

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ja

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
IMMUNOLOOGIA UURIMISGRUPP

**MiR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p ekspressioon gestatsioonidiabeediga  
patsientide vereplasmas raseduse teisel trimestril**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Evelin Kumpel

Juhendaja PhD Aili Tagoma

Kaasjuhendaja PhD Viljar Jaks

TARTU 2019

## **INFOLEHT**

### **MiR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p ekspressioon gestatsioonidiabeediga patsientide vereplasmas raseduse teisel trimestril**

MikroRNA-d on üheaahelised mittekodeerivad lühikesed RNA-molekulid, mis reguleerivad geenide ekspressiooni post-transkriptsioonilisel tasemel. Gestatsioonidiabeet on raseduse ajal tekkiv süsivesikute metabolismi häire. On täheldatud, et mikroRNA-de ekspressioonitasemete muutused võivad olla seotud gestatsioonidiabeedi kujunemisega. Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oligi määrata miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p ekspressioonitasemete muutusi gestatsioonidiabeediga patsientide vereplasmast.

**Märksõnad:** mikroRNA, miR-30d-5p, miR-92-5p, miR-195-5p, gestatsioonidiabeet

**CERCS:** B500 immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

### **MiR-30d-5p, miR-92-5p and miR-195-5p expression in gestational diabetes mellitus patients blood plasma during second pregnancy trimester**

MicroRNAs are single-stranded non-coding short RNA molecules, which regulate gene expression at post-transcriptional level. Gestational diabetes mellitus is a carbohydrate metabolism disorder, which occurs only during pregnancy. Changes in the microRNAs expression levels might be linked with the formation of gestational diabetes mellitus. This bachelor's thesis goal is to determine the changes of miR-30d-5p, miR-92-5p and miR-195-5p expression levels, taken from the patients of gestational diabetes mellitus blood plasma during second pregnancy trimester.

**Keywords:** microRNA, miR-30d-5p, miR-92-5p, miR-195-5p, gestational diabetes mellitus

**CERCS:** B500 immunology, serology, transplantation

# SISUKORD

<b>INFOLEHT</b> .....	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>6</b>
<b>1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>7</b>
1.1 Mis on mikroRNA-d? .....	7
1.1.1 MikroRNA biogenees.....	7
1.1.2 Ekstratsellulaarne transport .....	8
1.2 MikroRNA-de funktsioon.....	9
1.2.1 Immuunsüsteemi mõjutavad mikroRNA-d .....	9
1.2.2 Pankrease-spetsiifilised mikroRNA-d .....	10
1.3 MikroRNA-de määramine .....	13
1.3.1 Kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (qRT-PCR).....	14
1.3.2 Mikrokiibid.....	15
1.3.3 Sekvenerimine .....	15
1.4 MikroRNA-d kui haiguste biomarkerid.....	18
1.5 Diabeet.....	18
1.5.1 Esimest tüüpi diabeet.....	18
1.5.2 Teist tüüpi diabeet .....	18
1.5.3 Gestatsioonidiabeet.....	18
<b>2 EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>21</b>
2.1 Uurimistöö eesmärgid.....	21
2.2 Materjal ja meetodika .....	21
2.2.1 Valimi kirjeldus ja uuringumaterjal.....	21
2.2.2 RNA eraldamine ja kontsentratsiooni mõõtmine .....	21
2.2.3 MikroRNA spetsiifilise cDNA süntees .....	22
2.2.4 Reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (RT-PCR).....	22
2.2.5 Andmete analüüs .....	23
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Uuritavate kirjeldus .....	24
2.3.2 MikroRNA-de ekspressioon.....	25
2.3.3 Arutelu.....	25
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>27</b>
<b>TÄNUSÕNAD</b> .....	<b>29</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>30</b>
Artiklid.....	30

Käsiraamatud .....	37
Kasutatud veebiaadressid.....	38
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>39</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

**Ago** – Argonaut valk (*Argonaut protein*)

**cDNA** – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

**Cel** – nematood, *Caenorhabditis elegans*

**Ct** – lävitsükkel (*threshold cycle*)

**DGCR8** – DiGeorge sündroomi kriitilise regiooni valk 8 (*DiGeorge syndrome chromosomal region protein 8*)

**GDM** – gestatsioonidiabeet (*gestational diabetes mellitus*)

**GTT** – glükoositolerantsuse test (*glucose tolerance test*)

**hsa** – inimene, *Homo sapiens*

**INSR** – insuliini retseptor (*insulin receptor*)

**miR, miRNA** – küps mikroRNA (*mature microRNA*)

**NPM1** – nukleofosfiin I (*nucleophosmin*)

**pre-miRNA, mir** – prekursor mikroRNA (*precursor microRNA*)

**pri-miRNA** – primaarne mikroRNA (*primary microRNA*)

**qRT-PCR** – kvantitatiivne reaalaja-polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative real-time PCR*)

**RISC** – RNA-indutseeritud vaigistav kompleks (*RNA-induced silencing complex*)

**snoRNA** – väike tuumakese-RNA (*small nucleolar RNA*)

**snRNA** – väike tuuma-RNA (*small nuclear RNA*)

**T1D** – esimest tüüpi diabeet (*type 1 diabetes*)

**T2D** – teist tüüpi diabeet (*type 2 diabetes*)

**TCR** – T-raku retseptor (*T-cell receptor*)

**UTR** – mittetransleeritav regioon (*untranslated region*)

## SISSEJUHATUS

Gestatsioonidiabeet on raseduse ajal tekkiv süsivesikute ainevahetuse häire, mis taandub peale rasedust. Lisaks on see seotud raseduskomplatsioonidega, mis ohustab nii ema kui ka last (Kirss *et al.*, 2015). MikroRNA-d on keskmiselt 22 nukleotiidi pikkused mittekodeerivad RNA-molekulid, mis reguleerivad geenide ekspressiooni. On täheldatud mikroRNA-de ekspressioonitasemete muutusi haiguste eri staadiumites ning arvatakse, et neil võib-olla seos teatud haiguste kujunemisel (Xu *et al.*, 2013).

Antud bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates on kirjeldatud mikroRNA-de sünteesi, ekstratsellulaarset transporti ja immuunsüsteemi mõjutavaid kui ka pankrease-spetsiifilisi mikroRNA-sid ning mikroRNA-de mõju insuliini tootvatele beeta-rakkudele. Lisaks on antud ülevaade erinevatest mikroRNA-de määramise meetoditest. Samuti on kirjeldatud gestatsioonidiabeeti, kui ka lühidalt nii esimest kui ka teist tüüpi diabeeti.

Antud töö eesmärgiks on võrdlevalt määrata kolme spetsiifilise mikroRNA (miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p) ekspressioonitasemete muutusi gestatsioonidiabeediga patsientide hulgas.

Bakalaureusetöö eksperimentaalne osa on tehtud Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonnas.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Mis on mikroRNA-d?

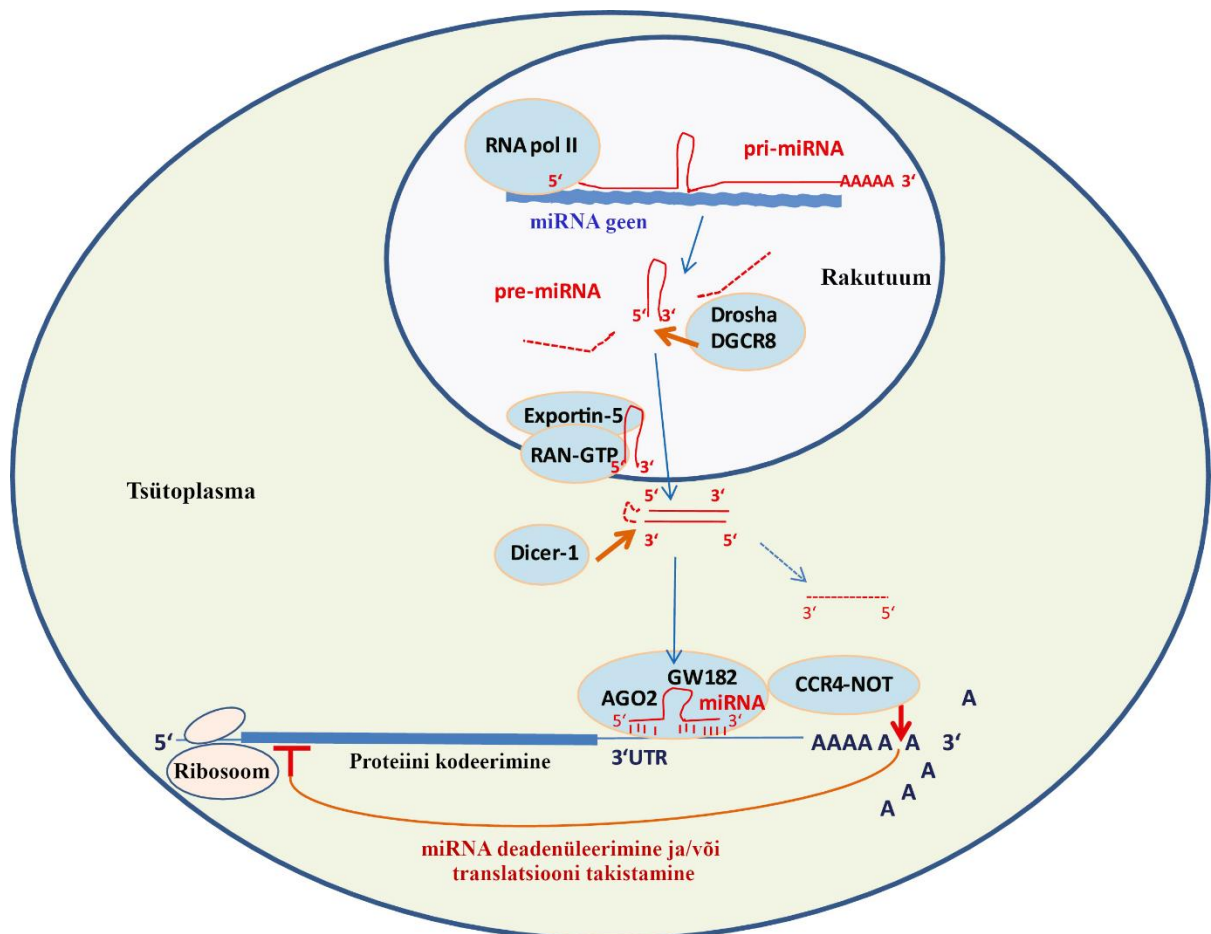
MikroRNA-d (miRNA) on 19-24 nukleotiidi pikkused mittekodeerivad üheaahelised RNA-molekulid, mis kuuluvad post-transkriptsioonilise geeniekspressiooni regulaatorite klassi ning takistavad mRNA translatsiooni või põhjustavad mRNA lagundamist (Calderari *et al.*, 2017; Hashimoto & Tanaka, 2017; Turchinovich *et al.*, 2011). Inimesel on 30% miRNA-dest intergeensetel regioonidel ning üle poolte miRNA-dest transkribeeritakse intronitel ja eksonitel (Liu *et al.*, 2008). MikroRNA-sid on leitud nii rakkude seest ja kudetest kui ka erinevatest kehavedelikest: vereplasmast, uriinist, süljest ja rinnapiimast (Weber *et al.*, 2010). Üks miRNA võib mõjutada mitmeid mRNA-sid ja mitu miRNA-d võivad mõjutada ühte mRNA-d (Calderari *et al.*, 2017). Inimesel on seni leitud 2693 küpset miRNA-t (miRBase andmebaas ([mirbase.org](http://mirbase.org)), külastatud 23.05.2019).

### 1.1.1 MikroRNA biogenees

MikroRNA biogenees saab alguse rakutuumas, kui ensüüm RNA polümeraas II transkribeerib miRNA geenilt primaarse miRNA (pri-miRNA) (Joonis 1). Seejärel toimub pri-miRNA lõikamine ribonukleaasi Drosha ja RNA-ga seonduva valgu, DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region*), kompleksi poolt juuksenõela-kujulise struktuuri sisaldavaks prekursor pre-miRNAks (Rebane & Akdis, 2013; Xu *et al.*, 2013).

Pre-miRNA transporditakse tsütoplasmasse Exportin-5-Ran-GTP kompleksi poolt, kus jätkub lõikamine, mida viib läbi endoribonukleas Dicer. Selle protsessi tulemusena moodustuvad 22-nukleotiidilised RNA-dupleksid – juhtiva ahelaga ja mahajääva ahelaga miRNA-d. Juhtiv ahel ühendatakse RNA-indutseeritud vaigistava kompleksiga RISC (*RNA-induced silencing complex*), mis sisaldab endas ka ühte neljast Argonaut (Ago) valgust (peamiselt Ago2) ning GW182 (*glycine-tryptophan 182 kDa protein*) (Guay & Regazzi, 2013; Rebane & Akdis, 2013). RISC-kompleks valib välja ahela, millel on kõige väiksem termodünaamiline stabiilsus 5'-otsas (Tétreault & De Guire, 2013). Mahajääv ahel tavaliselt lagundatakse, kuid mõnikord liidetakse teise RISC-kompleksi (Guay & Regazzi, 2013; Rebane & Akdis, 2013).

Ahel, mis on seondunud RISC-kompleksiga, seondub mRNA 3' mittetransleeritava regiooniga (UTR – *untranslated region*). MiRNA ja mRNA vaheline interaktsioon viib transkripti lagundamiseni või translatsiooni aeglustumiseni (Joonis 1) (Guay & Regazzi, 2013; Ghai & Wang, 2016).



**Joonis 1. miRNA biogenees.** MiRNA sünteesitakse rakutuumas RNA polümeraas II poolt. Pikad pri-miRNA-d lõigustatakse Drosha-DGCR8 poolt juuksenõela-kujulise struktuuriga pre-miRNA-ks. Exportin-5-RAN-GTP kompleks viib pre-miRNA-d tsütoplasmasse. Ensüüm Diceri abil tehakse pre-miRNA-dest lühikesed RNA-dupleksid. Üks dupleksi ahelatest viiakse RISC-kompleksi, kus on lisaks ka AGO2 ja GW182 valgud. Teine dupleksi ahelast viiakse kas teise RISC-kompleksi või lagundatakse. GW182 valg vajab CCR4-NOT nukleaasi kompleksi, mis viib translatsiooni aeglustumiseni, deadenüleerimiseni või mRNA lagundamiseni (modifitseeritud ja tõlgitud Rebane & Akdis, 2013 järgi).

### 1.1.2 Ekstratsellulaarne transport

Ekstratsellulaarse miRNA transpordil osalevad ekstratsellulaarsed vesiikulid (eksosoomid, mikrovesiikulid), kõrge-ja madala tihedusega lipoproteiinid, vastavalt HDL (*high density lipoproteins*) ja LDL (*low density lipoproteins*) ning ribonukleoproteiini kompleksid, näiteks valgud nukleofosmiin I (NPMI – *nucleophosmin I*) ja Ago2 (Boon & Vickers, 2013; Xu *et al.*, 2013). Eksosoomid ja mikrovesiikulid suudavad kanda erinevaid valke ja nukleiinhappeid, ning transportida neid retsipient rakkudesse (Guay & Regazzi, 2013). NPMI ekspordib RNA-d ja ribosomaalseid valke tsütoplasmasse (Xu *et al.*, 2013). Ago2 võib miRNA-d transportida nii ekstratsellulaarse vesiikuli sees kui ka sellest väljas (Boon & Vickers, 2013).

## 1.2 MikroRNA-de funktsioon

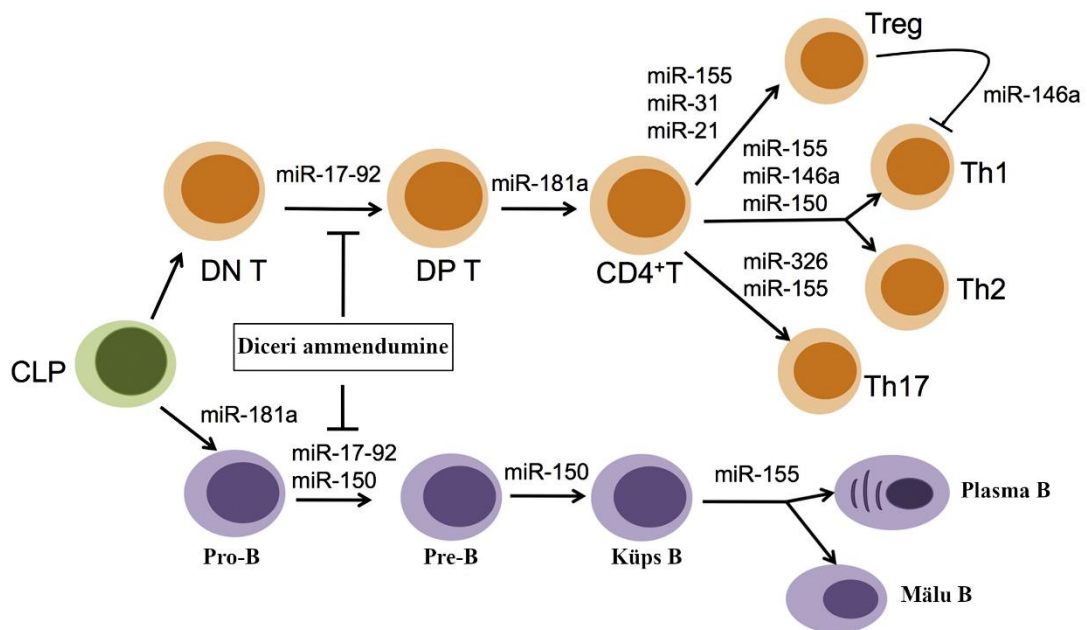
MikroRNA-d on geenide ekspressiooni regulaatorid. Nad omavad olulist rolli rakkude jagunemisel, diferentseerumisel ja ellujäämisel, mistõttu mõjutavad nad organismi normaalsel arengul aga ka haiguste kujunemist. MiRNA-de seondumine sihtmärgiga toimub enamasti konserveerunud järjestuste järgi, mis on miRNA 5'-otsa lõpus olevad nukleotiidid positsioonidel 2-7 (Vidigal & Ventura, 2015).

### 1.2.1 Immuunsüsteemi mõjutavad mikroRNA-d

MikroRNA-d reguleerivad immuunsüsteemi (Joonis 2). On leitud, et miRNA biogeneesis osalevate ensüümide, näiteks Dicer eemaldamine mõjutab immuunrakkude ellujäämist ja proliferatsiooni. Sarnased muutused tekkisid ka ensüümi Drosha ja Argonaut valguga (Ventriglia *et al.*, 2015). Muutused miRNA-de ekspressioonitasemetes võivad viia erinevate autoimmuunhaiguste, allergiliste reaktsioonide ja immuunpuudulikkuse tekkeni (Monticelli, 2013; Rebane & Akdis, 2013; Ventriglia *et al.*, 2015). MiRNA-de üle-ja alaekspressioon mõjutab nende seondumist sihtmärkgeenidele (Sonkoly *et al.*, 2008).

MiR-155 ja miR-146a on tähtsad immuunsüsteemi T-regulatoorsete ( $T_{reg}$ )-rakkude funktsioneerimises. MiR-155 on vajalik adaptiivsete immuunrakkude arenguks ja nende aktiveerimiseks. Lisaks osaleb ta T-rakkude polarisatsioonil, aidates kaasa ka immuunsüsteemi töötamisele esmase ja teisese immuunvastuse korral erinevate viiruseliste ja bakteriaalsete patogeenide vastu (Monticelli, 2013; Rebane & Akdis, 2013; Ventriglia *et al.*, 2015). MiR-146a surub maha NF- $\kappa$ B signaaliraja aktivatsiooni (Rebane & Akdis, 2013).

MiR-125b leidub  $CD4^+$  T-rakkudes, kus ta reguleerib lümfotsüütide diferentseerumisega seotud geenide ekspressiooni (Monticelli, 2013). Seda spetsiifilist miRNA-d on seostatud insuliiniresistentsusega (Guay *et al.*, 2011). MiR-326 reguleerib tüüp 17 T-abistaja rakkude (Th17 – *T-helper 17*) diferentseerumist nii *in vitro* kui ka *in vivo*. MiR-150 ekspressioon mõjutab Pro-B-rakkude arengut Pre-B-rakkudeks. Häired miR-150 ekspressioonis võivad seetõttu põhjustada vigu B-rakkude küpsemises (Raisch *et al.*, 2013).



**Joonis 2.** MikroRNA-d, mis on seotud omandatud immuunsuse regulatsiooniga. Joonisel on välja toodud erinevad miRNA-d, mis on olulised T-rakkude (ülemine rida) ja B-rakkude (alumine rida) arengul ning diferentseerumisel. Th – T-helper (T-abistaja), T<sub>reg</sub> – reguleeriv T-rakk, CLP – lümfotsüütide eellasrakk, DN T – topelt negatiivne T-rakk, DP T – topelt positiivne T-rakk (modifitseeritud ja tõlgitud Dai & Ahmed, 2011 järgi).

MiR-181a on oluline B- ja T-lümfotsüütide arengus. See spetsiifiline miRNA reguleerib T-raku retseptori (TCR – *T-cell receptor*) signaliseerimise toimimiseks vajalikke fosfataase (Sonkoly *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Pankrease-spetsiifilised mikroRNA-d

Pankreas on näär, mis osaleb organismi ainevahetuses ja millel on kaks erinevat komponenti: eksokriinne ja endokriinne osa. Eksokriinne osa toodab süsivesikute, rasvade ja valkude lagundamiseks vajalikke seedeensüüme. Endokriinne osa koosneb Langerhansi saarekestest, mis jaotatakse viieks erinevaks rakutüübiks: alfa-, beeta-, delta-, epsilon- ja gamma-rakkudeks. Alfa-rakud eritavad glükagooni, beeta-rakud insuliini, delta-rakud somatostatiini, epsilon-rakud greliini ja gamma-rakud pankreatilist polüpeptiidi (Röder *et al.*, 2016; Zhou & Melton, 2018). Igal erineval hormoonil on oma kindel funktsioon. Veresuhkru taset mõjutavad kaks hormooni: insuliin ja glükagoon. Insuliini toimet veresuhkru tase langeb, kuid glükagooni abil veresuhkru tase tõuseb. Somatostatiin mõjutab omakorda insuliini ja glükagooni vabastamist ning pankreatilist polüpeptiidi reguleerib pankrease eksokriinse ja endokriinse sekretsiooni aktiivsust (Röder *et al.*, 2016).

Pankrease beeta-rakud reguleerivad insuliini sekretsiooni ja selle sünteesimist. On leitud mitmeid miRNA-sid, mis mõjutavad beeta-rakkude apoptoosi, proliferatsiooni ja

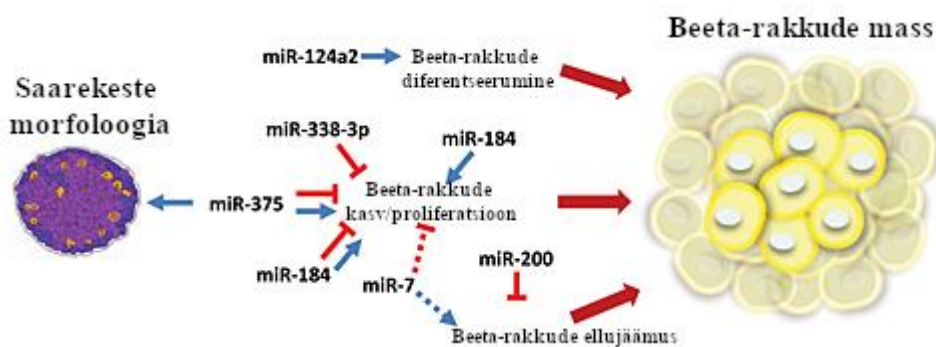
diferentseerumist (Tabel 1) (Feng *et al.*, 2016; Hashimoto & Tanaka, 2017). Samuti on miRNA-d seotud insuliini vabastamise ja sekretsiooniga, insuliini graanuli eksotsütoosiga ning insuliiniresistentsuse tekkega erinevates kudedes. Nende sihtmärkideks on vastav ensüüm või transkriptsioonifaktor (Chen *et al.*, 2014).

**Tabel 1.** Pankrease  $\beta$ -raku funktsioneerimisega seotud miRNAd (Feng *et al.*, 2016)

<b>Raku protsess</b>	<b>miRNA</b>
$\beta$ -raku ellujäämine/apoptoos	miR-577
	miR-200a/b/c
	miR-34a
$\beta$ -raku proliferatsioon	miR-375
	miR-181a
	miR-17
	miR-24
	miR-29a
$\beta$ -raku diferentseerumine	miR-375
	miR-7
	miR-34a
	miR-146a
	miR-30d
	let-7e
	miR-21
	miR-9
	miR-376
Insuliini sekretsioon	miR-375
	miR-184
	miR-7a
	miR-29a
	miR-187
	miR-30a
	miR-124
	miR-33

Pankrease-spetsiifilisteks miRNA-deks on näiteks miR-375 ja miR-7. miR-7 seondub pankreases ekspresseeritava transkriptsioonifaktoriga Pax6 (*paired box gene 6*) (Kaviani *et al.*, 2016), mis on vajalik pankrease arengul (Mao *et al.*, 2013).

MiR-375 oli aga esimesi miRNA-sid, mida seostati pankrease beeta-rakkudes toimuva insuliini sekretsiooniga. Peale selle osaleb miR-375 beeta-rakkude proliferatsioonil, arengus ja nende ellujäämisel (Joonis 3). Samuti ekspresseeritakse miR-375 pankrease alfa-rakkudes, mis on väga oluline pankrease organogeneesil (Calderari *et al.*, 2017; Hashimoto & Tanaka, 2017), kuna ta reguleerib pankrease arengu, raku kasvu ja proliferatsiooniga seotud geene (X. Li, 2014). MiR-375 ekspresseeritakse pankrease Langerhansi saarekestes ning ta on vajalik ka beeta-rakkude massi säilitamisel (Hashimoto & Tanaka, 2017; X. Li, 2014). Katsed hiirtega on näidanud, et selle miRNA puudumisel vähenes beeta-rakkude mass, kuid suurenes nii alfa-rakkude mass kui ka glükagooni tase vereplasmas (Mao *et al.*, 2013).



**Joonis 3.** Olulised miRNA-d, mis mõjutavad beeta-rakkude massi ja saarekete morfoloogiat. MikroRNA-d mõjutavad beeta-rakkude massi, reguleerides mRNA-dega seotud rakulisi protsesse: diferentseerumist, kasvu/proliferatsiooni ja ellujäämist. MiR-375 on tähtis saarekete morfoloogia määramises. Punane tõmbi otsaga joon tähistab negatiivset mõju, sinine nool aga positiivset mõju (modifitseeritud ja tõlgitud Osmi *et al.*, 2016 järgi).

### MiR-17-92 klaster

MiR-17-92 klastrisse kuuluvad miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ja miR-92a. Sii klasterisse kuuluvate miRNA-de ekspressioonitasemete muutusi on seostatud MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) insuliini, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) ja mTor signaalirajaga ning ka teist tüüpi diabeediga (T2D) (Zhu *et al.*, 2015). Lisaks on leitud seoseid raseduse komplikatsioonidega (sealhulgas raseduse kaotus, makrosoomia) (Jing Li *et al.*, 2015). Näiteks miR-92a on seostatud metaboolse sündroomiga (Karolina *et al.*, 2012) ja PI3K/Akt (*phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*) signaalirajaga, mis on seotud loote arenguga (Jiandong Li *et al.*, 2015). Zhu *et al.* (2015) näitasid aga, et miR-20a ja miR-17 olid

preeklampsia korral kõrgema ekspressiooniga ja samas täheldati ka insuliiniresistentsuse tekke suurenemist võrreldes tervete rasedatega.

### **Let-7 perekond**

Let-7 tüüpi miRNA-de perekonna moodustavad üheksa erinevat miRNA-t (let-7a, let-c, let-7f, let-7b, let-7d, let-7e, let-7g, let-7i ja miR-98), mida hiires kodeeritakse 12 erineva geeni poolt. Arvatakse, et let-7 perekonda kuuluvad miRNA-d täidavad ühise konserveerunud järjestuste (nukleotiidid kohtadel 2-8) tõttu sarnast funktsiooni. Kõik eelpool nimetatud Let-7 perekonda kuuluvad miRNA-d osalevad glükoosi metabolismis (Frost & Olson, 2011).

### **MiR-29 perekond**

MiR-29a, -b ja -c võivad olla olulised tegurid insuliiniresistentsuse ja T2D tekkes (Zhao *et al.*, 2012). MiR-29a ja miR-29b sihtmärgiks on MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*), mis on mitokondriaalse oksüdeerimise substraat, mõjutades insuliini vabastamist beeta-rakkudest (Pullen *et al.*, 2011). Veelgi enam, esimest tüüpi diabeedi (T1D) üheks tekkepõhjuseks võivad olla enteroviirused ning näiteks miR-29a puhul on täheldatud kõrgeenenud ekspressiooni pankrease saarekestes peale kokkupuudet Cocksackie B-viirusega (Dotta *et al.*, 2018).

### **MiR-30 perekond**

MiR-30d on seostatud nii T2D kui ka insuliiniresistentsusega (Nunez Lopez, *et al.*, 2018). MiR-30d kõrgem ekspressioon võib põhjustada häireid insuliini geeni ekspressioonis, mistõttu võib esineda vigu insuliini biosünteesis (Guay *et al.*, 2011). Selle miRNA kõrgemat ekspressiooni on seostatud ka beeta-rakkudes ekspresseeritava spetsiifilise transkriptsioonifaktori MafA kõrgema ekspressiooniga. MAP4K4 (*mitogen-activated protein 4 kinase*) on miR-30d otsene sihtmärk. Nii MafA kui MAP4K4 on transkriptsioonifaktorid, mis osalevad insuliini sünteesis. MiR-30d roll on oluline nii insuliini tootmises kui ka beeta-rakkude kaitsmises põletikuliste tsütokiinide eest (Zhao *et al.*, 2012).

## **1.3 MikroRNA-de määramine**

MikroRNA-sid saab määrata rakkudest ja kudetest, kuid peamiselt määratakse neid vereplasmast või -seerumist (Shaffer *et al.*, s.a.). MiRNAde määramiseks saab kasutada reaalaaja PCR-i (RT-PCR), mikrokiipe ja sekveneerimist (Marabita *et al.*, 2016). Ekspressioonitasemete määramiseks kasutatakse nii endogeenseid kui ka eksogeenseid referents-RNA-sid, mida kasutatakse ka miRNA ekspressiooni andmete normaliseerimisel (Schwarzenbach *et al.*, 2015). Referents-RNA-de valik sõltub peamiselt sellest, kust miRNA-sid määratakse. Rakkudes kasutatakse referents-RNA-dena snRNA-dest SNORD44 (RNU44),

SNORD48 (RNU48) ja RNU6-1 (Mamm U6) (Marabita *et al.*, 2016). Eksogeensetest referentsidest kasutatakse enim vereplasmast ja -seerumist võetud proovide normaliseerimiseks sünteetilisi normaliseerijaid, näiteks *spike-in Caenorhabditis elegans*'i miRNA-d *cel-miR-39* ja *cel-miR-54* (Schwarzenbach *et al.*, 2015; Shaffer *et al.*, s.a.).

### 1.3.1 Kvantitatiivne reaal-aja polümeraasi ahelreaktsioon (qRT-PCR)

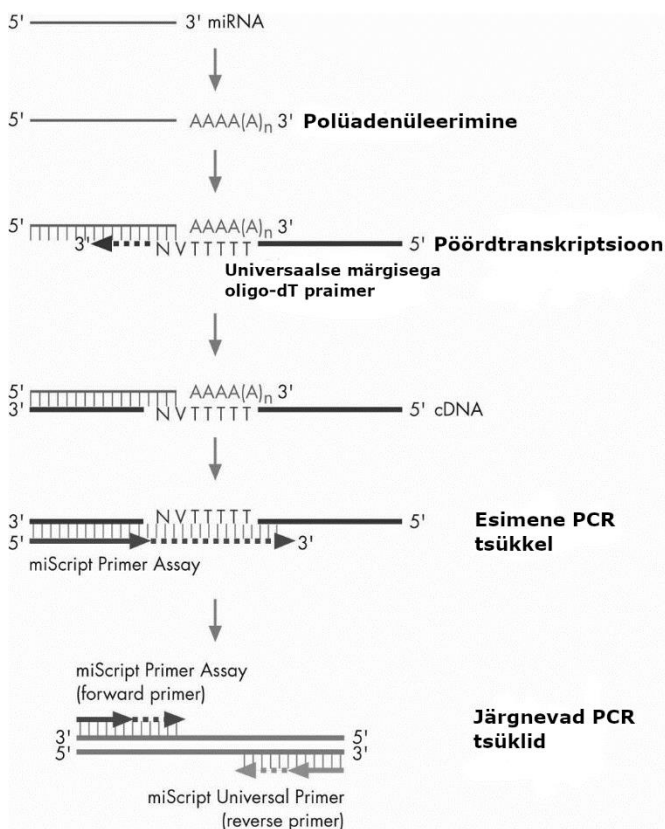
Kvantitatiivne reaal-aja polümeraasi ahelreaktsioon (qRT-PCR) on meetod, millega saab DNA paljundamist jälgida iga tsükli järel reaal-ajas. qRT-PCR-i puhul kasutatakse kolme erinevat praimerite süsteemi: juuksenõela kujuga pöördtranskriptsiooni (RT – *reverse transcription*) TaqMan'i (näiteks Applied Biosystems), lukustatud nukleiinhappe praimer (näiteks Exiqon) ja polü-A sabaga praimerite süsteemi (näiteks QIAGEN, Stratagene) (Schwarzenbach *et al.*, 2015). Vastava produkti kvantiseerimine põhineb fluorestsentsil, mille korral kasutatakse erinevaid reportervärve, näiteks SYBR Green'i. Selleks, et mõõta miRNA-de ekspressiooni RT-PCR-iga, viiakse esmalt läbi pöördtranskriptsioon (Joonis 4). Selle protsessi käigus transkribeeritakse RNA ning saadakse komplementaarne DNA ehk cDNA (Pabinger *et al.*, 2014).

qRT-PCR-i puhul kasutatakse kahte meetodit: absoluutset ja relatiivset kvantiseerimist. Absoluutne kvantiseerimine tähendab seda, et PCR signaal seotakse kalibreerimiskõveraga, mille abil on võimalik detekteerida uuritava miRNA koguhulka. Relatiivse kvantiseerimise korral võrreldakse PCR-tsükli läviväärtust endogeense miRNA-ga (Schwarzenbach *et al.*, 2015).

RT-PCR-i abil saadud andmete analüüsimiseks, näiteks miRNA-de ekspressioonimuutuste hindamiseks, kasutatakse võrdlevat lävitsükli meetodit  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Esmalt saadakse RT-PCR-i analüüsil andmed uuritavate miRNA-de ja referentsi (näiteks antud töös kasutatud *cel-miR-39*) lävitsükli ( $C_T$  – *threshold cycle*) kesk-ja standardhälbe väärtused. Seejärel tuleb leida  $\Delta C_T$  väärtused iga uuritava miRNA kohta, mis tähendab muutust võrreldes referentsiga ehk antud töös normaliseerimist *cel-miR-39* suhtes. Kolmandaks tuleb leida  $\Delta C_T$  väärtuste keskmine uuritavate grupis (antud töös GDM-patsiendid ja terved rasedad) iga miRNA kohta. Järgmisena tuleb leida uuritava miRNA  $\Delta\Delta C_T$  väärtus ehk uuritavate grupi kuuluvate väärtuste muutused iga miRNA kohta. Seejärel saabki leida  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  väärtused ehk ekspressioonitasemete muutused (Livak & Schmittgen, 2001).

RT-PCR on odav meetod, mis võimaldab kasutada väikseid uuritava materjali koguseid, kuid oluline on kasutada sobivaid primereid (Schwarzenbach *et al.*, 2015). Üheks RT-PCR-i

miinuseks ongi asjaolu, et selle abil pole võimalik detekteerida uusi miRNA-sid (Marabita *et al.*, 2016).



**Joonis 4.** Pöördtranskriptsioon (muudetud *miScript miRNA PCR Array Handbook*, 2012 järgi).

### 1.3.2 Mikrokiibid

Mikrokiip on kõrge läbilaskevõimega tehnoloogia meetod, mida kasutatakse transkriptoomi analüüsimiseks (L. Chen *et al.*, 2017). Mikrokiibiga on võimalik ühes katses määrata rohkem erinevaid miRNA-sid võrreldes RT-PCR-iga, kuid samas peab katse läbiviimisel kasutama suuremat kogust RNA-d ja lisaks on vaja spetsiifilisi indikaatoreid (Schwarzenbach *et al.*, 2015). Selle meetodi puhul on üheks puudujäägiks see, et kõikide proovis kasutatavate indikaatorite jaoks pole hübridisatsiooni tingimused sobivad ning iga indikaator ei pruugi sobida ka vastava sihtmärkmolekuliga (L. Chen *et al.*, 2017; Schwarzenbach *et al.*, 2015).

### 1.3.3 Sekveneerimine

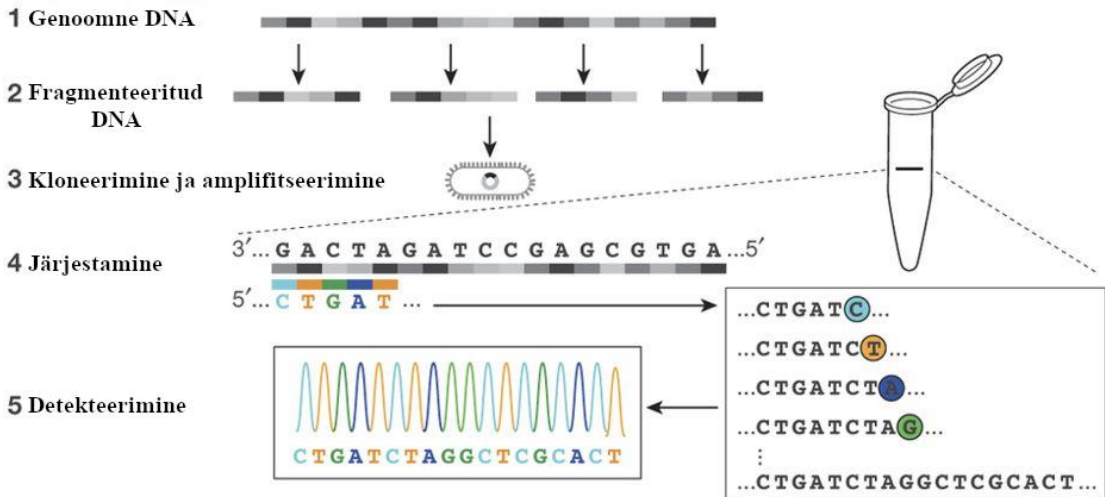
Kõige esimesena kasutati DNA sekveneerimiseks kahte meetodit, milleks olid Sangeri ensümaatiline ja Maxam-Gilberti keemiline meetod. Maxam-Gilberti meetodi puhul katkestatakse DNA ahel vastavate nukleotiidide (G, A, C või C ja T) kohalt keemilise reaktsiooni käigus (Maxam & Gilbert, 1977; Shendure *et al.*, 2017). Sangeri meetodi korral liidetakse DNA matriitsile praimer, mis jagatakse nelja tuubi, kuhu on lisatud DNA polümeraas ja neli dNTP segu. Seejärel lisatakse igasse tuubi üks modifitseeritud nukleotiid (ddNTP) ning

tulemusena saadakse erineva pikkusega DNA-fragmendid (Estrada-Rivadeneira, 2017; Sanger *et al.*, 1977; Shendure *et al.*, 2017). Mõlema meetodi puhul selekteeritakse saadud DNA-fragmendid geelelektrofooresiga (Shendure *et al.*, 2017).

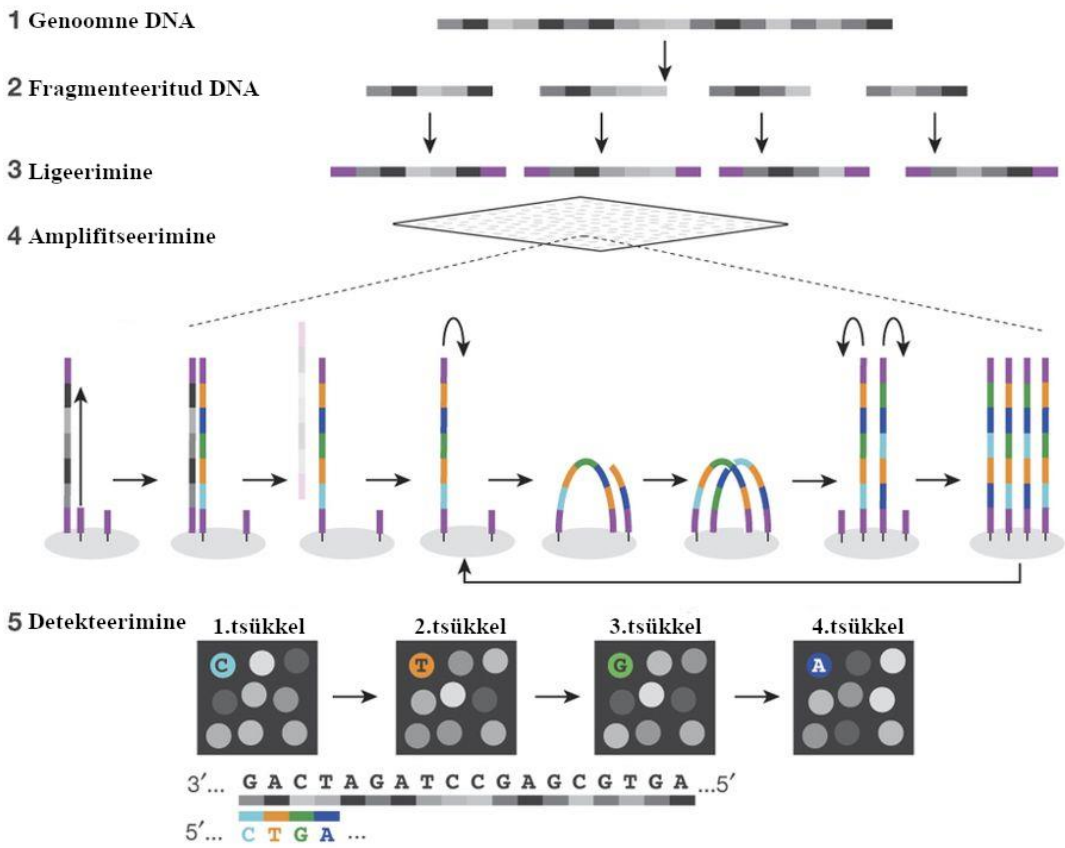
Teise põlvkonna sekveneerimismeetodeid iseloomustab ulatuslik paralleelsus ja nukleiinhappe klonaalne paljundamine (Pareek *et al.*, 2011). RNA sekveneerimine on kõrge läbilaskevõimega teise põlvkonna järjendamise meetod, mille käigus eraldatakse esmalt RNA näiteks rakkudest või kudetest. Seejärel isoleeritakse erinevat tüüpi RNA-d, milleks on pikad mittekodeerivad RNA-d (*lnc-RNA*), ribosomaalne RNA (rRNA), väiksed mittekodeerivad RNA-d (*small ncRNA*) (miRNAd ja piRNAd) ning informatsiooni-RNA (mRNA). Isoleerimine tehakse polü-A seleksiooni, rRNA vähendamise ja suuruse põhjal. Järgmiseks etapiks on pöördtranskriptsioon, mil RNA konverteeritakse cDNA-ks. Edasi moodustatakse RNA sekveneerimise raamatukogu ja toimub järjestuse paljundamine PCR-iga (Kukurba & Montgomery, 2015).

Kolmanda põlvkonna kõrge läbilaskevõimega sekveneerimismeetodeid iseloomustab järjestuse detekteerimine ühelt nukleiinhappe (DNA, cDNA) molekulilt ning sünteesi toimumine reaalsajas (Joonis 5). Siia sekveneerimisemeetodite hulka kuuluvad näiteks *Heliscope*, SMRT (*single molecule real-time sequencer*), RNAP ja Nanopoori sekveneerimine. Sekveneerimisega on võimalik tuvastada uusi miRNA-sid, kuid omakorda on tegemist aga kuluka meetodiga, sest materjali kulub rohkem (Pareek *et al.*, 2011).

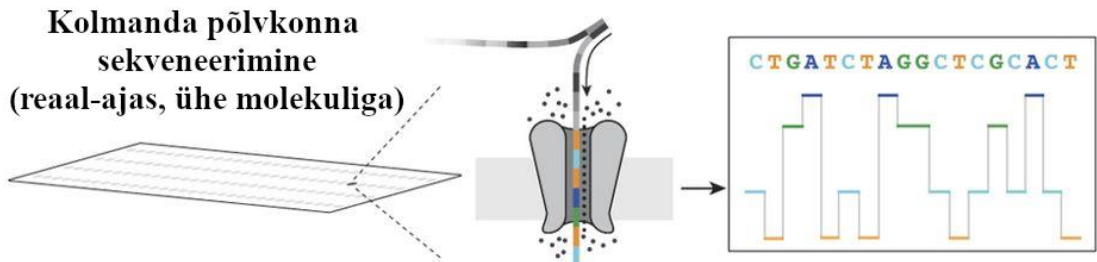
## Esimese põlvkonna sekveneerimine (Sanger)



## Teise põlvkonna sekveneerimine



## Kolmanda põlvkonna sekveneerimine (reaal-ajas, ühe molekuliga)



Joonis 5. DNA sekveneerimise tehnoloogiad (modifitseeritud Shendure *et al.*, 2017 järgi).

## **1.4 MikroRNA-d kui haiguste biomarkerid**

Kuna miRNA-sid leidub peale vere veel ka paljudes teistes kehavedelikes, kust neid on võimalik lihtsasti eraldada ja säilitada, on neid hea kasutada erinevate haiguste biomarkeritena. MikroRNA-de kui biomarkerite kasutamine on andnud võimaluse uurida näiteks erinevate vähivormide ja autoimmuunhaiguste tekkepõhjuseid ja kujunemist, kuna on võimalik detekteerida miRNA-de ekspressioonitasemete muutusi enne haiguse sümptomite avaldumist (Guay & Regazzi, 2013).

## **1.5 Diabeet**

### **1.5.1 Esimest tüüpi diabeet**

Esimest tüüpi diabeet (T1D) on autoimmuunne haigus, mille korral organismi enda immuunsüsteem ründab pankreases olevaid insuliini tootvaid beeta-rakke (Guay & Regazzi, 2013). T1D sümptomite avaldumisel on ligi 70-90% beeta-rakkudest hävinenud (Guay & Regazzi, 2013; Watkins *et al.*, 2014). Beeta-rakkudes toodetav insuliin on vajalik glükoosi transpordiks rakkudesse, kuid selle puuduse korral glükoosi ainevahetus häirub ning organism jääb insuliinipuudusesse (Guay *et al.*, 2011). T1D võib avalduda nii lapse- kui ka täiskasvanueas. T1D osakaal kõikidest diabeedijuhtumitest on 5-10% (American Diabetes Association, 2018). T1D tekke põhjused võivad olla seotud nii keskkonna (näiteks viirused) kui ka geneetiliste teguritega. T1D korral peab igapäevaselt manustama insuliini, kasutades selleks insuliinisüste või insuliinipumpa (Katsarou *et al.*, 2017).

### **1.5.2 Teist tüüpi diabeet**

T2D puhul on vähenenud insuliini tundlikkus, mistõttu ei oska organism insuliini efektiivselt kasutada. T2D tekke põhjus on multifaktoriaalne, haiguse teket soodustab ebatervislik toitumine, vähene liikumine, ülekaalulisus ja geneetiline eelsoodumus (Guay & Regazzi, 2013). Oht T2D kujunemiseks on nii lastel kui ka täiskasvanutel. T2D moodustab 90-95% kõikidest diabeedijuhtumitest (American Diabetes Association, 2018).

### **1.5.3 Gestatsioonidiabeet**

Gestatsioonidiabeedi (GDM) puhul on tegemist süsivesikute metabolismi häirega, mis tekib raseduse ajal ja taandub raseduse järgselt (Lapolla *et al.*, 2009). GDM on seotud nii rasedusaegsete kui ka sünnitusjärgsete komplikatsioonidega nii emal kui ka lapsel. Rasedal emal on oht preeklampsia tekkeks ning loodet võib ohustada makrosoomia, hüpoglükeemia, hingamishäired ja surm (Cao *et al.*, 2017). GDM diagnoosiga naistel on kõrgem risk haigestuda

nii esimest (Lapolla *et al.*, 2009) kui ka teist tüüpi diabeeti (Cao *et al.*, 2017). T1D haigestumise risk on 50% (Lapolla *et al.*, 2009) ja T2D võib välja kujuneda ligi 70% GDM-i põdenud rasedatel. Kõige kõrgem T2D tekkesagedus on esimese viie aasta jooksul (Eades *et al.*, 2017). Euroopas on GDM-i esinemissagedus 2-6% juhtudest (Eades *et al.*, 2017), Eestis on see näitaja 6% (Kirss *et al.*, 2015).

Gestatsioonidiabeedi diagnoosimiseks on vajalik glükoositolantsustesti (GTT) tegemine. Esmasel vastuvõtul mõõdetakse kõigil rasedatel esimesel rasedustrimestril (16.-19. rasedusnädalal) veresuhkru väärtus. GTT tehakse, kui hommikune paastuveresuhkru väärtus on 5.2 – 6.9 mmol/L või juhuslik veresuhkur on 7.0 – 10.9 mmol/L. Kui antud väärtused on kõrgemad, siis on tegemist eelnevalt tuvastamata väljakujunenud diabeediga ning GTT jäetakse ära. GDM-i kõrgesse riskirühma (Tabel 2) kuuluvatele rasedatele tuleb GTT teha esimesel rasedustrimestril 2. tüüpi diabeedi välistamiseks (Kirss *et al.*, 2015).

Raseduse teisel trimestril (24.-28. rasedusnädalal) korratakse GTT tegemine kõrgesse GDM-i riskirühma kuuluvatele rasedatele, kui neil oli esimesel trimestril GTT normis. Samuti tehakse sel perioodil ka GTT-rasedatele, kellel oli tekkinud raseduse ajal GDM-ile viitavaid tunnuseid (näiteks liigne kehakaal, hüperglükeemia, polühüdramnion, loote makrosoomia) (Kirss *et al.*, 2015).

**Tabel 2.** Rasedad, kes kuuluvad GDM-i kõrge riskiga rühma (Kirss *et al.*, 2015).

<b>GDMi kõrge riskiga rühma kuuluvad rasedad</b>
Ülekaalulised naised, kel kehamassiindeks (KMI) on raseduse eel kõrgem kui 30 kg/m <sup>2</sup>
Eelmise raseduse ajal on esinenud GDM
Anamneesis glükoositaluvuse häire
Esimese astme sugulastel (ema, isa, õde, vend) esineb diabeet
On sünnitanud suurekaalulise (üle 4.5 kg) vastsündinu
Anamneesis ebaselge põhjusega lootesurm
Esineb polütsüstiliste munasarjade sündroom

GTT ajal määratakse rasedatel esmalt paastuglükoosi väärtus. Seejärel manustatakse neile 75 g glükoosi ja mõõdetakse vereseerumi glükoositaset 1 ja 2 tunni möödudes. GDM diagnoositakse, kui üks testi normaalväärtustest on kas võrdne või üle normi (Tabel 3). GDM-i korral on oluline jälgida tervislikku mitmekesist toitumist. Dieetravi sobib ligikaudu 80-90% GDM-iga rasedatele veresuhkrutaseme normaliseerimiseks, kuid 10-20% vajab ka insuliin- või medikamentooset ravi (Kirss *et al.*, 2015).

**Tabel 3.** GDM-i kriteeriumid ja vastavad veresuhkru väärtused (Kirss *et al.*, 2015)

Mõõtmise aeg	Veresuhkru tase (mmol/L)
Paastusuhkur	$\geq 5.1$
1 tunni möödudes	$\geq 10.0$
2 tunni möödudes	$\geq 8.5$
GDM-i diagnoos	Kui üks väärtus on võrdne või üle normi

Seni on vähestes töödes uuritud miRNA-sid GDM-patsientidel raseduse teisel trimestril, kui GDM avaldub. Näiteks Zhu *et al.*, (2015) töödes kasutati miRNA-de ekspressiooni uurimiseks vereplasmast, mis oli võetud raseduse esimesel trimestril. Leiti, et kõrgema ekspressiooniga on miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-19a-3p ja miR-19b-3p. Lisaks oli miR-20a-5p kõrgema ekspressiooniga ka preeklampsia korral (Zhu *et al.*, 2015). Cao *et al.*, (2017) töös olid samuti miR-16-5p, miR-17-5p ja miR-20a-5p kõrgema ekspressiooniga. Proovid võeti iga nelja nädala tagant, alates esimesest arstivisiidist kuni GDM-i diagnoosimiseni raseduse teisel trimestril. MiR-16-5p, miR-17-5p ja miR-20a-5p olid kõrgema ekspressiooniga enne GDM diagnoosi saamist (16.-20., 20.-24. rasedusnädalal) ja ka 24.-28 rasedusnädalal, mil tavaliselt GDM diagnoositakse. Samuti näitasid need kolm miRNA-d Cao *et al.*, (2017) töös seost insuliiniresistentsusega, mis on üks GDM-i riskifaktoritest. Cao *et al.*, (2017) arvates võivad miR-16-5p, miR-17-5p ja miR-20a-5p olla potentsiaalsed GDM-i biomarkerid, kuna eristuvad selgelt GDM-rasedate ja tervete patsientide hulgas.

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Uurimistöö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrdlevalt määrata gestatsioondiabeediga patsientide ja tervete rasedate vereplasmast mikroRNA-de ekspressiooni tasemed raseduse teisel trimestril. Vastavad miRNA-d, mida vereplasmast mõõdeti:

- miR-30d-5p;
- miR-92-5p;
- miR-195-5p.

MiRNA-de valiku aluseks oli Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonnas GDM-patsientidel eelnevalt läbiviidud miRNA ekspressiooniandmete analüüs kasutades selleks QIAGEN-i miScript miRNA PCR Array meetodit.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Valimi kirjeldus ja uuringumaterjal

Uuringus osalenud rasedad suunati raseduse 2. trimestril GTT-le aastatel 2014-2016 SA TÜK Naistekliinikus. GDM diagnoositi 13 patsiendil, terveid oli 9. Kokku osales uuringus 22 üksikrasedusega naist, vanuses 19-37 aastat.

Patsientide tühja kõhu venoosne veri koguti plasma eraldamiseks etüleendiamiintetraädikhappe (EDTA) katsutitesse. Verekatseteid tsentrifugeeriti toatemperatuuril 2000 rpm 15 minutit (Centrifuge 5424R, Eppendorf AG, Saksamaa). Eraldatud plasma jaotati 100 µl kaupa tuubidesse ning külmutati. Plasmat säilitati -80°C juures.

#### 2.2.2 RNA eraldamine ja kontsentratsiooni mõõtmine

Cel-miR-39 *Spike-In* kontrolli saamiseks tehti kõigepealt lahus kontsentratsiooniga  $2 \times 10^{10}$  koopiat/µl kohta ja selleks lisati 300 µl RNAasi-vaba vett. Saadud lahust hoiti -80°C juures. RNA eraldamiseks vajamineva töölahuse (kontsentratsiooniga  $1.6 \times 10^8$  koopiat/µl kohta) tegemiseks lisati esmalt alglahusest 4 µl ( $2 \times 10^{10}$  koopiat/µl kohta) 16 µl-ile RNAasi-vabale veele ning seejärel lisati 2 µl lahusele (kontsentratsiooniga  $4 \times 10^9$  koopiat/µl kohta) 48 µl RNAasi-vaba vett.

RNA eraldamine viidi läbi miRNeasy Serum Plasma kit'i abil (QIAGEN, Saksamaa). Selle protsessi käigus lisati igasse proovi 3.5 µl sünteetilist *C. elegans* miR-39 pärast QIAzoli lüüsireagendi töötlust, kontsentratsioonis  $1.6 \times 10^8$  koopiat/µl kohta. Vastavalt vereplasma mahule (200 µl) lisati proovile 200 µl kloroformi. Seejärel hoiti lüsaati 2-3 minutit

toatemperatuuril, tsentrifuugiti 15 minutit pöõretel 12 000 4°C juures. Peale tsentrifuugimist koguti ülemine vesifaas uutesse tuubidesse ja lisati 900 µl 100% etanooli. Järgmisena pipeteeriti 700 µl proovi RNeasy MinElute segu ja tsentrifuugiti proovi 15 sekundit 10 000 rpm. Lisati 700 µl puhvrit RWT RNeasy MinElute segule, tsentrifuugiti 15 sekundit 10 000 rpm ja seejärel lisati 500 µl puhvrit RPE ning tsentrifuugiti 15 sekundit 10 000 rpm. Seejärel lisati 500 µl 80% etanooli RNeasy MinElute segule ja tsentrifuugiti 2 minutit 10 000 rpm. Töö teostati vastavalt tootja protokollile (QIAGEN, Saksamaa). Plasma ja RNA eraldamine ning kontsentratsiooni mõõtmine teostati Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonna töötajate poolt. RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit.

### 2.2.3 MikroRNA spetsiifilise cDNA süntees

Komplementaarse DNA (cDNA) sünteesi läbiviimiseks kasutati miScript II RT kit'i (QIAGEN, Saksamaa) ja 5x miScript HiSpec puhvrit. Eraldatud RNA proov lisati pöördtranskriptsiooni segusse (Tabel 4), segati ja hoiti jääl. Järgmisena inkubeeriti 60 minutit 37°C ning 5 minutit 95°C juures ja asetati segu jääle. MiScript HiSpec puhvri abil konverteeritakse ainult küps miRNA ning ka snRNA-d ja snoRNA-d pöördtranskriptsiooni käigus cDNA-ks, kuid miScript HiFlex puhvrit kasutades aga kõik miRNA-d (küps miRNA, prekursor miRNA, ncRNA ja mRNA) (*miScript PCR System Handbook*, 2011).

**Tabel 4.** Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni komponendid

Komponent	Reaktsiooni maht
5x miScript HiSpec puhver	4 µl
10x miScript nukleotiidide segu	2 µl
RNAasi-vaba vesi	10 µl
miScript pöördtranskriptaasi segu	2 µl
RNA (250 ng)	2 µl
<b>Maht kokku:</b>	20 µl

### 2.2.4 Reaal-aja polümeraasi ahelreaktsioon (RT-PCR)

RT-PCR-i läbiviimiseks kasutati miScript SYBR Green PCR kit'i (QIAGEN, Saksamaa) koos miRNA spetsiifiliste praimeritega (Tabel 5), mis näitasid kõige kõrgemat ekspressiooni Tartu Ülikooli immunoloogia osakonnas eelnevalt läbiviidud miRNA ekspressiooniandmete analüüsis, kasutades QIAGEN-i miScript miRNA PCR Array meetodit. Praimerid telliti

QIAGEN-ist. RT-PCR-i reaktsioonisegu koostis on välja toodud tabelis 6. cDNA analüüsimiseks kasutati ViiA™ 7 RT-PCR masinat (Applied Biosystems, USA) ning RT-PCR-i tsükli programm on kirjas tabelis 7.

**Tabel 5.** Praimerid

Praimer	Järjestus
cel-miR-39-3p	5'UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
hsa-miR-30d-5p	5'UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG
hsa-miR-92-3p	5'UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-195-5p	5'UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC

**Tabel 6.** RT-PCR-i reaktsioonisegu koostis

Komponent	Kogus (maht ja proovide arv)
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	5 µl x 83
10x miScript Universal Primer	1 µl x 83
10x miScript Primer Assay	1 µl x 83
RNAasi-vaba H <sub>2</sub> O	2 µl x 83
cDNA	≤ 1 µl
<b>Maht kokku:</b>	774 µl

**Tabel 7.** RT-PCR-i programm

Etapid	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Polümeraasi aktivatsioon	95	15 minutit	1
Denaturatsioon	94	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	55	30 sekundit	
	70	30 sekundit	
Sulamiskõvera analüüs	95	15 sekundit	1
	60	60 minutit	
	95	15 sekundit	

### 2.2.5 Andmete analüüs

Andmete analüüsimiseks kasutati RStudio tarkvara. Tulemusi analüüsiti Welchi t-testi ja kohandatud lineaarse regressiooni abil ning andmed kohandati kehamassiindeksile ja rasedusnädalale. Statistiliselt oluliseks loeti tulemused, millel p-väärtus oli väiksem kui 0.05. MikroRNA-de ekspressioonitasemete muutuste hindamiseks kasutati  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  meetodit (Livak & Schmittgen, 2001).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 Uuritavate kirjeldus

GDM-patsientide ja tervete rasedate kliiniliste andmete võrdlus on toodud tabelis 8. GDM-uuritavad erinesid tervetest rasedatest kõrgema KMI, rasedusnädalate ja veresuhkru näitajate poolest. Lisaks on tabelis 8 välja toodud andmed rasedusaegsete komplikatsioonide (mille all on mõeldud ähvardavat raseduse katkemist, enneaegset sünnitust ja rasedusaegset hüpertensiooni), lapse diagnoos sünnitusel ja sünnituse viis GDM-patsientide ja tervete patsientide hulgas.

**Tabel 8.** Uuritavate valim ja kirjeldus

		<b>GDM (n = 13)</b> (keskväärtus ± SH)	<b>Terved (n = 9)</b> (keskväärtus ± SH)	<b>P- väärtus</b> (t-test)
<b>Vanus</b>		31.15 ± 4.5	28.11 ± 4.5	0.128
<b>Kehamassiindeks</b>		28.58 ± 6.3	21.36 ± 1.7	0.0003
<b>Rasedusnädal</b>		27.45 ± 2.1	25.41 ± 1.7	0.019
<b>Paastusuhkur (mmol/L)</b>		5.2 ± 0.6	4.5 ± 0.2	P < 0.001
<b>Veresuhkur</b>	• 60 minuti GTT-testi veresuhkru väärtus (mmol/L)	9.7 ± 1.8	6.2 ± 1.6	P < 0.001
	• 120 minuti GTT-testi veresuhkru väärtus (mmol/L)	7.4 ± 1.2	5.4 ± 1.8	P < 0.001
<b>Rasedusaegsed komplikatsioonid<sup>a</sup></b>	esines	5	0	
	ei esinenud	6	0	
<b>Lapse diagnoos sünnitusel<sup>a</sup></b>	terve	9	6	
	makrosoomne, hüpoglükeemia	2	0	
<b>Sünnituse viis<sup>a</sup></b>	vaginaalne	10	5	
	sekkunud	1	1	

<sup>a</sup> Andmed olid olemas 11 GDM patsiendi ja 6 kontrollgrupi raseda jaoks. SH – standardhälve.

### 2.3.2 MikroRNA-de ekspressioon

Tulemustest selgus, et kõigi kolme mikroRNA (miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p) ekspressioonitasemete muutused olid positiivsed ehk kõrgema ekspressiooniga GDM-patsientidel. MiR-195-5p ekspressioonitaseme muutus oli kõige kõrgem (Tabel 9).

**Tabel 9.** Kolme miRNA (miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p) ekspressiooni muutused koos p-väärtustega

miRNA	Ekspressiooni muutus	P-väärtus (lineaarne regressioon)
miR-30d-5p	2.37	0.009
miR-92-5p	4.25	0.003
miR-195-5p	7.53	0.002

### 2.3.3 Arutelu

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrrelda kolme erineva mikroRNA (miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p) ekspressiooni gestatsioonidiabeediga patsientide ja tervete rasedate hulgas. MiRNA-de valik tehti Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonnas GDM-patsientidel eelnevalt läbiviidud miRNA ekspressiooniandmete analüüsi põhjal. Proovid võeti raseduse teisel trimestril (24.-28. rasedusnädalal). Kõik uuritavad miRNA-d olid kõrgema ekspressiooniga GDM-patsientidel ning kõige suurema ekspressiooniväärtusega oli miR-195-5p.

MikroRNA-de ekspressiooniväärtuseid normaliseeriti sünteetilise *C. elegans* miR-39 abil, kuna vereplasmas ja -seerumis ei leitud referents-miRNA-sid ehk ühtegi snoRNA-d, mistõttu normaliseerijatena neid kasutada ei saa (*miScript miRNA PCR Array Handbook*, 2012). Sellisel juhul on kasutatud referentsina miR-16. Samas, Madadi & Soleimani, (2019) artiklis toodi välja, et miR-16 pole sobilik normaliseerija, kuna selle ekspressioon võib siiski haiguste eri-stadiumites erineda.

MiR-30d ekspressiooni GDM-patsientidel on varasemalt uuritud vaid ühes töös (Jiandong Li *et al.*, 2015), kus uuriti miR-30d ekspressiooni GDM-patsientide ja tervete rasedate platsentas. Nad leidsid, et miR-30d oli madalama ekspressiooniga GDM-platsentas ning seostasid seda makrosoomia tekkega, kuna miR-30d üheks sihtmärgiks on EGFR (*epidermal growth factor receptor*) signaalirada, millel on oluline roll makrosoomia tekkel (Guarino *et al.*, 2018; Jiandong Li *et al.*, 2015). Lisaks Nunez Lopez *et al.*, (2018) leidsid ülekaaluliste ja T2D uuritavate rasvkoest võetud analüüside põhjal, et miR-30d oli kõrgema ekspressiooniga ning

pakkusid välja, et sel võib olla seos neil patsientidel esineva insuliiniresistentsusega ja T2D kujunemisega.

GDM-patsientidel leitud kõrgem miR-92-5p võib viidata neil patsientidel esinevale metaboolsele sündroomile (Karolina *et al.*, 2012). Lisaks võib see viidata ka makrosoomiale. Jing Li *et al.*, (2015) uurisid rasedatel miR-17-92 klastrisse kuuluvate miRNAde ekspressioonitasemeid ning leidsid, et miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ja miR-92 olid kõrgemate ekspressioonitasemetega makrosoomsete loodete platsentas. Huvitaval kombel tuvastati nende naiste seerumis miR-17, miR-18a, miR-19a ja miR-92 madalam ekspressioon (Jing Li *et al.*, 2015).

miR-195-5p kõrgem ekspressioon võib olla seotud T2D kujunemisega (Herrera *et al.*, 2010). Herrera *et al.*, (2010) uurisid miR-195 ekspressiooni T2D rotimudelil ehk Goto-Kakizaki (GK) rottidel ning leidsid neil miR-195 kõrgema ekspressiooni. Yang *et al.*, (2014) analüüsisid aga inimese maksarakkudest võetud proove ja leidsid, et miR-195 on kõrgema ekspressiooniga. MiR-195 otseseks sihtmärgiks on insuliini retseptor (INSR – *insulin receptor*) ning miR-195 kõrge ekspressiooni korral täheldati, et see spetsiifiline miRNA takistab INSR ekspressiooni. Sellisel juhul on häirunud insuliini signaliseerimine ja glükoosi metabolism (Yang *et al.*, 2014). Lisaks arvavad nad, et sel võib olla seos insuliiniresistentsuse ja T2D kujunemisega. Karolina *et al.*, (2012) leidsid miR-195 positiivse seose KMI ja vererõhuga ning arvavad, et miR-195 võib olla üheks teguriks metaboolse sündroomi kujunemises. Gunel *et al.*, (2018) uurisid miR-195 ekspressiooni preeklampsiaga rasedate vereplasmast ja platsentast võetud proovide põhjal. Nad tuvastasid, et miR-195 oli madalama ekspressiooniga platsentast analüüsitud proovides, kuid vereplasmast miR-195 ekspressiooni ei detekteeritud.

Varasemalt on miR-30d-5p uuritud GDM-patsientidel teadaolevalt vaid ühes uurimistöös, kuid miR-92-5p ja miR-195-5p kohta teated puuduvad (kui immunoloogia teadusgrupis 2018. aastal ilmunud töö välja arvata (Tagoma *et al.*, 2018)). Detekteeritud miRNA-d võivad olla seotud nii diabeedi kujunemise kui ka raseduse komplikatsioonidega, mis esinevad GDM-patsientidel (Herrera *et al.*, 2010; Jiandong Li *et al.*, 2015; Jing Li *et al.*, 2015; Nunez Lopez *et al.*, 2018).

## KOKKUVÕTE

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli võrdlevalt määrata kolme spetsiifilise mikroRNA (miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p) ekspressioonitasemete muutuseid gestatsioonidiabeediga patsientide ja tervete rasedate hulgas.

Leiti, et kõik kolm mikroRNA-d (miR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p) on kõrgema ekspressiooniga gestatsioonidiabeediga patsientide hulgas ning kõige kõrgemat ekspressiooni näitas miR-195-5p. Antud töös uuritud miRNA-d on GDM-patsientidel üles reguleeritud ning võivad omada olulist rolli GDM-i patogeneesis kui ka nendel naistel esineda võivate raseduskomplikatsioonide kujunemisel.

# **MiR-30d-5p, miR-92-5p and miR-195-5p expression in gestational diabetes mellitus patients blood plasma during second pregnancy trimester**

Evelin Kumpel

## Summary

Gestational diabetes mellitus is a carbohydrate metabolism disorder that occurs only during pregnancy. In addition, gestational diabetes mellitus increases the risk of pregnancy complications that can have an influence on the pregnant woman, but also on the embryo. What is more, gestational diabetes mellitus patients have a higher risk of developing type 1 or type 2 diabetes in the future. Several researches have shown a connection between microRNAs and gestational diabetes mellitus. MicroRNAs are small RNA molecules, which regulate gene expression at post-transcriptional level.

The purpose of this bachelor's thesis was to comparatively determine the expression levels of three specific microRNAs (miR-30d-5p, miR-92-5p, miR-195-5p), which were measured from the blood plasma of patients with gestational diabetes mellitus and healthy pregnant women blood plasma. Samples were collected during second trimester of pregnancy, when gestational diabetes mellitus is usually diagnosed by a glucose tolerance test.

The findings in this thesis indicate that miR-30d-5p, miR-92-5p and miR-195-5p are expressed higher in the patients of gestational diabetes mellitus and miR-195-5p have the highest expression. Therefore, the patients of gestational diabetes mellitus differed from healthy pregnant women in higher body mass index, pregnancy weeks and blood glucose results. Overall, this thesis presents correlation of those specific microRNAs in the occurrence of gestational diabetes mellitus.

## TÄNUSÕNAD

Eelkõige soovin tänada oma juhendajat Aili Tagomat asjakohaste märkuste, kannatlikkuse ja toetuse eest. Tänan professor Raivo Uibot, kes andis mulle võimaluse teha bakalaureusetöö immunoloogia uurimisgrupis ja Kadri-Haller Kikkatalo, kes on gestatsioonidiabeedi uuringu algataja immunoloogia teadusgrupis. Lisaks tänan ka kaasjuhendajat Viljar Jaksi asjakohaste kommentaaride eest.

Samuti soovin tänada Kristi Alnekit ja Helis-Janson Tasa uuritavate materjalide kvaliteetse käsitlemise eest ning tänan ka SA TÜK Naistekliinikust doktor Anne Kirssi ja ämmaemandat Laura Laurenit patsientide kliinilise uurimise ning uuritava materjali kogumise eest.

Uuring on rahastatud Eesti Teadusagentuuri poolt (IUT20-43).

# KASUTATUD KIRJANDUS

## Artiklid

American Diabetes Association. (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes:

*Standards of Medical Care in Diabetes—2018. Diabetes Care, 41*(Supplement 1), S13–S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>

Boon, R. A., & Vickers, K. C. (2013). Intercellular transport of microRNAs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 33*(2), 186–192.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300139>

Calderari, S., Diawara, M. R., Garaud, A., & Gauguier, D. (2017). Biological roles of microRNAs in the control of insulin secretion and action. *Physiological Genomics, 49*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00079.2016>

Cao, Y.-L., Jia, Y.-J., Xing, B.-H., Shi, D.-D., & Dong, X.-J. (2017). Plasma microRNA-16-5p, -17-5p and -20a-5p: Novel diagnostic biomarkers for gestational diabetes mellitus. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 43*(6), 974–981.

<https://doi.org/10.1111/jog.13317>

Chen, H., Lan, H.-Y., Roukos, D. H., & Cho, W. C. (2014). Application of microRNAs in diabetes mellitus. *The Journal of Endocrinology, 222*(1), R1–R10.

<https://doi.org/10.1530/JOE-13-0544>

Chen, L., Sun, F., Yang, X., Jin, Y., Shi, M., Wang, L., ... Wang, Q. (2017). Correlation between RNA-Seq and microarrays results using TCGA data. *Gene, 628*, 200–204.

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.056>

Dai, R., & Ahmed, S. A. (2011). MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 157*(4), 163–179.

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.007>

- Dotta, F., Ventriglia, G., Snowwhite, I. V., & Pugliese, A. (2018). MicroRNAs: markers of  $\beta$ -cell stress and autoimmunity. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*, 25(4), 237–245. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000420>
- Eades, C. E., Cameron, D. M., & Evans, J. M. M. (2017). Prevalence of gestational diabetes mellitus in Europe: A meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 129, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.030>
- Estrada-Rivadeneira, D. (2017). Sanger sequencing. *The FEBS Journal*, 284(24), 4174–4174. <https://doi.org/10.1111/febs.14319>
- Feng, J., Xing, W., & Xie, L. (2016). Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101729>
- Frost, R. J. A., & Olson, E. N. (2011). Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21075–21080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118922109>
- Ghai, V., & Wang, K. (2016). Recent progress toward the use of circulating microRNAs as clinical biomarkers. *Archives of Toxicology*, 90(12), 2959–2978. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1828-2>
- Guarino, E., Delli Poggi, C., Grieco, G. E., Cenci, V., Ceccarelli, E., Crisci, I., ... Dotta, F. (2018). Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Gestational Diabetes Mellitus: Updates and Perspectives. *International Journal of Endocrinology*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/6380463>
- Guay, C., & Regazzi, R. (2013). Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(9), 513–521. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.86>

- Guay, C., Roggli, E., Nesca, V., Jacovetti, C., & Regazzi, R. (2011). Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational Research*, 157(4), 253–264.  
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.009>
- Gunel, T., Kamali, N., Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Benian, A., & Aydinli, K. (2018). Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 1–8.  
<https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1508439>
- Hashimoto, N., & Tanaka, T. (2017). Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. *Journal of Human Genetics*, 62(2), 141–150.  
<https://doi.org/10.1038/jhg.2016.150>
- Herrera, B. M., Lockstone, H. E., Taylor, J. M., Ria, M., Barrett, A., Collins, S., ... Lindgren, C. M. (2010). Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 53(6), 1099–1109.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-010-1667-2>
- Karolina, D. S., Tavintharan, S., Armugam, A., Sepramaniam, S., Pek, S. L. T., Wong, M. T. K., ... Jeyaseelan, K. (2012). Circulating miRNA Profiles in Patients with Metabolic Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(12), E2271–E2276. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1996>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., ... Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kaviani, M., Azarpira, N., Karimi, M. H., & Al-Abdullah, I. (2016). The role of microRNAs in islet  $\beta$ -cell development: MicroRNAs in  $\beta$ -cell development. *Cell Biology International*, 40(12), 1248–1255. <https://doi.org/10.1002/cbin.10691>

- Kirss, A., Lauren, L., Rohejäär, M., & Rull, K. (2015). Gestatsioonidiabeet: riskitegurid, esinemissagedus, perinataalne tulem ja sõeluuringu vastavus juhendile Tartu Ülikooli Kliinikumi naistekliinikus ajavahemikul 01.01.2012–19.06.2013. *Eesti Arst*, *94*(2), 75–82.
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2015*(11), pdb.top084970. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Lapolla, A., Dalfrà, M. G., & Fedele, D. (2009). Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes mellitus: is it important? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *19*(9), 674–682. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.04.004>
- Li, Jiandong, Song, L., Zhou, L., Wu, J., Sheng, C., Chen, H., ... Huang, W. (2015). A MicroRNA Signature in Gestational Diabetes Mellitus Associated with Risk of Macrosomia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *37*(1), 243–252. <https://doi.org/10.1159/000430349>
- Li, Jing, Chen, L., Qiuqin Tang, Wu, W., Hao Gu, Lou Liu, ... Wang, X. (2015). The role, mechanism and potentially novel biomarker of microRNA-17-92 cluster in macrosomia. *Scientific Reports*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/srep17212>
- Li, X. (2014). MiR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene*, *533*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.105>
- Liu, Z., Sall, A., & Yang, D. (2008). MicroRNA: an Emerging Therapeutic Target and Intervention Tool. *International Journal of Molecular Sciences*, *9*(6), 978–999. <https://doi.org/10.3390/ijms9060978>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Madadi, S., & Soleimani, M. (2019). Comparison of miR-16 and cel-miR-39 as reference controls for serum miRNA normalization in colorectal cancer: MADADI AND

- SOLEIMANI. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 4802–4803.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.28174>
- Mao, Y., Mohan, R., Zhang, S., & Tang, X. (2013). MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacological Research*, 75, 37–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.06.005>
- Marabita, F., de Candia, P., Torri, A., Tegnér, J., Abrignani, S., & Rossi, R. L. (2016). Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Briefings in Bioinformatics*, 17(2), 204–212.  
<https://doi.org/10.1093/bib/bbv056>
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560–564.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- Monticelli, S. (2013). MicroRNAs in T helper cell differentiation and plasticity. *Seminars in Immunology*, 25(4), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.015>
- Nunez Lopez, Y. O., Garufi, G., Pasarica, M., & Seyhan, A. A. (2018). Elevated and Correlated Expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in Human Abdominal Adipose Tissue Play a Role in Adiposity and Insulin Resistance. *International Journal of Endocrinology*, 2018, 1–7.  
<https://doi.org/10.1155/2018/7351902>
- Osmai, M., Osmai, Y., Bang-Berthelsen, C. H., Pallesen, E. M. H., Vestergaard, A. L., Novotny, G. W., ... Mandrup-Poulsen, T. (2016). MicroRNAs as regulators of beta-cell function and dysfunction. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(4), 334–349. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2719>
- Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K., & Weinhäusel, A. (2014). A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002>

- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, *52*(4), 413–435.  
<https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>
- Pullen, T. J., da Silva Xavier, G., Kelsey, G., & Rutter, G. A. (2011). miR-29a and miR-29b Contribute to Pancreatic -Cell-Specific Silencing of Monocarboxylate Transporter 1 (Mct1). *Molecular and Cellular Biology*, *31*(15), 3182–3194.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.01433-10>
- Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A., & Nguyen, H. T. T. (2013). Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(20), 2985–2996. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i20.2985>
- Rebane, A., & Akdis, C. A. (2013). MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(1), 15–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.011>
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*(3), e219.  
<https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463–5467.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schwarzenbach, H., da Silva, A. M., Calin, G., & Pantel, K. (2015). Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clinical Chemistry*, *61*(11), 1333–1342.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239459>
- Shaffer, J., Schlumpberger, M., & Lader, E. (s.a.). *miRNA profiling from blood — challenges and recommendations*. 10.

- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, *550*(7676), 345–353. <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- Sonkoly, E., Stähle, M., & Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Seminars in Cancer Biology*, *18*(2), 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.01.005>
- Zhao, X., Mohan, R., Özcan, S., & Tang, X. (2012). MicroRNA-30d Induces Insulin Transcription Factor MafA and Insulin Production by Targeting Mitogen-activated Protein 4 Kinase 4 (MAP4K4) in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(37), 31155–31164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362632>
- Zhou, Q., & Melton, D. A. (2018). Pancreas regeneration. *Nature*, *557*(7705), 351–358. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0088-0>
- Zhu, Y., Tian, F., Li, H., Zhou, Y., Lu, J., & Ge, Q. (2015). Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *130*(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.01.010>
- Tagoma, A., Alnek, K., Kirss, A., Uibo, R., & Haller-Kikkatalo, K. (2018). MicroRNA profiling of second trimester maternal plasma shows upregulation of miR-195-5p in patients with gestational diabetes. *Gene*, *672*, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.004>
- Tétreault, N., & De Guire, V. (2013). miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*, *46*(10–11), 842–845. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.02.009>
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langhein, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(16), 7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>

- Ventriglia, G., Nigi, L., Sebastiani, G., & Dotta, F. (2015). MicroRNAs: Novel Players in the Dialogue between Pancreatic Islets and Immune System in Autoimmune Diabetes. *BioMed Research International*, 2015, 749734. <https://doi.org/10.1155/2015/749734>
- Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.004>
- Watkins, R. A., Evans-Molina, C., Blum, J. S., & DiMeglio, L. A. (2014). Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. *Translational Research*, 164(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.02.004>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., ... Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Xu, L., Yang, B.-F., & Ai, J. (2013). MicroRNA transport: a new way in cell communication. *Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1713–1719. <https://doi.org/10.1002/jcp.24344>
- Yang, W.-M., Jeong, H.-J., Park, S.-Y., & Lee, W. (2014). Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signaling and glycogen metabolism in HepG2 cells. *FEBS Letters*, 588(21), 3939–3946. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.006>

## **Käsiraamatud**

- miScript miRNA PCR Array Handbook*, p. 13, 44-45. QIAGEN Sample & Assay Technologies, 05/2012.
- miScript PCR System Handbook*, p. 10-13. QIAGEN Sample & Assay Technologies, 10/2011. 4<sup>th</sup> edition.

## **Kasutatud veebiaadressid**

miRNAde arv inimese genoomis. miRBase andmebaas (väljalaske versioon: 22.1).

<http://mirbase.org/textsearch.shtml?q=hsa> (viimati vaadatud 23.05.2019)

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Evelin Kumpel

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „**MiR-30d-5p, miR-92-5p ja miR-195-5p ekspressioon gestatsioonidiabeediga patsientide vereplasmas raseduse teisel trimestril**“, mille juhendaja on Aili Tagoma ja kaasjuhendaja Viljar Jaks,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Evelin Kumpel

**24.05.2019**