja mosaiikset imprintingut *PAPPA2* korral. Kusjuures *PAPPA2* korral esineb emapoolne geeniekspressioon suhteliselt harva.

RNA eraldamiseks antud töös kasutati kogu platsenta läbilõiget hõlmavat koeproovi. Seega sisaldas see ka platsenta osi, mis on geneetiliselt identsed emaga. Ema geneetiline materjal platsenta RNA proovis võib imprinditud geenide tuvastamist raskendada (Proudhon *et Bourc'his*, 2010). Sõltumata Proudhon *et Bourc'his* välja toodud väitest, et platsentas ekspresseeritakse emapoolselt aktiivseid gene rohkem, leiti, et proportsioon emapoolsete ja isapoolsete aktiivsete geenide ekspressioonis on sarnane (Joonis 8.).



Joonis 8. Emapoolsete lugemite määr kõikide geenide lõikes (Metsalu *et al.*, 2014).

Nii *PEG10* kui ka *PAPPA2* geenid osalevad rakulise apoptoosi ning koe arengu regulatsioonis. *PAPPA2* geeni võimalikku imprintingut ei ole varasemalt tuvastatud. *PAPPA2* ning selle paraloog *PAPPA*, mida ekspresseeritakse trofoblastide poolt, osalevad normaalses platsenta arengus (Tornehave *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 2009). Mõlemad valgud alandavad *IGFBP* ja tõstavad *IGF2* taset (Overgaard *et al.*, 2001). *PAPPA2* geeni imprinting vajab veel lisa valideerimist suuremas uuringugrupis, kuid imprintingu esinemine selles geenis aitaks lahendada isapoolselt ekspresseeritud *IGF2* geeni kui kasvu soodustaja balanseerimisega seotud probleemi.

RHOBTB3 geeni imprintingut oli varasemalt näidatud vaid ühes töös DNA metülatsiooni profiiliuuringute käigus (Yuen *et al.*, 2011), kus näidati vanemast sõltuvat alleelspetsiifilist ekspressiooni. *RHOBTB3* geeni valideerimistulemused kinnitasid varasemaid tulemusi, inimese platsentas ekspresseerub isapoolse päritoluga alleel.

PAPPA2 geeni Sangeri sekveneerimisel tuvastatud varieeruv monoalleelne geeniekspressioon on tõenäoliselt tingitud indiviidide vahelisest varieeruvusest või ei ole kasutatud valideerimismeetod siinkohal piisavalt tundlik. *RHOBTB3* geeni funktsiooni ja ka

imprintingut on vähe uuritud. See geen võtab osa rakutsükli regulatsioonist, kuid kasvu kontekstis seda uuritud ei ole. Samuti võtab *RHOBTB3* osa embrüonaalsest arengust ja võib mõjutada ka loote kasvu (Salas-Vidal *et al.*, 2005).

PAPPA2 geen osaleb platsenta normaalses arengus. Samuti on seda geeni seostatud ka inimese pikkusega (Allen *et al.*, 2010). *PAPPA2* võib olla seotud *IGF2* regulatsiooniga, mis omakorda võib mõjutada *IGF2* taset ema vereringes ning selle madala taseme korral põhjustada preeklampsiat ning üsasisest kasvupeetust (Christians *et Gruslin*, 2010).

Imprinditud geenide tuvastamise teeb keeruliseks imprintingu varieeruvus: monoalleelne ekspressioon võib avalduda ühes isovormis, spetsiifilises koes või ainult konkreetsetes arengustaadiumis (Monk *et al.*, 2006; Lambertini *et al.*, 2008). Seega käesoleva töö imprinditud geenide tuvastamisel saadud tulemusi tuleb käsitleda lõpuni kantud terve raseduse kontekstis ja neid ei saa laiendada platsentale kogu raseduse vältel.

Imprinditud geenid mängivad olulist rolli loote ja platsenta kasvus ning arengus. Vanema ja loote geneetilise konflikti teooria kohaselt soodustavad isapoolselt alleelilt ekspresseeritud geenid järglaste sünnieelset kasvu ning emapoolselt ekspresseeritud geenid käituvad kasvu pidurdavalt. Nende ülesanne sellel perioodil on toetada ema organismi. Kuna imprintingul on tähtis roll platsenta normaalses funktsioneerimises, siis võib järeldada, et imprinditud geenid on seotud ka üsasisese kasvupeetuse tekkega. Sellisel juhul esinevad häired transplatsentaarses toitainete ülekandes. Üsasisese kasvupeetusega loote platsenta spetsiifiliste imprinditud geenide ekspressiooniuuringud qRT-PCR'i abil on näidanud *PEG10* ja *IGF2* üleekspressiooni ning samuti *MEST* geeni alaekspressiooni (Diplas *et al.*, 2009; McMin *et al.*, 2006; Piedrahita, 2011). Need uuringud ei tõesta imprinditud geenide ainuolulist rolli IUGR'i väljakujunemisel. Kasvupeetuse kujunemise riskiteguriteks võivad olla ka infektsioonid, platsenta ebanormaalne funktsioneerimine, mille käigus saab loode liiga vähe toitaineid, ning emapoolsed faktorid, nagu suitsetamine ja hüpoksiline konditsioon (Ishida *et Moore*, 2013).

Käesolevas töös uuriti viie geeni ekspressiooni normaalse kasvuga ja üsasisese kasvupeetusega vastasündinutel. *DNMT1* on uus imprinditud geen (Das *et al.*, 2013) ja selle seost kasvuga ei ole varasemalt uuritud. Küll aga osaleb see geen aktiivselt rakulistes protsessides ning reguleerib koospetsiifilist metülatsiooni (Das *et al.*, 2013), tunneb ära hemimetüleeritud DNA ning lisab metüülrühmad replikatsiooni käigus tekkinud metüleerimata tütarahelatele (Leonhardt *et al.*, 1992). On eeldust arvata, et selle geeni imprinting võib loote kasvu mõjutada, kuna kõrvalkalduv *DNMT* de ekspressioon viib genoomi ebastabiilsuseni, mis omakorda soodustab mitmete haiguste teket, nt vähk, autoimmuunhaigused ja vaimsed

kõrvalekalded (Kvaratskhelia *et al.*, 2014). *DNMT1* on ka ainuke geen, mille mutatsioone seostatakse HSAN IE'ga (*hereditary sensory and autonomic neuropathy type IE*), mille sümptomiteks on vaimne mahajäämus, kurtus ning sensoorne neuropaatia (Klein, 2012).

LEP geeni translatsiooni produktiks on leptiin, mis kontrollib isu ning energia tasakaalu. Inimese kehakaal sõltub olulisel määral sellest geenist ja leptiini produktsioonist. Selle geeniga on seotud mitmed metabolismiga seotud haigused, nt ülekaalulisus (Campfield *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2014). Yuen *et al.* (2011) näitas ka *LEP* geeni imprintingut. Imprintitud geeni seos ülekaalulisusega viitab võimalikule kasvu ja arengu regulatsioonile. *MEST* geenil on tõestatud monoalleelset ekspressiooni ning muutused selles võivad soodustada ebanormaalse suurusega platsenta kujunemise (Lui *et al.*, 2008) ning samuti reguleerida ka loote kasvu (McMinn *et al.*, 2006). Kaks ülejäänud kandidaatgeeni (*RHOBTB3* ja *PAPPA2*) valiti eelneva valideerimise järgselt, et uurida ka nende ekspressiooni taset normaalse sünnikaaluga laste ning kasvupeetusega laste platsentades.

Tulemused statistiliselt olulist erinevust normaalsete vastsündinute ning kasvupeetusega vastsündinute vahel uuritud viie geeni puhul (*MEST*, *LEP*, *RHOBTB3*, *DNMT1* ja *PAPPA2*) ei andnud. Varasemalt on näidatud *MEST* geeni alaekspressiooni üsasisese kasvupeetusega vastsündinu platsentas (McMinn *et al.*, 2006). Samuti on kirjeldatud *MEST* geeniregulatsiooni häirete puhul ülekaalulisuse riski (Hajj *et al.*, 2013). Diplas *et al.* (2009) leidis, et *MEST* on platsentas kõrgelt ekspresseeritud, kuid nii üsasisese kasvupeetusega kui ka normaalses platsentas esineb vähene (<3%) imprintingu kadu.

Varasemates uuringutes on osade geenide puhul näidatud erinevusi üsasisese kasvupeetuse korral, kuid mitmete uuringute puhul ei ole õnnestunud erinevusi samades geenides kinnitada. Võimalik, et nende geenide üle- või alaekspressioon, mida konkreetsete haigustega seostatakse, ei toimu konstantselt, vaid konkreetsetes arenguetapis.

5 KOKKUVÕTE

Epigeneetiliste protsesside hulka kuuluval imprintingul on geenide ekspressioonis oluline roll. Mitmetel platsentas ekspresseeritud geenidel on kirjeldatud imprintingu olemasolu, kuid nimekiri nendest geenidest ei ole lõplik. Imprintitud geene on seostatud mitmete kasvu ja arenguga seotud haigustega ja ka loote üsasisene kasvupeetusega.

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli analüüsida ennekõike kahe imprintingu kandidaatgeeni *RHOBTB3* ja *PAPPA2* võimalikku imprintingut. Teiseks eesmärgiks oli võrrelda imprintitud geenide ekspressiooni üsasisese kasvupeetusega vastsündinute ja normaalse sünnikaaluga laste platsentas.

Kasutades RNA-sekveneerimist ja SNP genotüpiseerimist mikrokiibiga tuvastati 12 imprintitud geeni: *ABP1*, *BCLAF1*, *IFI30*, *LGALS8*, *LGALS14*, *PAPPA2*, *SPTLC3*, *AIM1*, *PEG10*, *RHOBTB3*, *ZFAT* ja *ZFAT-AS1*. Sangeri sekveneerimisega kinnitasime uue meetodi töökindlust ja *RHOBTB3* ja *PEG10* geeni 100% imprintingut ning isapoolse geenikoopia ekspressiooni. *PAPPA2* geeni korral aga näitasime mosaiikset ja harva esinevat imprintingut ja emapoolse alleeli aktiivsust. Samas ei saa välistada, et *PAPPA2* korral on tegemist harva esineva monoalleelse geeni ekspressiooniga, kus vaheldumisi võib olla aktiivne kas ema- või isapoolne geenikoopia. Lisaks analüüsisime viie imprintitud geeni (*MEST*, *LEP*, *RHOBTB3*, *DNMT1* ja *PAPPA2*) ekspressiooni platsentas normaalse loote kasvu parameetrite ning kasvupeetusega laste korral. Analüüsitud viie geeni korral ei esinenud olulist erinevust normaalsete laste ja kasvupeetusega laste platsentas. Edaspidistes töodes võiks suurendada uuritavate arvu, et leida rohkem imprintingu seisukohalt informatiivseid perekondi, kasutada imprintitud geenide tuvastamiseks kogu eksoomi genotüpiseerimist ning kaasata lisaks kasvupeetusega vastsündinutele makrosoomiaga vastsündinutega perekondi.

Imprintitud geenide rolli loote arengus ja genoomse imprintingu protsessi enese täielik mõistmine aitaks aru saada mitmetest inimese kasvu ja arenguga seotud protsessidest ning võimaldaks tulevikus luua paremaid terapeutilisi võimalusi loote meditsiinis.

6 SUMMARY

The Expression of Candidate Imprinted Genes *RHOBTB3* and *PAPPA2* in Human Placenta

Julia Koskar

Genomic imprinting is an epigenetic process that involves DNA methylation and histone modification in order to achieve parent-of-origin monoallelic gene expression without altering the genetic sequence. There is a list of imprinted genes identified in human placenta, but the list is not certainly complete. Imprinting has been associated with the normal placental and fetal development. The correct regulation of gene expression is crucial for a healthy pregnancy, as misregulation of imprinted genes is associated with pathologies, for example intrauterine growth restriction (IUGR). This is the reason why most of the genes that are regulated by genomic imprinting must be identified.

The aim of this study was to confirm previously identified imprinting of *RHOBTB3* gene and the possible imprinting of *PAPPA2* gene. The second part of the study concerns the comparison of imprinting in placentas of normal fetuses and in fetuses with uterine growth restriction.

The validation of *RHOBTB3* and *PAPPA* genes resulted in imprinted expression for both cases. The study confirmed the imprinting of *RHOBTB3* and showed maternal allele expression of *PAPPA2*, but the monoallelic expression in that gene seems to have a wide variability and needs to be additionally analyzed. We used a new method for studying the genomic imprinting. RNA-Seq and SNP genotyping was used for genome-wide studies. Twelve imprinted genes were found: *ABP1*, *BCLAF1*, *IFI30*, *LGALS8*, *LGALS14*, *PAPPA2*, *SPTLC3*, *AIM1*, *PEG10*, *RHOBTB3*, *ZFAT* and *ZFAT-AS1*.

The qRT-PCR was performed to measure the expression of imprinted genes (*MEST*, *LEP*, *RHOBTB3*, *DNMT1* and *PAPPA2*) in placentas of normal fetuses and in fetuses with IUGR. No significant differences between the two groups were found. The study groups should be increased in the future to provide the conclusive evidence about the gene imprinting in normal and IUGR pregnancies. In addition, the pregnancies and newborns with macrosomia should be included in the future studies.

Imprinted genes are important for the normal growth and development. The better understanding of this process and identifying new imprinted genes would help to realize the mechanisms of developmental diseases and to create better therapeutic opportunities for fetal medicine.

7 TÄNUAVALDUSED

Avaldan tänu oma juhendajatele Andres Salumetsale, Triin Viltropile ning Martin Kärnerile. Tänan abi ja praktiliste nõuannete eest Külli Samueli, Maire Petersit, Tauno Metsalu ning hea koostöö eest Gerly Sillastet.

Tänan kõiki uuringus osalenud perekondi ja uuritava materjali kogumise aeganõudva töö eest ämmaemandaid Sirje Kõvermägi ning Kätlin Marki.

8 KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- [1] Abu-Amero S, Monk D, Frost J, Preece M, Stanier P, Moore GE. The genetic aetiology of Silver–Russell syndrome. *J Med Genet.* 2008; 45, 193–199.
- [2] Abu-Amero S, Wakeling EL, Preece M, Whittaker J, Stanier P, Moore GE. Epigenetic signatures of Silver–Russell syndrome. *J Med Genet.* 2010; 47,150–154.
- [3] Adams JU. DNA Sequencing Technologies. *Nature Education.* 2008; 1(1):193.
- [4] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5th ed. (2008).
- [5] Allen HL, Estrada K, Lettre G. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature.* 2010; 467(7317): 832–838.
- [6] Apostolidou S, Abu-Amero S, O’Donoghue K, Frost J, Olafsdottir O, Chavele KM, *et al.* Elevated placental expression of the imprinted *PHLDA2* gene is associated with low birth weight. *J Mol Med.* 2007; 85:379-87.
- [7] Azzi S, Rossignol S, Steunou V, Sas T, Thibaud N, Danton F, Le JM, Heinrichs C, Cabrol S, Gicquel C, Le Bouc Y, Netchine I. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet.* 2009; Dec 15;18(24):4724-33.
- [8] Babak T, Deveale B, Armour C, Raymond C, Cleary MA, van der Kooy D, Johnson JM, Lim LP. Global survey of genomic imprinting by transcriptome sequencing. *Curr Biol.* 2008; Nov 25;18(22):1735-41.
- [9] Badcock C, Crespi B. Imbalanced genomic imprinting in brain development: an evolutionary basis for the aetiology of autism. *J Evol Biol.* 2006; 19:1007-32.
- [10] Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature.* 1991; 349: 84–87.
- [11] Bauer MK, Harding JE, Bassett NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, Evans PC, Woodall SM, Gluckman PD. Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol.* 1998

May 25;140(1-2):115-20.

[12] Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*. 2002; Oct;19(1):13-22.

[13] Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. ‘‘Pathology of the Human Placenta’’, pp 42-49 (2006).

[14] Biliya S, Bulla Jr. LA. Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. *Exp Biol Med*. 2010; 235:139

[15] Blik J, Verde G, Callaway J, Maas SM, De CA, Sparago A, Cerrato F, Russo S, Ferraiuolo S, Rinaldi MM, *et al.* Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including *PLAGL1* and *GNAS* loci in Beckwith–Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17, 611–619.

[16] Bröer S. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers Arch*. 2002; Jul;444(4):457-66.

[17] Bubner B, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep*. 2004 Nov;23(5):263-71.

[18] Buimer M, Keijser R, Jebbink JM, Wehkamp D, van Kampen AH, Boer K, van der Post JA, Ris-Stalpers C. Seven placental transcripts characterize HELLP-syndrome. *Placenta*. 2008; May;29(5):444-53.

[19] Buiting K. Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010; 154C, 365–376.

[20] Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res*. 1996; 28: 619–32

[21] Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader–Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17, 3–13.

[22] Cetin I, Marconi AM, Corbetta C, Lanfranchi A, Baggiani AM, Battaglia FC, Pardi G. Fetal amino acids in normal pregnancies and in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Early Hum Dev*. 1992; Jun-Jul;29(1-3):183-6.

[23] Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2004; 9:357-69.

- [24] Chen H, Sun M, Zhao G, Liu J, Gao W, Si S, Meng T. Elevated expression of *PEG10* in human placentas from preeclamptic pregnancies. *Acta Histochem.* 2012; Oct;114(6):589-93.
- [25] Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith–Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010; 154C, 343–354.
- [26] Christians JK, Gruslin A. Altered levels of insulin-like growth factor binding protein proteases in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenatal Diagnosis.* 2010; Vol 30, Issue 9, pp 815–820, Sept.
- [27] Daelemans C, Ritchie ME, Smits G, Abu-Amero S, Sudbery IM, Forrest MS, Campino S, Clark TG, Stanier P, Kwiatkowski D, *et al.* High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta. *BMC Genet.* 2010; Apr 19;11:25.
- [28] Das R, Lee YK, Strogantsev R, Jin S, Lim YC, Ng PY, Lin XM, Keefe Chng, Yeo GSH, Ferguson-Smith AC, Ding C. *DNMT1* and *AIM1* Imprinting in human placenta revealed through a genome-wide screen for allele-specific DNA methylation. *BMC Genomics.* 2013; 14:685.
- [29] Davies SM. Developmental regulation of genomic imprinting of the *IGF2* gene in human liver. *Cancer Res.* 1994; 54: 2560–2562.
- [30] Davies W, Isles AR, Wilkinson LS. Imprinted gene expression in the brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2005; Vol 29, Issue 3, May, pp 421–430.
- [31] DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell.* 1991; 64: 849–859.
- [32] Degner JF, Marioni JC, Pai AA, Pickrell JK, Nkadori E, Yoav Gilad Y, Pritchard JK. Effect of read-mapping biases on detecting allele-specific expression from RNA-sequencing data. *Bioinformatics.* Dec 15, 2009; 25(24): 3207–3212.
- [33] Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, Wetmur J, Chen J. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics.* 2009; 4:4, 235-240.
- [34] Donnelly L, Campling G. Functions of the placenta. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2014; Vol 15, Issue 3, pp 136–139.

- [35] Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic Imprinting: Implications for human disease. *Am J Pathol.* 1999; 154: 635-47.
- [36] Ferguson-Smith AC, Grealley JM. Epigenetics: Perceptive enzymes. *Nature.* 2007; 449: 148–149.
- [37] Frost JM, Moore GE. The importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet.* 2010; 6:e1001015.
- [38] Frost, JM; Monk, D; Stojilkovic-Mikic, T; Woodfine, K; Chitty, LS; Murrell, A; Stanier, P; Moore, GE. Evaluation of allelic expression of imprinted genes in adult human blood. *PLoS One.* 2010; 5 (10) , Article e13556.
- [39] Gao Y, Zhang HD, Lin JS, Zhang MP, Zhang RG. The imprinting status of genetic imprinted gene *PEG10* in human hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2010; Dec;18(12):894-9.
- [40] Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277 pp 1669–1672.
- [41] Gurgul A1, Semik E, Pawlina K, Szmatoła T, Jasielczuk I, Bugno-Poniewierska M. The application of genome-wide SNP genotyping methods in studies on livestock genomes. *J Appl Genet.* 2014 May;55(2):197-208
- [42] Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The Human Placenta Project: Placental structure, development, and function in real time. *Placenta.* 2014; Vol 35, Issue 5, pp 303–304.
- [43] Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. *Annu Rev Nutr.* 2010; Aug 21;30:237-55.
- [44] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
- [45] Hemberger M. Immune balance at the foeto-maternal interface as the fulcrum of reproductive success. *J Reprod Immunol.* 2013; Mar;97(1):36-42.
- [46] Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans. *Molecular Aspects of Medicine* 2013; 34, 826–840.

- [47] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003; 33(Suppl):245-54.
- [48] Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta - myth or reality? *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 176 pp 695–705.
- [49] Jansson T. Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatr Res.* 2001; Feb;49(2):141-7.
- [50] Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *JPathol.* 2007; 211:261-8.
- [51] Jones HN, Powell TL, Jansson T. Regulation of Placental Nutrient Transport. *Placenta* 28 pp 763-774 (2007).
- [52] Kaneko-Ishino T, Kuroiwa Y, Miyoshi N, Kohda T, Suzuki R, Yokoyama M, Viville S, Barton SC, Ishino F, Surani MA. Peg1/Mest imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nat Genet.* 1995 Sep; 11(1):52-9.
- [53] Kim J, Zhao K, Jlang P, Lu Z, Wang J, Murray JC, Xing Y. Transcriptome landscape of the human placenta. *BMC Genomics.* 2012; 13:115.
- [54] Klein CJ. *DNMT1-Related Dementia, Deafness, and Sensory Neuropathy.* GeneReviews® [Internet] (2012).
- [55] Koklanaris N, Nwachukwu JC, Huang SJ, Guller S, Karpisheva K, Garabedian M, *et al.* First- Trimester trophoblast cell model gene response to hypoxia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194:687-93.
- [56] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128: 693–705.
- [57] Kvaratskhelia E, Tkemaladze T, Abzianidze E. Expression pattern of DNA-methyltransferases and its health implication. *Georgian Med News.* 2014; Mar;(228):76-81.
- [58] Kärner J. "Sissejuhatus arengubioloogiasse", Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus (1997).
- [59] Lager S, Powell TL. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *Pregnancy.* 2012; 2012: 179827.
- [60] Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research.* 1991; 19: 5444.

- [61] Lambertini L, Diplas AI, Lee MJ, Sperling R, Chen J, Wetmur J. A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. *Epigenetics* 2008; 3:261-9.
- [62] Laursen LS, Overgaard MT, Weyer K, Boldt HB, Ebbesen P, Christiansen M, Sottrup-Jensen L, Giudice LC, Oxvig C. Cell Surface Targeting of Pregnancy-associated Plasma Protein A Proteolytic Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 277, No. 49, Issue of December 6, pp 47225–47234, 2002.
- [63] Lee MJ, Conner EL, Charafeddine L, Woods JR Jr, Priore GD. A critical birth weight and other determinants of survival for infants with severe intrauterine growth restriction. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 943:326-39.
- [64] Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*. 1992; 71:865–873.
- [65] Levi E, Klimstra DS, Adsay NV, Andea A, Basturk O. *MUC1* and *MUC2* in pancreatic neoplasia. *J Clin Pathol*. 2004; 57:456-462.
- [66] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993; Nov 25;366(6453):362-5.
- [67] Lui JC, Finkelstein GP, Barnes KM, Baron J. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; Jul;295(1):R189-96.
- [68] McMinn J, Wei M, Sadovsky Y, Thaker HM, Tycko B. Imprinting of *PEG1/MEST* isoform 2 in human placenta. *Placenta*. 2006; Feb-Mar;27(2-3):119-26.
- [69] Metsalu T, Viltrop T, Tiirats A, Rajashekar B, Reimann E, Kõks S, Rull K, Milani L, Acharya G, Basnet P, *et al*. RNA Sequencing Identifies Novel Imprinted Genes in the Human Placenta. *Submitted to Epigenetics May 2014*.
- [70] Mikheev AM, Nabekura T, Kaddoumi A, Bammler TK, Govindarajan R, Hebert MF, Unadkat JD. Profiling gene expression in human placentae of different gestational ages: an OPRU Network and UW SCOR Study. *Reprod Sci* 2008; 15(9):866-877.

- [71] Mohamed H, Siba I, Martina P, Volkhard H. Cellular Functions of Genetically Imprinted Genes in Human and Mouse as Annotated in the Gene Ontology. *PLoS ONE*. 2012; Vol. 7 Issue 11, Sec p1.
- [72] Monk D, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Kelsey G, Stanier P, *et al*. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103:6623-8.
- [73] Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KMK. Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG*. 2008; 115: 158–168.
- [74] Newell-Price J, Clark AJL, King P. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11: 142–148.
- [75] Nienstedt W, Arstila A, Björkqvist SE, Hänninen O. “Inimese füsioloogia ja anatoomia”, pp 469-471 (2005).
- [76] Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Ogonuki N, Miki H, *et al*. Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nature Genetics*. 2006; 38, 101 – 106.
- [77] Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS, Sottrup-Jensen L, Conover CA, Oxvig C. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (*PAPP-A2*), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem*. 2001; Jun 15;276(24):21849-53
- [78] Piedrahita JA. The Role of Imprinted Genes in Fetal Growth Abnormalities. *Birth Defects Research*. 2011; (Part A) 91:682_692.
- [79] Prickett AR, Oakey RJ. A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. *Mol Genet Genomics*. 2012; Aug;287(8):621-30.
- [80] Prokhortchouk E, Defossez PA. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783: 2167–2173.
- [81] Proudhon C, Bourc’his D. Identification and resolution of artifacts in the interpretation of imprinted gene expression. *Briefings in Functional Genomics*. 2010; Vol 9. No 5. 374^384.
- [82] Ramos S, Khademi F, Somesh BP, Rivero F. Genomic organization and expression profile of the small GTPases of the RhoBTB family in human and mouse. *Gene*. 2002; 298:

147-157.

[83] Regnault TRH, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental Development in Normal and Compromised Pregnancies. *Placenta*. 2002; 23, Suppl. A, Trophoblast Research, 16, S119–S129.

[84] Reik W, Constância M, Fowden A, Anderson N, Dean W, Ferguson-Smith A, Tycko B, Sibley C. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *Physiol*. 2003; 547.1, pp 35–44.

[85] Rossignol S, Steunou V, Chalas C, Kerjean A, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Jouannet P, Le BY, Gicquel C. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith–Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet*. 2006; 43, 902–907.

[86] Rozowsky J, Abyzov A, Wang J, Alves P, Raha D, Harmanci A, Leng J, Bjornson R, Kong Y, Kitabayashi N, Bhardwaj N, Rubin M, Snyder M, Gerstein M. AlleleSeq: analysis of allele-specific expression and binding in a network framework. *Mol Syst Biol*. 2011; 7:522.

[87] Sadler TW. ‘‘Langman’s medical embryology’’ 12th ed. (2012)

[88] Salas-Vidal E, Meijer AH, Cheng X, Spaink HP. Genomic annotation and expression analysis of the zebrafish Rho small GTPase family during development and bacterial infection. *Genomics*. 2005; Jul;86(1):25-37.

[89] Sitras V, Fenton C, Paulssen R, Vårtun Å, Acharya G. Differences in Gene Expression between First and Third Trimester Human Placenta: A Microarray Study. *PLoS ONE*. 2012; Vol 7, issue 3, p. e33294.

[90] Sitras V, Paulssen RH, Gronaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vartun A, Acharya G. Differential Placental Gene Expression in Severe Preeclampsia. *Placenta* 2009; 30(5):424-433.

[91] Smallwood A, Papageorghiou A, Nicolaidis K, Alley MK, Jim A, Nargund G, Ojha K, Campbell S, Banerjee S. Temporal regulation of the expression of syncytin (*HERV-W*), maternally imprinted *PEG10*, and *SGCE* in human placenta. *Biol Reprod*. 2003 Jul;69(1):286-93.

[92] Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human

placenta. *PNAS*. 2006; Vol 103 no. 14.

[93] Sun BW, Yang AC, Feng Y, Sun YJ, Zhu Yf, Zhang Y, Jiang H, Li CL, Gao FR, Zhang ZH, *et al*. Temporal and parental-specific expression of imprinted genes in a newly derived Chinese human embryonic stem cell line and embryoid bodies. *Hum Mol Genet*. 2006; Jan 1;15(1):65-75.

[94] Zhao Y, Hong N, Liu X, Wu B, Tang S, Yang J, Hu C, Jia W. A novel mutation in leptin gene is associated with severe obesity in chinese individuals. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:912052.

[95] Tehver J, Hussar P, Hussar Ü, Suuroja T. ‘‘Erihistoloogia’’, pp 224-229 (2007).

[96] Tornehave D, Chemnitz J, Teisner B, Folkersen J, Westergaard JG. Immunohistochemical demonstration of pregnancy-associated plasma protein A (*PAPP-A*) in the syncytiotrophoblast of the normal placenta at different gestational ages. *Placenta*. 1984 Sep-Oct;5(5):427-31.

[97] Uusküla L, Männik J, Rull K, Minajeva A, Kõks S, Vaas P, Teesalu P, Reimand J, Laan M. Mid- gestational gene expression profile in placenta and link to pregnancy complications. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49248.

[98] Wang J, Qiu Q, Haider M, Bell M, Gruslin A, Christians JK. Expression of pregnancy-associated plasma protein A2 during pregnancy in human and mouse. *J Endocrinol*. 2009 Sep;202(3):337-45.

[99] Wang Z, Mark Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009; 10, 57-63 Jan.

[100] Wang X, Clark AG. Using next-generation RNA sequencing to identify imprinted genes. *Heredity*. Mar 2014

[101] Wang X, Miller DC, Harman R, Antczak DF, Clark AG. Paternally expressed genes predominate in the placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; Jun 25;110(26):10705-10.

[102] Wang X, Sun Q, McGrath SD, Mardis ER, Soloway PD, Clark AG. Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain. *PLoS One*. 2008; 3(12):e3839.

- [103] Waterland RA. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *J Pediatr.* 2006; 149: S137–S142.
- [104] Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith–Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2005; 137C, 12–23.
- [105] Vermaak D, Ahmad K, Henikoff S. Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:266-74.
- [106] Yoon BJ, Herman H, Sikora A, Smith LT, Plass C, Soloway PD. Regulation of DNA methylation of Rasgrf1. *Nat Genet.* 2002; Jan;30(1):92-6.
- [107] Yuen RKC, Jiang R, Peñaherrera MS, McFadden DE, Robinson WP. Genome-wide mapping of imprinted differentially methylated regions by DNA methylation profiling of human placentas from triploidies. *Epigenetics & Chromatin* 2011; 4:10.

9 KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

- [1] University of Michigan Medical School - <http://www.med.umich.edu/lrc/coursepages/m1/embryology/embryo/06placenta.htm>
- [2] Associate Professor of Biology, Owensboro Community & Technical College - <http://legacy.owensboro.kctcs.edu/gcapan/anat2/notes/APIINotes2%20human%20development2.htm>
- [3] Celsius Healthcare - http://www.kliinik.ee/haiguste_abc/platsenta/id-1362
- [4] Imprinted Gene Database - <http://geneimprint.com/site/genes-by-species.Homo+sapiens.imprinted-All>
- [5] The NCBI database of genetic variation - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

10 LISAD

Lisa 1. Varasemalt esitatud imprinditud geenid inimese platsentas (Metsalu *et al.*, 2014).

No.	Geen	Asukoht	Ekspreseeritud alleel	Allikad
1.	<i>DIRAS3</i>	1p31	Isapoolne	[1]
2.	<i>EPS15</i>	1p32	Emapoolne	[2,3]
3.	<i>TP73</i>	1p36	Emapoolne	[2-4]
4.	<i>GPR1AS</i>	2q33.3	Isapoolne	[5]
5.	<i>MCCC1</i>	3q27	Isapoolne	[1]
6.	<i>SFRP2</i>	4q31.3	Emapoolne	[6]
7.	<i>RHOBTB3</i>	5q15	Isapoolne	[1]
8.	<i>APC</i>	5q22.2	Isapoolne	[6]
9.	<i>SNCB</i>	5q35	Isapoolne	[1]
10.	<i>FAM50B</i>	6p25.2	Isapoolne	[1,7]
11.	<i>LIN28B</i>	6q21	Isapoolne	[8]
12.	<i>AIM1</i>	6q21	Isapoolne	[9]
13.	<i>PLAGL1</i>	6q24	Isapoolne	[2-4,10]
14.	<i>PHACTR2</i>	6q24.2	Emapoolne	[11]
15.	<i>SLC22A2</i>	6q26	Emapoolne	[12]
16.	<i>SLC22A3</i>	6q26-q27	Emapoolne	[12]
17.	<i>MAGI2</i>	7q21	Isapoolne	[8]
18.	<i>PEG10</i>	7q21	Isapoolne	[3,4]
19.	<i>PPP1R9A</i>	7q21.3	Emapoolne	[13,14]
20.	<i>TFPI2</i>	7q21.3	Emapoolne	[14]
21.	<i>LEP</i>	7q31.3	Emapoolne	[1]
22.	<i>MEST1</i>	7q32	Isapoolne	[13]
23.	<i>MEST</i>	7q32.2	Isapoolne	[3,4,13,15,16]
24.	<i>ZFAT</i>	8q24.22	Isapoolne	[8]
25.	<i>ZFAT-AS1</i>	8q24.22	Isapoolne	[8]
26.	<i>GLIS3</i>	9p24	Isapoolne	[8]
27.	<i>ARMC3</i>	10p12.31	Isapoolne	[1]
28.	<i>AIFM2</i>	10q22.1	Isapoolne	[1]

29.	<i>CTNNA3</i>	10q22.2	Emapoolne	[17,18]
30.	<i>CD44</i>	11p13	Emapoolne	[2,3]
31.	<i>WT1</i>	11p13	Emapoolne	[19,20]
32.	<i>CDKN1C</i>	11p15.5	Emapoolne	[12]
33.	<i>H19</i>	11p15.5	Emapoolne	[3,4,21,22]
34.	<i>IGF2</i>	11p15.5	Isapoolne	[3,4,15,22]
35.	<i>KCNQ1OT1</i>	11p15.5	Isapoolne	[12,23]
36.	<i>PHLDA2</i>	11p15.5	Emapoolne	[2,3,12,15,24,25]
37.	<i>SLC22A18</i>	11p15.5	Emapoolne	[2,3,12]
38.	<i>ANO1</i>	11q13.3	Emapoolne	[26]
39.	<i>ZC3H12C</i>	11q22	Isapoolne	[8]
40.	<i>NTM</i>	11q25	Emapoolne	[8]
41.	<i>ST8SIA1</i>	12p12.1- p11.2	Isapoolne	[1]
42.	<i>WIF1</i>	12q14.3	Isapoolne	[6]
43.	<i>DLK1</i>	14q32	Isapoolne	[3,4]
44.	<i>MEG3</i>	14q32	Emapoolne	[2-4]
45.	<i>RTL1</i>	14q32.2	Isapoolne	[27]
46.	<i>SNRPN</i>	15q11.2	Isapoolne	[2,3]
47.	<i>ZNF597</i>	16p13	Emapoolne	[8]
48.	<i>DNMT1</i>	19p13.2 AS	Isapoolne	[1,9]
49.	<i>PEG3</i>	19q13.4	Isapoolne	[3,4]
50.	<i>MIR371A</i>	19q13.42	Isapoolne	[28]
51.	<i>NLRP2</i>	19q13.42	Emapoolne	[29]
52.	<i>ZNF331</i>	19q13.42	Emapoolne	[11]
53.	<i>GNAS</i>	20q13.3	Emapoolne	[1]
54.	<i>MOV10L1</i>	22q13.33	Emapoolne	[1]
55.	<i>ARHGAP4</i>	Xq28	Emapoolne	[1]

ALLIKAD

1. Yuen RK, Jiang R, Penaherrera MS, McFadden DE, Robinson WP (2011) Genome-wide mapping of imprinted differentially methylated regions by DNA methylation profiling of human placentas from triploidies. *Epigenetics Chromatin* 4: 10.

2. Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, et al. (2009) Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* 4: 235-240.
3. Pozharny Y, Lambertini L, Ma Y, Ferrara L, Litton CG, et al. (2010) Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 202: 391 e391-398.
4. Lambertini L, Diplas AI, Lee MJ, Sperling R, Chen J, et al. (2008) A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. *Epigenetics* 3: 261-269.
5. Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, et al. (2013) Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics* 8: 635-645.
6. Guilleret I, Osterheld MC, Braunschweig R, Gastineau V, Taillens S, et al. (2009) Imprinting of tumor-suppressor genes in human placenta. *Epigenetics* 4: 62-68.
7. Zhang A, Skaar DA, Li Y, Huang D, Price TM, et al. (2011) Novel retrotransposed imprinted locus identified at human 6p25. *Nucleic Acids Res* 39: 5388-5400.
8. Barbaux S, Gascoin-Lachambre G, Buffat C, Monnier P, Mondon F, et al. (2012) A genome-wide approach reveals novel imprinted genes expressed in the human placenta. *Epigenetics* 7: 1079-1090.
9. Das R, Lee YK, Strogantsev R, Jin S, Lim YC, et al. (2013) DNMT1 and AIM1 Imprinting in human placenta revealed through a genome-wide screen for allele-specific DNA methylation. *BMC Genomics* 14: 685.
10. Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, Kusakabe M, Muramatsu M, et al. (2000) The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 9: 453-460.
11. Daelemans C, Ritchie ME, Smits G, Abu-Amero S, Sudbery IM, et al. (2010) High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta. *BMC Genet* 11: 25.
12. Monk D, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Kelsey G, et al. (2006) Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6623-6628.
13. Nakabayashi K, Bentley L, Hitchins MP, Mitsuya K, Meguro M, et al. (2002) Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (MESTIT1) in the human MEST locus on chromosome 7q32. *Hum Mol Genet* 11: 1743-1756.
14. Monk D, Wagschal A, Arnaud P, Muller PS, Parker-Katirae L, et al. (2008) Comparative analysis of human chromosome 7q21 and mouse proximal chromosome 6 reveals a placental-specific imprinted gene, TFPI2/Tfpi2, which requires EHMT2 and EED for allelic-silencing. *Genome Res* 18: 1270-1281.
15. Apostolidou S, Abu-Amero S, O'Donoghue K, Frost J, Olafsdottir O, et al. (2007) Elevated placental expression of the imprinted PHLDA2 gene is associated with low birth weight. *J Mol Med (Berl)* 85: 379-387.

16. McMinn J, Wei M, Sadovsky Y, Thaker HM, Tycko B (2006) Imprinting of PEG1/MEST isoform 2 in human placenta. *Placenta* 27: 119-126.
17. Oudejans CB, Mulders J, Lachmeijer AM, van Dijk M, Konst AA, et al. (2004) The parent-of-origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down-regulated expression in androgenetic placentas. *Mol Hum Reprod* 10: 589-598.
18. van Dijk M, Mulders J, Konst A, Janssens B, van Roy F, et al. (2004) Differential downregulation of alphaT-catenin expression in placenta: trophoblast cell type-dependent imprinting of the CTNNA3 gene. *Gene Expr Patterns* 5: 61-65.
19. Jinno Y, Yun K, Nishiwaki K, Kubota T, Ogawa O, et al. (1994) Mosaic and polymorphic imprinting of the WT1 gene in humans. *Nat Genet* 6: 305-309.
20. Nishiwaki K, Niikawa N, Ishikawa M (1997) Polymorphic and tissue-specific imprinting of the human Wilms tumor gene, WT1. *Jpn J Hum Genet* 42: 205-211.
21. Yu L, Chen M, Zhao D, Yi P, Lu L, et al. (2009) The H19 gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 30: 443-447.
22. Buckberry S, Bianco-Miotto T, Hiendleder S, Roberts CT (2012) Quantitative allele-specific expression and DNA methylation analysis of H19, IGF2 and IGF2R in the human placenta across gestation reveals H19 imprinting plasticity. *PLoS One* 7: e51210.
23. Guo L, Choufani S, Ferreira J, Smith A, Chitayat D, et al. (2008) Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* 320: 79-91.
24. Qian N, Frank D, O'Keefe D, Dao D, Zhao L, et al. (1997) The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis. *Hum Mol Genet* 6: 2021-2029.
25. Lee MP, Feinberg AP (1998) Genomic imprinting of a human apoptosis gene homologue, TSSC3. *Cancer Res* 58: 1052-1056.
26. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, et al. (2012) Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. *Hum Mol Genet* 21: 548-558.
27. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, et al. (2012) Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics* 7: 1142-1150.
28. Noguier-Dance M, Abu-Amro S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, et al. (2010) The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19: 3566-3582.
29. Bjornsson HT, Albert TJ, Ladd-Acosta CM, Green RD, Rongione MA, et al. (2008) SNP-specific array-based allele-specific expression analysis. *Genome Res* 18: 771-779.

Lisa 2. Valideerimiseks kasutatud *PEG10*, *RHOBTB3* ning *PAPPA2* geenide informatiivsed SNP'id ning disainitud praimerid.

Geen	Chr	Algus ja lõpp	Informatiivsed SNP'd	Forward praimer	Reverse praimer	Produkti pikkus (bp)
<i>PEG10</i>	7	94296769 - 94296793	rs13073 rs13226637	TGCCTGACATGAAGAGGAGT	GAGCCTCTCATTACAGCAT	283
<i>RHOBTB3</i>	5	95131292 - 95131757	rs6815 rs7622 rs3184188	CATGAGCATATTCGCACCCC	GTTTAGCTGTCTTGGAAGTCA	763
<i>RHOBTB3</i>	5	95129056 - 95129251	rs6697 rs12351	TCTTCTGACCGAAACCAATGTG	CCAAATGGCCGGCAAATTC	413
<i>RHOBTB3</i>	5	95091194 - 95091201	rs34898 rs34899	GCTGAAGCGTCACATTATAACTC	ATGGCTAGCACCTGGAAATG	255
<i>PAPPA2</i>	1	176811754 - 176811918	rs12137448 rs1044299 rs12137517	GCAGTAAGAAAGAGAGGCCG	CAAGTTGGGTGGGACTGAGT	330
<i>PAPPA2</i>	1	176659790 - 176660247	rs4492574 rs12128112 rs726252	TGGTCATTTGTGTCGGAGAG	CAAACAAGCCCCAAAAC	726
<i>PAPPA2</i>	1	176659463 - 176659933	rs10913241	TGGGACATGTTCTGGGACTC	TCATTCTCCCATCAGCTCCC	322

Chr - kromosoom

Lisa 3. Uuritavate andmed.

Laps	Sünnitusviis	Gest. aeg	Sugu	Appar	Sünnikaal (g)	Pikkus (cm)	Pea (cm)	Rind (cm)	Ema vanus (a.)	Isa vanus (a.)
Normaalse sünnikaaluga vastsündinud										
P001	vaginaalne	39+0	poeg	9 - 10	3188	50	35	34	22	25
P002	plaaniline keisrilõige	39+3	tütar	8 - 9 - 10	3628	47	34	34	27	29
P005	erakorriline keisrilõige	40+4	poeg	8 - 9 - 9	3540	50	35	34,5	26	26
P007	vaginaalne	40+6	poeg	9 - 9	3836	50	35,5	35	24	31
P008	vaginaalne	40+5	tütar	9 - 10	3746	52	35	34	24	26
P009	vaginaalne	41+0	poeg	9 - 9	4150	53	34,5	35,5	41	46
P012	vaginaalne	42+0	tütar	9 - 9	3128	48	35,5	32,5	25	27
P013	vaginaalne	40+2	poeg	8 - 9	3394	50	35	34	23	33
P014	vaginaalne	41+1	tütar	8 - 8 - 9	3936	53	36	36	26	35
P018	vaginaalne	40+0	poeg	8 - 9	3310	50	35	34	25	22
P020	vaginaalne	38+0	tütar	ND	3074	48	34	33,5	30	30
P022	vaginaalne	39+0	poeg	8 - 10	3856	53	35	34	24	27
P026	vaginaalne	40+1	poeg	7 - 8 - 9	3260	50	34	35	36	44
P027	vaginaalne	40+2	poeg	9 - 9	3370	50	ND	ND	27	33
P028	vaginaalne	39+6	tütar	9 - 10	3884	51	34	35,5	35	36
P030	vaginaalne	40+5	tütar	9 - 9	3280	49	34	34	26	25
P032	vaginaalne	38+4	tütar	8 - 9	3192	52	33	32	27	31
P037	vaginaalne	40+1	tütar	9 - 10	4266	53	ND	ND	32	33
P039	vaakum	41+0	tütar	8 - 8 - 9	3650	53	35	34	21	22
P071	vaginaalne	40+5	tütar	9 - 10	4346	54	36	36	36	37
P073	vaginaalne	40+5	tütar	9 - 10	4276	52	37,5	36	41	48
P074	erakorriline keisrilõige	39+5	tütar	9 - 10	3024	47	34	33	34	45
Üsasisese kasvupeetusega vastsündinud										
P050	vaginaalne	40+4	tütar	9 - 9	2984	48	34	32	23	23
P097	vaginaalne	38+5	tütar	8 - 9	2024	45	33	28,5	26	ND
P099	erakorriline keisrilõige	35+6	poeg	9 - 9	1834	41	30,5	26	27	ND
P102	vaginaalne	37+3	poeg	9 - 9	2582	47	34	30	26	27
P109	vaginaalne	39+2	tütar	9 - 10	2622	47	33,5	31,5	26	34
P113	vaginaalne	40+2	tütar	8 - 9 - 9	2594	47	34,5	30,5	23	26
P131	erakorriline keisrilõige	40+2	tütar	9 - 9	2216	44,5	31,5	29	39	ND
P067	plaaniline keisrilõige	34+5	poeg	4 - 7 - 8	1586	41,5	29,5	24,5	32	32
P069	erakorriline keisrilõige	41+2	tütar	8 - 8 - 8	2540	48	34	29	30	ND
P070	plaaniline keisrilõige	37+2	poeg	8 - 9	2358	45	33,5	30	28	34
P078	vaginaalne	35+1	tütar	8 - 8 - 8	1714	42,5	29,5	27	19	26
P079	vaginaalne	39+5	tütar	9 - 9	2506	46	32,5	30	33	34
P132	vaginaalne	38+2	tütar	7 - 8 - 9	2336	47	33,5	30	21	26
P134	plaaniline keisrilõige	36+2	tütar	8 - 8	2250	46	32,5	28	31	30

ND - informatsioon puudub (*no data*)

Pea – peaümberrõõm (cm)

Rind – rinnaümberrõõm (cm)


Lisa 4. Genotüpeerimise tulemused.

Proov	PAPPA2					PEG10		RHOTB3						
	rs12137448	rs1044299	rs12137517	rs726252	rs10913241	rs13073	rs13226637	rs6815	rs7622	rs6697	rs62364385	rs12351	rs34898	rs34899
	C/G	C/T	A/G	A/G	C/T	C/T	T/C	C/T	A/G	C/T	A/T	G/T	C/T	A/G
P001 ema DNA	X	X	X	G/G	X	C/T	C/C	A/G	A/G	A/A	T/T	T/T	T/T	G/G
P001 isa DNA	X	X	X	A/G	X	C/C	C/C	G/G	A/A	A/A	T/T	G/T	C/T	A/G
P001 lapse DNA	X	X	X	G/G	X	C/T	C/C	A/G	A/A	A/A	T/T	T/T	C/T	A/G
P001 platsenta cDNA	X	X	X	G/G	X	C/C	C/C	G/G	A/A	A/A	T/T	T/T	C/C	A/A
P002 ema DNA	C/G	C/T	A/G	X	C/C	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P002 isa DNA	G/G	C/T	G/G	X	C/T	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P002 lapse DNA	C/G	C/T	A/G	X	C/T	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P002 platsenta cDNA	G/G	C/C	G/G	X	T/T	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P005 ema DNA	G/G	C/T	G/G	X	X	C/C	C/T	A/G	A/G	X	X	X	X	X
P005 isa DNA	C/G	T/T	A/G	X	X	C/C	C/C	G/G	A/G	X	X	X	X	X

P005 lapse DNA	C/G	T/T	A/G	A/G	X	C/C	C/C	A/G	A/A	X	X	X	X	X
P005 platsenta cDNA	C/G	T/T	A/G	A/G	X	C/C	C/C	G/G	A/A	X	X	X	X	X
P007 ema DNA	C/G	T/T	A/G	X	X	T/T	C/C	X	X	A/A	T/T	T/T	C/T	A/G
P007 isa DNA	G/G	C/T	G/G	X	X	C/C	C/C	X	X	A/A	T/T	T/T	T/T	G/G
P007 lapse DNA	G/G	T/T	G/G	A/A	X	T/C	C/C	X	X	A/A	T/T	T/T	T/T	G/G
P007 platsenta cDNA	G/G	T/T	G/G	A/A	X	C/C	C/C	X	X	A/A	T/T	T/T	T/T	G/G
P008 ema DNA	G/G	X	G/G	G/G	X	C/C	C/C	G/G	G/G	X	X	X	X	X
P008 isa DNA	C/G	X	A/G	A/G	X	C/C	C/C	G/G	A/A	X	X	X	X	X
P008 lapse DNA	C/G	T/T	A/G	A/G	X	C/C	C/C	G/G	A/G	X	X	X	X	X
P008 platsenta cDNA	G/G	T/T	G/G	G/G	X	C/C	C/C	G/G	A/A	X	X	X	X	X
P009 ema DNA	X	X	X	X	X	C/T	C/T	G/G	G/G	G/G	T/T	T/T	C/C	A/A
P009 isa DNA	X	X	X	X	X	C/C	C/T	A/G	A/G	A/A	T/T	G/T	C/T	G/A

P009 lapse DNA	G/G	T/T	G/G	A/G	X	C/T	C/C	A/G	A/G	A/G	T/T	G/T	C/C	A/A
P009 platsenta cDNA	G/G	T/T	G/G	A/G	X	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	G/G	C/C	A/A
P012 ema DNA	X	X	X	X	X	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	G/G	C/T	G/A
P012 isa DNA	X	X	X	X	X	C/T	C/C	A/G	A/G	A/A	T/T	G/T	T/T	G/G
P012 lapse DNA	C/G	T/T	A/G	A/A	X	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	G/G	C/T	G/A
P012 platsenta cDNA	C/G	T/T	A/G	A/A	X	C/C	C/C	A/A	A/A	A/A	T/T	G/G	T/T	G/G
P014 ema DNA	X	X	X	X	X	C/C	C/C	G/G	A/G	A/A	T/T	T/T	C/T	A/G
P014 isa DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	A/G	T/T	T/T	X	X
P014 lapse DNA	X	X	X	X	X	C/C	C/T	G/G	G/G	A/A	T/T	T/T	C/T	A/G
P014 platsenta cDNA	X	X	X	X	X	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T	T/T	T/T	G/G

X – sekveneerimist ei teostatud

 - informatiivsed genotüübid

Lisa 5. Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Julia Koskar (sünnikuupäev: 2. märts 1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Imprintingu kandidaatgeenide *RHOBTB3* ja *PAPPA2* ekspressioon platsentas“, mille juhendaja on Andres Salumets.

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05.2014