

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

Aivi Kaljuvee

**Platsenta metüloomi profiil ja dünaamika raseduse esimeses pooles**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Prof. Maris Laan, PhD  
teadur Siim Sõber, PhD

TARTU 2016

### **Platsenta metüloomi profiil ja dünaamika raseduse esimeses pooles**

Magistriprojekti käigus uuriti metülatiooni normaalselt kulgenud raseduse 1. ja 2. trimestri platsentakoes ning spontaanabordiga lõppenud raseduse platsentakoes. Metülatiooni määramiseks kasutati RRBS tehnoloogiat. 1. ja 2. trimestri proovide võrdlus näitas, et metülatiooni muutustest mõjutatud geenide hulgas oli palju neid, mille funktsioon on seotud üldiste organismi arenguliste protsesside, sh. olid paljud geenid seotud närvisüsteemi arenguga. Spontaanabordi proovide metüloomide analüüsi eesmärgiks oli kontrollida, kas raseduse katkemise võisid põhjustada üleüldised, kogu genoomi puudutavad häired metülatioonis. Algne hüpotees ei leidnud kinnitust – üldine metülatiooniprofiil oli sarnane 1. trimestri proovidega.

Märksõnad: platsenta metüloom, metülatioon, RRBS, korduv spontaanabort  
CERCS kood: B220 – geneetika, tsütogeneetika

### **The profile and dynamics of placental methylome during the first half of pregnancy**

The aim of the master's project was to analyze methylation in the 1st and 2nd trimester placental samples from pregnancies without complications and from pregnancies that had ended with spontaneous abortion. RRBS technology was used for measuring methylation. Comparison between the 1st and 2nd trimester samples showed that among the genes affected by methylation changes were many whose function is connected to general developmental processes, a subset of the genes was connected to nervous system development. The aim of the analysis of the samples from recurrent miscarriage patients was to investigate whether pregnancy loss could have been caused by general perturbations in methylation affecting the whole genome. The initial hypothesis was not confirmed – the methylation profile was highly similar to the 1st trimester samples.

Keywords: placental methylome, methylation, RRBS, recurrent miscarriage  
CERCS code: B220 – genetics, cytogenetics

## Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Platsenta.....	7
1.1.1 Platsenta struktuur.....	7
1.1.2 Platsenta funktsioon.....	9
1.2 Korduv spontaanabort.....	10
1.3 DNA metülatsioon.....	12
1.3.1 Inimese genoomse DNA metülatsiooni üldiseloostus.....	12
1.3.2 DNA metülatsiooni funktsioon.....	14
1.4 DNA metülatsioon platsentas .....	15
1.4.1 Platsenta genoomse DNA metülatsiooni üldiseloostus.....	15
1.4.2 Gestatsiooniajast sõltuvad muutused metülatsioonis .....	17
1.4.3 Korduva spontaanabordiga kaasnevad muutused metülatsioonis.....	18
2. Eksperimentaalosa.....	20
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Valim.....	20
2.2.2 Proovide kogumine.....	21
2.2.3 DNA eraldamine.....	22
2.2.4 Bisulfitsekvenceerimine.....	22
2.2.5 Metülatsiooniandmestiku eeltöötlus.....	23
2.2.6 Metülatsiooniandmestiku annoteerimine.....	24
2.2.7 Statistiline analüüs.....	25
2.3 Tulemused.....	26
2.3.1 RRBS tehnoloogiaga saavutatav genoomi kaetus.....	26
2.3.2 Metülatsioonitase genoomi eri elementides.....	28
2.3.3 Metülatsioonitase CpG saartes.....	30
2.3.4 Korrelatsioon ja klasterdamine.....	31
2.3.5 Indiviidide vahelise varieeruvuse hindamine.....	34
2.3.6 Differentiaalne metülatsioon 1. ja 2. trimestri võrdluses.....	36
2.3.7 Differentiaalne metülatsioon 1. trimestri ja spontaanabordi juhtude võrdluses.....	39

2.4 Arutelu.....	40
2.4.1 1. ja 2. trimestri platsentakoe metüloomide võrdlus.....	40
2.4.2 Normaalselt kulgenud raseduse ja spontaanabordiga lõppenud raseduse platsentakoe metüloomide võrdlus.....	42
2.4.3 Uurimistöö jätkamine .....	43
Kokkuvõte.....	44
Summary .....	45
Kasutatud kirjandus.....	47
Lisad.....	51
Lisa 1.....	51
Lisa 2.....	53
Lihtlitsents .....	56

## **Kasutatud lühendid**

APS – antifosfolipiidsündroom (ingl. k. *antiphospholipid syndrome*)

DMR – differentsiaalselt metüleeritud piirkond (ingl. k. *differentially methylated region*)

GLUT – glükoosi transporter (ingl. k. *glucose transporter*)

hCG – inimese kooriongonadotropiin (ingl. k. *human chorionic gonadotropin*)

hESC – inimese embrüonaalne tüvirakk (ingl. k. *human embryonic stem cell*)

hPL – inimese platsenta laktogeen (ingl. k. *human placental lactogen*)

ICR – imprintingu kontrollregioon (ingl. k. *imprinting control region*)

LH – luteiniseeriv hormoon

LINE – pikk insertiooniline hajuskorduselement (ingl. k. *long interspersed nuclear element*)

lncRNA – pikk mittekodeeriv RNA (ingl. k. *long non-coding RNA*)

meC – 5-metüültsütosiin

PBS – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (ingl. k. *phosphate-buffered saline*)

PCC – Pearsoni korrelatsiooni koefitsent

PGH – platsenta kasvuhormoon (ingl. k. *placental growth hormone*)

PMD – osaliselt metüleeritud ala (ingl. k. *partially methylated domain*)

PGC – primordiaalsed idurakud (ingl. k. *primordial germ cells*)

RM – korduv spontaanabort (ingl. k. *recurrent miscarriage*)

RRBS – vähendatud esindatusega bilsufitsekveneerimine (ingl. k. *reduced representation bisulfite sequencing*)

TFBS – transkriptsioonifaktori seondumiskoht (ingl. k. *transcription factor binding site*)

TSS – transkriptsiooni alguspositsioon (ingl. k. *transcription start site*)

WGBS – ülegenoomne bilsufitsekveneerimine (ingl. k. *whole-genome bisulfite sequencing*)

## Sissejuhatus

Platsenta on ajutine rasedusaegne organ, mis toetab loote arengut ja ema organismi kohanemist rasedusega. Platsenta talitluse häiretega seostatakse mitmeid rasedusaegseid komplikatsioone ning seetõttu on platsenta arengu ja funktsiooni mõistmine suure tähtsusega. Valdav enamus teadmistest inimese platsenta kohta pärinevad töödest, kus on uuritud lõpuni välja arenenud platsentat raseduse 3. trimestril. Põhjuseks on asjaolu, et uuritav materjal pärineb siis sünnitusega lõppenud rasedustest ning need proovid on teadlastele kättesaadavamad. Oluline on aga mõista platsenta arengut ka raseduse esimese pooles. Käesolevas töös uuritakse metülatsiooni 1. ja 2. trimestri platsentakoe proovides. Lisaks on uuritavaks materjaliks platsentakoe proovid patsientidelt, kellel on rasedus korduvalt lõppenud iseenesesliku katkemisega. Korduv spontaanabort puudutab 1-3% last soovivatest paaridest (Berry *et al.*, 1995; Branch *et al.*, 2010) ning ligi 50%-l juhtudest ei osata probleemi esinemise põhjuseid selgitada (Rull *et al.*, 2012). Käesolevas töös küsitakse, kas iseeneseslikku aborti võisid neil juhtudel põhjustada häired platsenta genoomi metülatsioonis.

Magistritöö autori ülesandeks oli antud uuringus läbi viia andmeanalüüs, uuritavate platsentakoe proovide kogumine ning kõik laboratoorne töö DNA metülatsiooni määramiseks oli eelnevalt teostatud.

Magistritöö jätkub kirjanduse ülevaatega, kus kirjeldatakse esmalt platsenta anatoomiat ning organi funktsiooni ning antakse ülevaade senistest teadmistest korduva spontaanabordi esinemise põhjuste kohta. Samuti käsitletakse sissejuhatavalt DNA metülatsiooni temaatikat ning tutvustatakse seniseid uuringuid metülatsiooni kohta platsentas. Järgmises peatükis kirjeldatakse uuritavat materjali, metülatsiooni määramiseks kasutatud metodoloogiat ning andmeanalüüsi. Viimasena on esitatud uurimisprojekti tulemused ning nende analüüs.

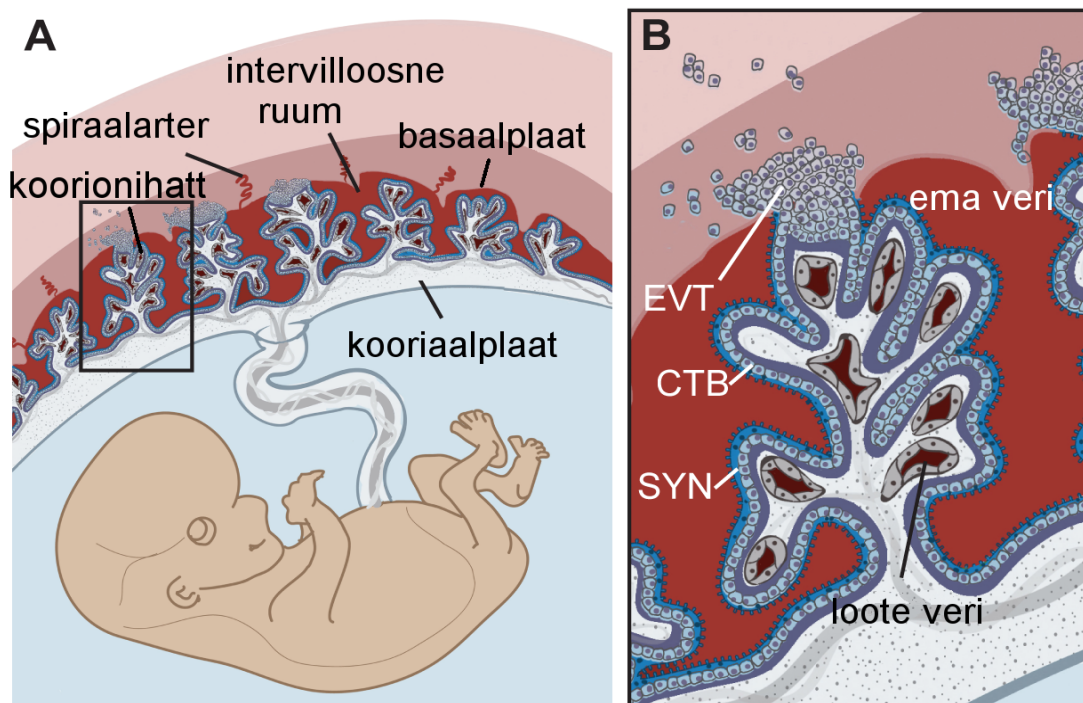
# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Platsenta

Platsenta on ajutine rasedusaegne organ, mis vahendab ema ja loote vahelist kontakti – ema ja loote vereringed ei ole otseses ühenduses, vaid ainevahetus toimub läbi platsenta. Platsenta peamisteks ülesanneteks on: hapniku, vee ja toitainete vahendamine lootele ning jääkainete eemaldamine; kaitstud üsasisese keskkonna tagamine, mh. kaitse patogeenide ja ksenobiootikumide eest, aga ka ema immuunsüsteemi eest; hormoonide ja teiste ühendite sekreteerimine, mis mõjutavad nii ema organismi kohanemist rasedusega kui ka loote arengut.

### 1.1.1 Platsenta struktuur

Inimese platsenta on hemokoriaalne platsenta, mis tähendab, et organ on vahetus kontaktis ema verega. Skemaatiline esitus platsenta struktuuri kohta on toodud joonisel 1. Platsenta lootepoolset pinda kutsutakse koriaalplaadiks ning emapoolset pinda basaalplaadiks. Koriaalplaadi pinnal asuvad platsenta veresooni sisaldavad koorionihattud. Hattude vahel intervillooses ruumis voolab ema veri ning hattudes sisalduvad rakukihiid on seega eraldajateks ema ja loote vere vahel. Koondnimetus vereringeid eraldavatele rakukihtidele ühiselt on platsentamembraan. Koorionihattudes paiknevad veresooned on nabanööri kaudu



**Joonis 1. Platsenta struktuur.** Kujutatud on skemaatiline esitus platsenta struktuuri kohta, B-osas on detailsemalt näidatud platsenta hattudes sisalduvad rakutüübid. EVT – ekstravilloosne tsütotrofoblast; CTB – tsütotrofoblast; SYN – sünsüütsiotrofoblast. Kasutatud joonis pärineb allikast (Zeldovich *et al.*, 2011).

omakorda ühenduses loote veresoonekonnaga.

Kogu hattude pind on kaetud multituumse sünsüütsiumiga, kus rakuvaheseinad puuduvad. Seda kihti nimetatakse sünsüütsiotrofoblastiks. Sünsüütsiotrofoblast laieneb ja uueneb selle all paiknevate jagunemisvõimeliste tsütotrofoblasti rakkude arvelt, mis esmalt differentseeruvad ja siis ühinevad sünsüütsiumiga. Tsütotrofoblasti rakkude teine differentseerumissuund on muutumine ekstravilloosse trofoblasti rakkudeks. Need rakud migreeruvad hattudest välja endomeetriummisse, kas interstitsiaalselt või sisenedes emaka spiraalarteritesse, ning tänu nende ja emapoolsete rakkude suhtlusele saab võimalikuks platsenta invasioon. Ekstravilloosetel trofoblastidel on muuhulgas oluline roll spiraalarterite remodelleerimisel, mis on vajalik platsentale piisava vere juurdevoolu tagamiseks. Siinjuures on oluline märkida, et arteritesse sisenenud rakud esialgu blokeerivad sealt vere juurdepääsu. Blokeerimine kaob ja seos loote ja ema vereringete vahel luuakse 10.-12. rasedusnädalal (Gude *et al.*, 2004). Seega raseduse varajases faasis areneb embrüo hüpoksia tingimustes ning toitumine on histiotroofiline – selliselt nimetatakse fagotsütoosi teel endomeetriumist pärinevate ühendite, peamiselt emakanäärme sekretsioonide omastamist. Trofoblasti rakud pärinevad trofektodermi liinist.

Hattude sisemus koosneb veresoontest ja sidekoest ning see on trofoblasti rakkudest eraldatud basaalmembraaniga. Olulisim rakutüüp hattude stroomas on mesenhüümirakk, kuna see on eellaseks kõikidele ülejäänutele strooma rakkudele: nii endoteeli kui vererakkudele, makrofaagidele, müofibroblastidele, silelihasrakkudele ja fibroblastidele. Hattude mesenhüüm pärineb ekstraembrüonaalsest mesodermist.

Hattude morfoloogia kirjeldamisel jaotatakse need sõltuvalt läbimõõdust, strooma rakulisest koosseisust ja veresoonte ehitusest viide kategooriasse ning eri tüüpi hattude osakaal on platsenta eri arenguetappidel erinev (Huppertz, 2008). Ka trofoblasti rakkudest koosneva epiteeli struktuur muutub raseduse jooksul. Esimesel trimestril on epiteel kahekihiline, hiljem järk-järgult laieneb ala, kus tsütotrofoblastide kiht puudub. 3. trimestri lõpuks on ~85% kogu epiteelist ühekihiline (Huppertz, 2008). Samas muutus tuleneb sünsüütsiotrofoblasti mahu suurenemisest, sünsüütsio- ja tsütotrofoblasti rakkude rakutuumade suhe jääb kogu raseduse jooksul samaks (Robison ja Price, 2015).

### 1.1.2 Platsenta funktsioon

Platsenta kaudu leiab aset gaasivahetus, samuti vee ja toitainete liikumine emalt lootele ning jääkainete eemaldamine. Hapnik ja CO<sub>2</sub> liiguvad läbi platsentamembraani difusiooni teel. Teiste molekulide vahendamiseks sisaldab sünsüüsiotrofoblasti membraan mitmesuguseid transportervalke, mille ekspressioon on osaliselt ka endokriinse kontrolli all. Põhiliseks süsivesikute, aga ka energia allikaks, on lootele glükoos, mis läbib platsentamembraani GLUT-perekonda (ingl. k. *glucose transporters*, eesti k. glükoosi transporterid) kuuluvate transportervalkude kaudu transporter-vahendatud difusiooni teel. Teada on, et hattude eri rakutüüpide GLUT valkude sisaldus raseduse jooksul muutub, millel arvatakse olevat ka funktsionaalne tähendus. Aminohapete kontsentratsioon on loote veres kõrgem, mistõttu toimub nende molekulide liikumine aktiivse transpordi abil. Eri transportervalke on palju ning need kuuluvad ka mitmetesse eri valguperekondadesse. Läbi platsenta liiguvad ka rasvad, kas difusiooniga või transporterite kaasabil. Platsenta emapoolses osas toodetakse lipoproteiinlipaas valke, mis vabastavad ema veres ringlevatest lipoproteiinidest vabu rasvhappeid. Vee läbimiseks arvatakse eksisteerivat samuti spetsiaalsed valkudest moodustuvad kanalid ning tegemist on passiivse transpordiga. Läbi valgukanalite on vahendatud on ka ionide ja vitamiinide transport. Teatud molekulid liiguvad läbi platsenta endo- või eksotsütoosi teel – näiteks emapoolsed immunoglobuliin G antikehad. Kokkuvõtteks, need vähesed toodud faktid näitavad, et platsenta omab keerukaid transpordimehhanisme. Samas tuleb meele pidada, et platsenta roll ei piirdu kindlasti ainult transpordiga. Selle väite kinnituseks on kasvõi see, et platsentasse jõudvast hapnikust ligi 40% tarbib platsenta ise (Carter, 2000).

Platsenta teiseks oluliseks funktsiooniks on raseduse hormonaalne regulatsioon. Platsenta toodab progesterooni ja östrogeene, olles alatest ligikaudu 9. rasedusnädalast nende hormoonide peamiseks allikaks. Progesteroon inhibeerib emaka kokkutõmbeid ning luteiniseeriva hormooni (LH) sekretsiooni ajuripatsist. Östrogeenid kutsuvad esile muutuseid ema reproduktiivorganites – rinnanäärmetes, emakas, emakakaelas ja tupes. Platsenta poolt sünteesitav inimese kooriongonadotropiin (hCG) on raseduse algusjärgus vajalik kollaskeha alalhoiuks ning samuti stimuleerib see hormoon tsütotrofoblasti rakkude differentseerumist ja ühinemist sünsüütsiumiga. Inimese platsenta laktogeen (hPL) mõjutab ema organismi metabolismi nii, et raseduse esimeses pooles energiavarud rasvkoesse talletatuna suurenevad, et siis hiljem need kasvava loote jaoks kasutusse võtta. hPL mõjub koos progesterooniga söögisu tõstvalt, sealjuures arvatakse see olevat seotud resistentsuse tekkega leptiini suhtes. Leptiin on rasvkoepoolt sünteesitav ühend, mis hüpotalamuse kaudu peaks söögiisu

vähendama. hPL stimuleerib ka pankrease beeta rakkude proliferatsiooni, mille järel tõuseb vere insuliini tase ning see kiirendab samuti rasvkoe teket. Salvestatud energiavarud kasutatakse ära raseduse hilisemas faasis. Siis tekib teiste muutuste kõrval emal ka insuliiniresistentsus, mistõttu saab platsenta glükoosi tarbimine tõusta. Arvatakse, et selles on oluline roll platsenta kasvuhormoonil (PGH). Samal hormoonil on tähtsus ka ema organismis sünteesitava insuliiniasarnase kasvufaktori I (IGF-1) taseme regulatsioonil, mis on omakorda oluline emapoolse metabolismi regulaator. Lisaks mainitutele toodab platsenta veel paljusid teisi ühendeid: kasvufaktoreid, tsütokiine, kemokiine, eikosanoide, vasoaktiivseid autakoide, kortikoliberiini, gonadoliberiini, türeoliberiini jm. Mitmeid hormone sekreteeritakse ka loote vereringesse, kuid siinkohal nende mõju loote arengule ei käsitleta. Huvitav fakt on siinkohal see, et mitmeid platsenta võtmehormoone kodeerivad geenid on tekkinud alles inimahvide liini evolutsiooni käigus (hCG, hPL, PGH jne).

Platsenta pakub lootele kaitset võimalike ema veres leiduvate ksenobiootikumide, bakterite ja viiruste eest. Samuti takistab see ligipääsu ühenditele, mis ema füsioloogia jaoks on tavapärased, aga mõjuksid lootele kahjustavalt. Näitena sellistest ainetest on suguhormoonid või ka ema stressihormoonid. Kahjulikud ained võivad platsentasse jõuda kas difusiooni teel, kui molekul on väikesemõõtmeline, või transportervalgu vahendusel, juhul kui aine on struktuuriliselt sarnane mõnele platsenta jaoks vajalikule ühendile, mille suhtes transporter ei ole piisavalt spetsiifiline. Kahjulike ühendite eemaldamiseks on kaks võimalust. Osadel juhtudel konverteeritakse need ensümaatilisel teel uuteks ühenditeks, millel ei ole kahjulikku mõju. Teiseks võimaluseks on nende molekulide tagasi suunamine ema verre. Näited transportervalgudest, mis seda väljutamist läbi viivad: MDR1 valk (ingl. k. *multidrug resistance protein*), MRP perekonna valgud (ingl. k. *multidrug resistance-associated protein*), ABCP valgud (ingl. k. *placenta-specific ATP-binding cassette protein*), MXR valk (ingl. k. *mitoxantrone resistance-associated protein*).

## 1.2 Korduv spontaanabort

Korduv spontaanabort (RM, ingl. k. *recurrent miscarriage*) on defineeritud kui kolme või enama järjestikkuse raseduse iseeneselik katkemine enne 22. gestatsiooninädalat (Jauniaux *et al.*, 2006; Kolte *et al.*, 2015). RM esineb 1-3%-l kõigist last soovivatest paaridest (Berry *et al.*, 1995; Branch *et al.*, 2010). Üksikult esinevat raseduse katkemist ei peeta häireks – seda mõistetakse kui mehhanismi, mis välistab mitteeluvõimeliste embrüote edasise arengu. Hinnanguliselt vaid üks kolmandik kõikidest rasedustest lõpeb lapse sünniga. Enamikel juhtudel hukkub embrüo väga varajases staadiumis ning raseduse olemasolust annab

tunnistust vaid ajutine hCG hormooni olemasolu ema veres (Larsen *et al.*, 2013). Neist rasedustest, mis on kliiniliselt kinnitatud, lõpeb raseduse katkemisega ligikaudu 10% (Branch *et al.*, 2010). RM-i esinemissagedus on aga kõrgem, kui viimati nimetatud numbri põhjal teoreetiliselt olema peaks. Järelikult ei ole RM puhtalt juhuslik, vaid osadel paaridel on selleks eelsoodumus ning seda käsitletakse süstemaatilise kliinilise probleemina. Alljärgnevalt on toodud lühike kirjeldus raseduse katkemiste põhjustest RM-i korral, samuti loetelu riskifaktoritest, mida haiguse esinemisega seostatakse. Mõningad mainitud häiretest on haiguse põhjustena veenvalt tõendust leidnud ning nende olemasolu kontrollimine on jõudnud diagnostikasse. Osad käsitletavatest teguritest on aga hüpoteetilised, mille osas uurimistöö käib. Praeguste teadmiste seisul iseloomustamiseks sobib fakt, et vähemalt 50% RM-i juhtudest käsitletakse idiopaatilistena. Neil patsientidel ei esine kasutusel olevatest diagnostilistest testidest kõrvalekaldeid ning patsiendile ei osata neil juhtudel RM-i esinemise põhjust selgitada (Rull *et al.*, 2012).

Ligikaudu 75% kõikidest sporaadilistest raseduse katkemistest on põhjustatud loote kromosoomianomaaliate poolt. RM-i juhtude korral on aga loote ebanormaalse karüotüübi sagedus hinnanguliselt ainult kuni 40% (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2012) ning sagedus on madalam RM patsientide hulgas, kellel on varasemaid raseduse katkemisi olnud rohkem (Larsen *et al.*, 2013). Loote kromosoomianomaaliad on RM-i põhjuseks eelkõige juhtudel, mil üks vanematest on ebanormaalse karüotüübiga. Kõige levinum on retsiprookse või Robertsoni translokatsiooni olemasolu, mis vanema fenotüüpi ei mõjuta, kuid lapsele võib päranduda tasakaalustamata translokatsioon (Larsen *et al.*, 2013).

Umbes 15%-l RM-i juhtudest esineb naisel emaka struktuurseid anomaaliad. Võrdluseks üldpopulatsioonis on nende anomaaliate esinemissageduseks hinnanguliselt 5% (Larsen *et al.*, 2013).

RM-i riskiteguriks peetakse ka nii kaasasündinud kui omandatud trombofiiliat. Samas teemakohase kirjanduse kriitilisel analüüsil jääb siiski ebaselgeks, mil määral kaasasündinud trombofiiliad RM-i esinemise riski tõstavad ning ka see, kas tegemist on põhjusliku seosega (Branch *et al.*, 2010; McNamee *et al.*, 2012). Kuid omandatud trombofiilia seisundite puhul, iseäranis antifosfolipiidsündroomi (APS) korral, on seos RM-iga tugev. APS väljendub kas veresoonte tromboosidena või erinevate rasedustüsistustena ning sellele on iseloomulik fosfolipiidide vastaste või nendega seotud plasmavalkude vastaste autoantikehade olemasolu veres või antikoagulandi hulga tõus veres. On leitud, et APS diagnoosi saanud naistel on ilma ravita tõenäosus järgmise raseduse katkemiseks 90% (Rai ja Regan, 2006). APS esinemissagedus RM patsientide hulgas on 15% (Rai ja Regan, 2006). Traditsiooniliselt on

raseduse katkemise põhjuseks APS korral peetud tromboosi teket platsenta veresoontes. Samas uued lisanduvad teadmised annavad alust arvata, et APS võib RM-i põhjustada ka läbi muude mehhanismide. Autoantikehad võivad häirida trofoblasti rakkude funktsioneerimist, nt. soodustada rakkude apoptoosi või takistada ühinemist sünsüütiumiks (Rai ja Regan, 2006). Samuti on pakutud, et APS võib olla kahjulik läbi immunoloogiliste mehhanismide – autoantikehad võivad aktiveerida komplemendisüsteemi (Larsen *et al.*, 2013).

RM-i esinemise põhjuseid otsitakse immuunsüsteemiga seotult ka laiemalt. Raseduse olemasolu jaoks on vajalik, et emal tekiks loote suhtes immuuntolerants ning arvatakse, et võimalikud häired seotud protsessides võivad põhjustada ka RM-i. Seni siiski veenvaid tõendeid immuunsüsteemihäirete ja RM-i seoste kohta palju ei ole. On leitud, et RM patsientidel on enam mitmeid autoantikehi. Ei ole teada, kas antikehad ise on kahjuliku mõjuga või need on lihtsalt indikaatoriks üldisele immuuntolerantsi tekkemehhanismide häirumisele (Larsen *et al.*, 2013). Samuti on leitud, et RM patsientidel on endomeetriumis lokaliseeruvaid NK-rakke (ingl. k. *natural killer cell*) tavalisest rohkem (Rai ja Regan, 2006). Ka on teada, et RM patsientidel esineb tavalisest enam geenivariante, mida on seostatud immuunsüsteemi düsfunktsiooniga (Larsen *et al.*, 2013).

RM-i riskifaktoriteks peetakse ka endokriinsüsteemi häireid, millest on järgnevalt toodud mõned näited. RM-i seostatakse luteaalfaasis esineva progesterooni defitsiiga (Branch *et al.*, 2010), samuti võib haigus olla seotud prolaktiini vähesuse või liiaga (Rai ja Regan, 2006). RM-i seostatakse kilpnäärme alatalitlusega – 28 uuringut kaasanud meta-analüüsiga on näidatud, et kilpnäärme vastaste autoantikehade, täpsemalt türeoid peroksüdaasi vastaste autoantikehad olemasolu tõstab oluliselt nii sporaadilise kui korduva spontaanabordi riski (Boogaard *et al.*, 2011). Ka on uuritud RM-i võimalikku seost polütsüstiliste munasarjade sündroomiga, kuid praeguseks on domineeriv arusaam, et seos tuleneb pigem sündroomiga koosinevast kõrgest kehakaalust (Larsen *et al.*, 2013).

## **1.3 DNA metülatsioon**

### **1.3.1 Inimese genoomse DNA metülatsiooni üldiseloostus**

Metülatsiooni näol on tegemist DNA modifikatsiooniga, kus tsütosiini 5. süsinik on metüleeritud. Inimese genoomis esineb 5-metüültsütosiin (mC) peamiselt kontekstis, kus tsütosiinile järgnev nukleotiid on guaniin ning nähtusele viitamisel kasutatakse terminit CpG metülatsioon. Avastus, et inimese genoomis võib tsütosiin omada metüülrühma ka muus kontekstis on alles hiljutine – seda on leitud embrüonaalsetes tüvirakkudes (Lister *et al.*, 2009), ajus (Lister *et al.*, 2013) ning suurusjärgu võrra vähemal määral ka muudes kudedes

(Schultz *et al.*, 2015) ning seetõttu on teadmised metülatsiooni funktsiooni kohta väljaspool CG-dinukleotiidi väga vähesed. Käesolevas töös käsitletakse ainult CpG metülatsiooni.

Imetajate ja sealhulgas ka inimese genoom on 70-80% ulatuses metüleeritud (Bird, 2002). Eristuvad CpG-tihedad piirkonnad, mida nimetatakse CpG saarteks, kus metülatsioon valdavalt puudub. CpG saartest väljaspool on genoomis CG-dinukleotiidi esinemissagedus madal, olles oluliselt madalam, kui see statistiliselt C ja G esinemissagedust eraldi arvestades olema peaks. CpG-de vähesus tuleneb sellest, et meC on kõrge mutatsioonisagedusega. Tsütosiinilt võib kas spontaanselt või ensümaatilisel eemalduda aminorühm ning allesjäävaks nukleotiidiks on meC puhul T, metüülrühma puudumisel U. Uratsiil on DNA reparatsiooniensüümidele hästi äratuntav, C->T mutatsioon aga mitte. Seega on meC mutatsioonidele vastuvõtlikum ja et genoom on enamuses metüleeritud, siis see seletabki CpG-de vähesust. Arvatakse, et CpG saared on sugurakkude liinis metüleerimata, nii ei ole neisse aladesse mutatsioone kogunenud ning need on säilitanud kõrgema CpG-tiheduse. Seega globaalses vaates on inimese genoomi metülatsiooniprofiil bimodaalne – see on suures osas metüleeritud, kuid CpG-tihedates piirkondades metüleerimata. Sellele lisanduvad muidugi ka CpG saartest väljaspool asuvad metüleerimata alad.

Globaalses vaates on genoomi metülatsioon ka suhteliselt stabiilne. Metülatsiooni võrdlemine eri kudedes on näidanud, et genoomi ligi 28 miljonist CpG-st on suurusjärgus 80%-l positsioonidest metülatsioon muutumatu (Schultz *et al.*, 2015), st. sõltumata koest on need positsioonid alati ühtemoodi kas metüleeritud või mitte.

Kui üldiseks reegliks on, et genoom on valdavalt metüleeritud ja varieeruvust eri kudede võrdluses on suhteliselt vähe, siis oluliseks erandiks sellest üldistusest on metülatsioonis toimuvad muutused primordiaalsetes idurakkudes (PGC) ja varajases embrüos. Neil arenguperioodidel kaotab genoom enamuse metülatsioonist, misjärel see uuesti taastatakse. See on justkui osa epigeneetilise mälu kustutamisest ja ettevalmistuseks totipotentsuse saavutamisel, mh. on PGC rakkudes toimuv metülatsiooni eemaldamine ja taastamine oluline imprintingu jaoks. Imprinting on nähtus, mille korral avaldub geeni kahest olemasolevast geenikoopiast alati kas ainult emalt või isalt päritud alleel (vt. jaotis 1.4.1). Hiiremudeli abil on teada, et demetülatsioon leiab PGC rakkudes aset kahes laines rakkude migreerumisel genitaalvalli ja sinna sisenemise järgselt (Seisenberger *et al.*, 2012). Metülatsioon järk-järgult taastatakse ning tavapärane metülatsioonitase saavutatakse isastel sünnimomendiks, emastel suguküpsuse saabumisel. Teine demetülatsiooni toimumise periood on vahetult pärast viljastumist ning metülatsioon taastatakse embrüos implantatsiooni ajaks (Smith *et al.*, 2014).

### 1.3.2 DNA metülatsiooni funktsioon

Genoomi metülatsioon on küll suhteliselt stabiilne, kuid märkimisväärne osa CpG-dest – ligi 20% – on eri kudede võrdluses varieeruva metülatsiooniga ning need kuuluvad eeldatavalt piirkondadesse, mis osalevad erinevate rakuliste protsesside regulatsioonis. Vaatamata juba mitme aastakümne pikkusele uurimustööle – esmakordselt juhiti CpG metülatsiooni olulisusele tähelepanu aastal 1975 (Riggs, 1975; Holliday ja Pugh, 1975) – teatakse metülatsiooni osas dünaamikat omavate piirkondade kohta siiski küllaltki vähe. Jõutud on arusaamiseni, et universaalseid, üldkehtivaid reegleid pigem ei ole ning metülatsiooni tähendus sõltub suuresti genoomsest kontekstist. St. metülatsiooni funktsioon on genoomi eri elementide juures erinev (Jones, 2012). Metülatsiooni seostatakse geenide regulaatoralades repressiooniga. Üha enam on aga tõendeid selle kohta, et DNA metüleerimine ei ole repressiooni algatavaks etapiks, vaid selle taga on muud epigeneetilised protsessid ning metülatsioonil on repressiooni säilitav ja stabiliseeriv roll (Jones, 2012).

Teadad on, et metülatsiooni olemasolu on imetajatel absoluutselt vajalik normaalseks embrüonaalseks arenguks. Seda on tõendatud hiire läbiviidud *knock-out* eksperimentide abil, milles on manipuleeritud DNA metüleerimist läbi viivate ensüümidega (Li *et al.*, 1992; Okano *et al.*, 1999). Eraldi on näidatud, et metülatsioon on vajalik rakkude differentseerumisel. Samuti ei ole metülatsiooni puudumisel mitmed somaatilised rakud ega ka vähirakud elujõulised. Samas ei mõjuta metülatsiooni puudumine embrüonaalsete tüvirakkude fenotüüpi, kuid need ei ole siiski võimelised differentseeruma.

Metülatsioon on üks vajalikest mehhanismidest genoomi kordusjärjestuste vaigistamisel (Smith ja Meissner, 2013). Ligi 40% imetajate genoomist koosneb transponeeruvatest elementidest, mis omavad tugevaid promootoreid ning seega potentsiaali avaldumiseks. Need piirkonnad on konstitutiivselt metülatsiooni osalusel repressiooniga. Samuti on metülatsiooni abil vaigistatud peritsentromeersed satelliitjärjestused. Peritsentromeerse heterokromatiini alalhoidmine omab tähtsust rakkude jagunemisel, et mitoosis oleks tagatud korrektne kromosoomide paardumine ja lahknemine.

Selgitamaks metülatsiooni rolli geeniekspressiooni regulatsioonis on seni uuritud kõige enam promootoralade metülatsiooni, eelkõige CpG saari sisaldavaid promootoreid. Geenide osakaal, mille promootoralad CpG saari sisaldavad, on ligikaudu 60% kõigist. Teadad on, et metüleeritud promootorala CpG saar blokeerib vastava geeni transkriptsiooni. Kuid selliselt on reguleeritud väga vähesed geenid – enamik promootorala CpG saari on metüleeritamata, ka siis, kui geen ei ekspresseeru. Metüleeritud on need piirkonnad siis, kui tegemist on pikaajalise repressiooniga: X-kromosoomi inaktivatsiooni ja imprintingu korral

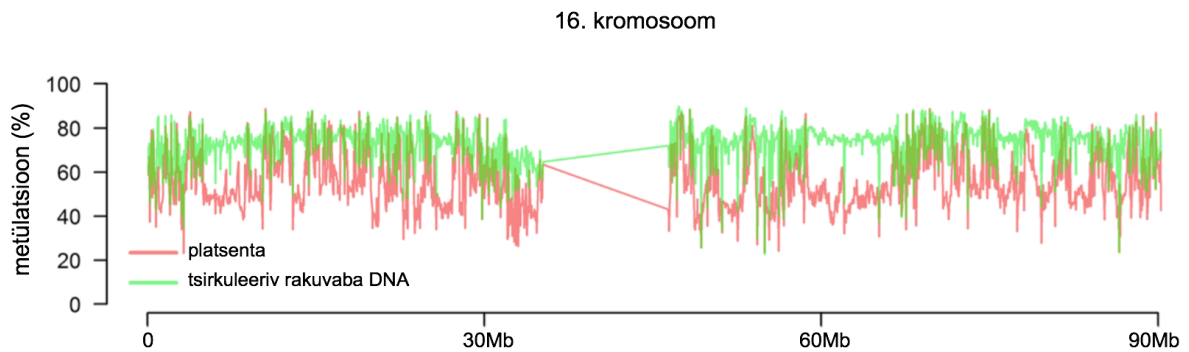
ning somaatilistes rakkudes on metüleeritud ka vähesed ainult sugurakkudes ekspressiooni omavad geenid. Seega CpG saartes reeglina metülatsioon puudub. CpG saartega külgnevad piirkonnad omavad aga metülatsiooni osas rohkem dünaamikat. Neid alasid nimetatakse CpG saarte kallasteks ja defineeritakse sageli kui CpG saartest 2kb üles- ja allavoolu paiknevate piirkondadena. CpG saarte kallastele on iseloomulik koespetsiifiline metülatsioon, kuid selle funktsioon ei ole teada. CpG saared ei paikne mitte ainult promootoralades, vaid ka geenikehades ja geenidevahelises alas, kus need on märka sagedamini metüleeritud. Jällegi ei ole väljaspool promootoreid paiknevate CpG saarte tähendus ja funktsioon teada. On pakutud, et need alad tähistavad positsioone, kus siiski mõnel varasemal arenguetapil ekspressioon toimub (Illingworth *et al.*, 2010).

Tehnoloogiate kasutamise abil, millega on võimalik määrata kogu genoomi metüloom, on nüüdseks aga jõutud teadmiseni, et enamik eri kudede vahelistest erinevustest metülatsioonis paikneb siiski promootoraladest väljaspool. Töös, kus võrreldi inimese embrüonaalsete tüvirakkude (hESC), hESC rakkude differentseerumisel saadud rakkude ja eri kudedest pärinevate proovide metüloome (kokku oli proove 24), leiti, et differentsiaalse metülatsiooniga olid 21,8% kõikidest autosoomide CpG positsioonidest (Ziller *et al.*, 2013). Differentsiaalselt metüleeritud piirkondade (DMR) iseloomustamisel leiti, et neist vaid väike alamosa paiknes promootorites või CpG saartes – töös on välja toodud, et promootoralaga, geeni eksoniga ja CpG saare või kaldaga olid ülekattes vaid 12,2% DMR aladest. Metülatsiooni varieeruvust oli seevastu enam enhaanserites ja teistes regulatoorsetes alades, kus paiknevad transkriptsioonifaktorite seondumiskohad (TFBS). Leiti, et 26,1% DMR-idest olid ülekattes enhaanserelemendiga ning 50% juhtudest sisaldas DMR vähemalt ühte TFBS-i. Eraldi juhiti tähelepanu ainult kindlas rakutüübis või koes hüpometülatsiooni omanud piirkondadele – need alad olid rikastatud rakutüübi- või koespetsiifiliste TFBS-ide suhtes. Seega enamik muutusi metülatsioonis leiab aset geenide transkriptsiooni alguspositsioonidest eemal ning märkimisväärne osa neist muutustest on seotud TFBS-idega. Üldiste põhimõtete kirjeldamiseni, kuidas metülatsioon nende alade aktiivust mõjutab, ei ole aga veel jõutud.

## **1.4 DNA metülatsioon platsentas**

### **1.4.1 Platsenta genoomse DNA metülatsiooni üldiseloomustus**

Metülatsiooni eripäraks platsentas on genoomi üldine madalam metülatsioonitase – teiste inimese kudedeaga võrreldes on see ~10-25% madalam (Ehrlich *et al.*, 1982). Hiljutised ülegenoomsete tehnoloogiatega teostatud uuringud on näidanud, et mitte kogu genoom ei ole ühtlaselt madalama metülatsiooniga, vaid madalama metülatsioonitasemega piirkonnad, nn.



**Joonis 2. Platsenta genoomi madalam metülatsioonitase.** Platsenta genoomi osaliselt metüleeritud alad tulevad nähtavale võrdluses kudede, kus genoom on tavapäraselt kõrgelt metüleeritud. Joonis pärineb allikast (Jensen *et al.*, 2015), võrreldud on platsenta ja tsirkuleeriva rakuvaba DNA metülatsiooni.

osaliselt metüleeritud alad (PMD, ingl. k. *partially methylated domains*) vahelduvad piirkondadega, kus genoom on tavapäraselt kõrgelt metüleeritud (Schroeder *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2015) (joonis 2). PMD alad võivad ulatuda paarisaja tuhandest paari Mb pikkuste lõikudeni ning kokku moodustavad need 37% kogu genoomist. Madalam metülatsioon esineb pigem genoomi geenivaesemates piirkondades või siis lõikudel, kus CpG-tihedus on keskmisest madalam. PMD alade esinemise põhjus, st. see, mis protsessidega nähtus seotud võiks olla, ei ole teada. Teada on vaid see, et neisse aladesse jäävad geenid on represseritud.

Arvatakse, et PMD alade asukohtade osas on indiviidide vaheline varieeruvus väike – artiklis (Schroeder *et al.*, 2013) on võrreldud kolme 3. trimestri platsentakoe proovi metüloome ja PMD alad on olnud vähemalt 90% ulatuses ülekattes. Samas töös on jõutud ka järelduseni, et PMD alad püsivad kogu raseduse jooksul muutumatuna. Tähelepanu tuleb juhtida siiski sellele, et metülatsiooni määramiseks eri gestatsiooniajaga platsentakoe proovides on nimetatud uuringus kasutatatud Illumina Infinium 450K tehnoloogiat. Antud platvorm on aga orienteeritud CpG saartele ja promootoraladele, mis on teadaolevalt madala metülatsiooniga ja seega ei ole kõige sobivam PMD alade tuvastamiseks. Seetõttu peaksid järgnevad uuringud PMD alade asukohtade stabiilsust täiendavalt uurima.

Ainuke teine organ, milles on samasugust metülatsioonitaseme vaheldumist kirjeldatud ja seejuures ei ole olnud tegemist haigusega kaasnenud muutustega, on pankreas (Schultz *et al.*, 2015). PMD alade esinemist on lisaks leitud vähkkoes (Hon *et al.*, 2012) ning loote kopsu fibroblastide rakuliinis IMR90 (Lister *et al.*, 2009). Seniteadaoleva põhjal paiknevad PMD alad genoomis ka eri rakutüüpides suuresti samades piirkondades – artiklis (Schultz *et al.*, 2015) on võrreldud platsenta, pankrease ja IMR90 rakuliini metüloome ja

leitud, et PMD alad on 40% ulatuses või enam ülekattes.

Platsenta genoomi metülatsiooniga seotult on oluline imprintingu nähtus. Imprintingu korral avaldub geeni kahest olemasolevast geenikoopiast ainult üks ning konkreetse geeni puhul alati kas emalt või isalt päritud alleel. Monoalleelsus tagatakse muuhulgas metülatsiooni kaasabil. Imprintitud geenid mõjutavad platsenta suurust ja morfoloogiat ning platsenta pinna ulatus, platsentamembraani koosseis ja hattude vaskularisatsioon mõjutavad otseselt platsenta transpordifunktsiooni (Fowden *et al.*, 2011). Ka on imprintingu kontrolli all olevate geenide hulgas neid, millest sõltub platsenta transportervalkude hulk. Platsenta on võimeline transpordifunktsiooni täites reageerima loote suurenevale toitainete vajadusele või muutustele nende kättesaadavuses ema verest ning selle paindlikkuse tagamisel on samuti oma roll imprintitud geenidel (Fowden *et al.*, 2011). Lisaks platsentale ekspresseeruvad imprintitud geenid ka arenevas lootes ning ka sünnijärgselt mõjutades kasvu. Geenid on olulised ka metabolismis nii sünnijärgselt kui ka täiskasvanueas, samuti omavad need ekspresiooni ajus (Peters, 2014).

Imprintitud geenide paiknemise kohta genoomis on hiiremudelis läbi viidud uuringute põhjal teada, et >80% neist geenidest asuvad koondatult klastrites ning ortoloogsed geenid omavad inimese genoomis sarnast paigutust (Peters, 2014). Klastrisse kuuluvad geenid on reguleeritud mitmekaupa ühise imprintingu kontrollregiooni poolt (ICR, ingl. k. *imprinting control region*). ICR regiooni alleelid on metüleeritud vanemaspetsiifiselt ning samuti omavad eri alleelid erinevaid histoonide modifikatsioone. Mehhanismide kohta, kuidas ICR regioonist sõltuvalt geeniekspresiooni regulatsioon aset leiab, eksisteerib kaks mudelit (Peters, 2014). Neist üks selgitab olukorda, kus ICR kattub mõne lncRNA (ingl. k. *long non-coding RNA*, eesti k. pikk mittekodeeriv RNA) promootoriga. lncRNA ekspresseerub, kui promootor on metüleerimata, vastasel juhul mitte. ICR regiooni kontrolli all olevate geenide vaigistamine toimub kas lncRNA geeni produkti osalusel või vaigistamine võib vajada ka ainult sealt lookusest lähtuvat transkriptsiooni. Teiseks võimaluseks on, et ICR regioonid on insulaatorelementideks, mis metülatsiooni puudumisel seovad transkriptsiooni repressorvalke ja vastavate geenide ekspresioon on tänu sellele allasurutud.

#### **1.4.2 Gestatsiooniajast sõltuvad muutused metülatsioonis**

Teadmised platsenta metülatsioonis toimuvate muutuste kohta raseduse eri etappidel on seni küllaltki piiratud. Uuritud on üksikuid lookuseid, kuid käesoleva töö autorile teadaolevalt on ainus ülegenoomset meetodikat kasutanud uuring (Novakovic *et al.*, 2011). Lisaks on varasemalt tehtud kindlaks, et globaalne metülatsioonitase platsentas tõuseb (Fuke

*et al.*, 2004). Muutus on raseduse alguspoolel kiirem, st. erinevus 1. ja 2. trimestri vahel on suurem kui 2. ja 3. trimestri vahel. Viidatud töös on metülatsiooni tasemed esitatud proovi DNA-s olnud metüleeritud tsütosiinide ja kõigi tsütosiinide suhtena ning sellisel kujul väljendatuna on raseduse jooksul metülatsiooni tõusuks ~10%.

Uuringus (Novakovic *et al.*, 2011) on kasutatud Infinium HumanMethylation27 platvormi, millega on võimalik määrata ~26000 CpG metülatsiooni ning kõik need positsioonid paiknevad geenide promootoralas, kaasatud gene on ~14000. Nende positsioonide keskmine metülatsioon 1. ja 2. trimestri võrdluses statistiliselt oluliselt ei erinenud, 2. ja 3. trimestri võrdluses see tõusis. Seega võib kahe artikli tulemuste põhjal järeldada, et globaalne metülatsioonitase raseduse alguses küll tõuseb ja suhteliselt kiiremini, kuid mitte promootoralade jaoks. Üksikute positsioonide metülatsiooni taseme võrdlus andis kõige enam erinevusi 1. ja 3. trimestri proovide vahel – ~1000 differentiaalse metülatsiooniga CpG-d, 1. ja 2. ning 2. ja 3. trimestri võrdluses oli tulemuseks ~150 positsiooni (differentiaalse metülatsiooni piiriks oli vähemalt 20%-ne erinevus). Kõikides võrdlustes olid ülekaalus metülatsiooni tõusuga positsioonid, osakaal ~90% ning muutused olid kumulatiivsed, st. ei leidunud positsioone, kus 1. ja 2. trimestri võrdluses oleks muutuse suund olnud vastupidine muutusega 2. ja 3. trimestri vahel. Funktsionaalne rikastusanalüüs näitas, et geenide hulgas, mille promootoralades muutusega CpG positsioonid paiknesid, oli palju immuunsüsteemiga seotud gene. Lisaks hinnati antud töös gruppide siseselt metülatsiooni varieeruvust. Leiti, et see on enamike CpG positsioonide puhul madal – kõigis gruppides oli 95-98% CpG-dest  $\sigma^2 < 0,009$ . Samas oli huvitavaks tulemuseks see, et kõrge varieeruvusega CpG-de hulk suurenes 3. trimestris – 352 positsiooni puhul oli  $\sigma^2 > 0,02$ , 1. ja 2. trimestri proovide jaoks oli sellised positsioone vastavalt 106 ja 166.

#### **1.4.3 Korduva spontaanabordiga kaasnevad muutused metülatsioonis**

Ka metülatsiooni uurimiseks korduva spontaanabordi patsientide platsentas on seni läbi viidud vaid üks ülegenoomne uuring (Hanna *et al.*, 2013). Kasutati samuti Illumina Infinium HumanMethylation27 platvormi, mis võimaldab määrata ~26000 CpG positsiooni metülatsiooni ning valimi suuruseks oli nii kontrollgrupi kui juhtude grupi korral 10 indiviidi. Kontrollgruppi kuulusid patsiendid, kelle rasedus oli kulgenud normaalselt, kuid see katkestati patsiendi enda soovil 1. trimestril. Gruppide võrdlemisel leiti statistiliselt oluline metülatsiooni erinevus vaid 11 CpG puhul. Neist 4 lookust valideeriti suurema valimi abil: kontrollgrupis 16 ja juhtude grupis 33 indiviidi, lisaks kaasati kolmanda grupina proovid 21-lt patsiendilt, kellel oli esinenud raseduse iseeneselik katkemine esmakordselt. Neljast

lookusest valideerus kolm ning üks seejuures ainult lisatud grupis, kus patsientide raseduse katkemine oli esmakordne. Geenid, mille promootoralaas differentsiaalse metülatsiooniga CpG-d paiknevad – *CYP1A2*, *DEFB1*, *AXL* on platsenta funktsioonis olulised ning artikli autorite hinnangul väärib nende seotus spontaanabordiga edasist uurimist.

Viidatud töös hübrisatsioonikiibil olnud CpG-de keskmine metülatsioonitase gruppide võrdluses ei erinenud. Globaalse metülatsioonitaseme muutuse hindamiseks määrati metülatsioonitase bisulfitsekveneerimise abil genoomi LINE-1 elementides. Statistiliselt olulist erinevust gruppide vahel ei tuvastatud. Varasemast leidub aga töö, kus on jõutud tulemuseni, et spontaanabordi korral on globaalne metülatsioonitase madalam (Yin *et al.*, 2012). Selles uuringus ei ole aga arvestatud platsentakoe proovide gestatsiooniajaga. Nagu eelnevas jaotises kirjeldatud mõjutab gestatsiooniaeg metülatsiooni, seega ei ole välistatud, et saadud tulemus võis olla põhjustatud erinevustest gestatsiooniajas.

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1 Töö eesmärgid

Uurimustöö põhieesmärgiks oli leida raseduse esimeses pooles, 1. ja 2. trimestri võrdluses platsenta metülatsiooniaset leidvad muutused ning leida metülatsiooniaset toimuvad muutused, mis esinevad korduva spontaanabordi juhtude korral. Käesoleva magistr töö autori ülesandeks oli andmeanalüüs. Uuritavate platsentakoe proovide kogumine ning kõik laboratoorne töö proovides DNA metülatsiooni määramiseks oli eelnevalt teostatud. Töö oli jaotatud alametappideks, mille eesmärgid olid järgnevad:

- 1) määrata täpselt, millist osa genoomist ja kui tihedalt metülatsiooni määramiseks kasutatud RRBS tehnoloogiaga saadud andmed katavad
- 2) kirjeldada platsenta genoomi metülatsiooniprofiili sõltuvalt genoomsest kontekstis – CpG saartes ja kallastes, geenikehades ning intergeensetes alades
- 3) võrrelda platsenta metüloomi normaalse 1. ja 2. trimestri raseduse puhul ja määrata differentiaalselt metüleeritud CpG saidid ja piirkonnad
- 4) võrrelda platsenta metüloomi normaalse raseduse ja spontaanabordiga lõppenud raseduse puhul ja määrata differentiaalselt metüleeritud CpG saidid ja piirkonnad.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Valim

Uuritavaks materjaliks on normaalselt kulgenud raseduste 1. ja 2. trimestri platsentakoe proovid ning korduva spontaanabordi juhtude platsentakoe proovid (tabel 1). Vastav laiem valim on varasemalt kirjeldatud artiklites: (Kasak *et al.*, 2015; Söber *et al.*, avaldamisel).

1. trimestri proovid pärinevad 4 patsiendilt, kelle rasedus katkestati patsiendi enda soovil kirurgilise protseduuri teel. Kõigil juhtudel oli rasedus kulgenud normaalselt, ilma ema- või loote poolsete komplikatsioonideta. Ka ei olnud neil patsientidel varasemalt esinenud kliiniliselt kinnitatud raseduse iseeneselikku katkemist. 2. trimestri proovid pärinevad 2 patsiendilt, kelle rasedus katkestati meditsiinilistel põhjustel emapoolsete riskide tõttu. Mõlemal juhul lootel anomaaliaid ei tuvastatud. Spontaanabordi juhtude proovid pärinevad 2 patsiendilt, kellel varem oli esinenud 5 või 6 järjestikkust iseeneselikku raseduse katkemist. Mõlemal juhul olid raseduse katkemise põhjuste hulgast välistatud järgmised tegurid: ebanormaalne menstruaaltsükkel, sugutrakti infektsioonid, antifosfolipiidsündroom, emal trombofiliaga seotud mutatsioonide esinemine ning mõlemad partnerid olid normaalse karüotüübiga. Patsiendid ei olnud raseduse ajal saanud antikoagulantravi.

Tabel 1: Kliiniline info patsientide kohta, kellelt pärinevad uuritavad platsentakoe proovid.

grupp	proovi kood	gestatsiooni aeg (päevad)	loote sugu	ema vanus	isa vanus	ema kehamassindeks enne rasedust (kg/m <sup>2</sup> )	varasemate raseduste arv	varasemate sünnituste arv	varasemate raseduse katkestamiste arv	varasemate spontaanabortide arv
1. trimester	OSA1	51	N	32	34	26,1	3	2	1	0
	OSA2	57	M	18	20	19,4	0	0	0	0
	OSA3	75	M	27	28	23,0	3	1	2	0
	OSA4	76	N	33	47	24,6	1	1	0	0
2. trimester	MNA1	140	N	24	27	20,6	2	1	0	1
	MNA2	147	M	22	27	19,5	0	0	0	0
korduv	SPA1	44	N	39	36	20,6	7	1	1	5
spontaanabort	SPA2	67	M	32	30	19,9	6	0	0	6

## 2.2.2 Proovide kogumine

Kõikide antud uurimistöös osalenud patsientide kaasamine ja platsentakoe proovide kogumine toimus sihtasutus Tartu Ülikooli Kliinikumi Naistekliinikus sünnitusabi ja günekoloogia dotsendi Kristiina Rulli koordineerimisel.

1. trimestri ja spontaanabortide juhtude platsentakoe proovid võeti kõigil juhtudel vahetult peale kirurgilist protseduuri, mis oli sooritatud kas raseduse katkestamiseks või katkenud raseduse puhul platsentakoe ja surnud loote materjalide eemaldamiseks. Proovid pesti lahuses, mis sisaldas 15 ml PBS puhvrit (Dulbecco), 0,3 ml penitsilliini ja streptomütsiini segulahust (10000 U/10000 mg/ml) ja 2 tilka hepariini (5000 U/ml). Emalt pärinevad rakud eemaldati stereomikroskoobi all (Discovery V8, Zeiss) ning puhastati välja platsenta hattude tsüto- ja sünsüütiotrofoblastid. Rakud pandi kuiva tuubi ja säilitati temperatuuril -80 °C.

2. trimestri platsenta proovid koguti ühe tunni jooksul peale meditsiiniliselt esile kutsutud aborti. Platsenta keskosast võeti kogu platsentat läbiv 2×2 cm suuruse läbilõikega proov. Ema vere eemaldamiseks pesti koeproove 1×PBS lahuses ja need asetati koheselt kuiva krüoviaali. Proove säilitati temperatuuril -80 °C.

Kõikidele proovidele on läbi viidud karüotüüpiseerimine, mis kinnitas lootel normaalse karüotüübi olemasolu. 2. trimestri platsentakoele teostati ka histoloogiline vaatlus, mille käigus patoloogilisi muutuseid ei leitud.

### 2.2.3 DNA eraldamine

DNA eraldamise platsentakoe proovidest viisid läbi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi inimese molekulaargeneetika uurimisgrupi liikmed vanemteadur dr. Kristiina Rull ja doktorant Mario Reiman.

Kasutati komplekti NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) reagente. Esmalt kaaluti igast platsentakoe proovist 20 mg. See kaeti 180 µl puhvriga T1, lisati 28 µl proteinaas K-d ning segati vortexil. Segu inkubeeriti 4 tundi temperatuuril 56°C, iga tunni järel segati vortexil. Lisati 200 µl puhvrit B3 ja inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 70 °C. Segati uuesti ning lisati 210 µl 100% etanooli, mille järel korrati segamist. Lahus viidi NucleoSpin komplekti kuuluvasse kolonni, kolonn asetati tuubi ja tsentrifuugiti 1 minuti jooksul toatemperatuuril 11200 x g juures, eluaat eemaldati. Seejärel pesti kolonni puhvriga BW: puhvrit lisati 500 µl, tsentrifuugiti samadel tingimustel ja eluaat eemaldati. Pesemist korrati 600 µl puhvriga B5. Peale eluaadi eemaldamist tsentrifuugiti uuesti 3 minuti jooksul. Kolonn asetati uude tuubi, lisati 100 µl puhvrit BE ning inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Seejärel tsentrifuugiti 2 minutit 11200 x g juures. Eluaadis sisaldunud DNA kontsentratsioon määrati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga. Eraldatud DNA säilitati temperatuuril -80°C.

### 2.2.4 Bisulfitsekveneerimine

Metülatsiooni määramiseks uuritavates proovides kasutati vähendatud esindatusega bisulfitsekveneerimise tehnoloogiat (RRBS, ingl. k. *reduced representation bisulfite sequencing*) (Meissner *et al.*, 2005). Vähendatud esindatus tähendab, et metülatsiooni ei määrata kogu genoomis, vaid ainult teatud osa jaoks – piirkondades, kus CpG dinukleotiidide tihedus on kõrgem. Nende piirkondade saamiseks algse proovi DNA rikastatakse: DNA fragmenteeritakse restriктаasidega ning seejärel selekteeritakse fragmendid kindla pikkuse alusel. Saadud raamatukogu jaoks määratakse metülatsioon traditsioonilise bisulfitsekveneerimise abil. DNA-le teostatakse bisulfitöötlus, mis konverteerib DNA-s tsütosiini uratsiiliks, samas metüültsütosiin selle kemikaaliga ei reageeri. Järgnevalt teostatakse PCR (ingl. k. *polymerase chain reaction*, eesti k. polümeraasi ahelreaktsioon) reaktsioon DNA polümeraasiga, mis lubab DNA-s uratsiili olemasolu ning asendab replikatsioonil uratsiili tümiiniga. Järgeb sekveneerimine ning neis positsioonides, kus C oli metüleeritud on sekveneerimise lugemites C. Kui C ei olnud metüleeritud, on lugemites C asemel T. Konkreetse tsütosiini metülatsiooni iseloomustamiseks kasutatakse terminit metülatsioonitase. See väljendab protsentuaalselt, kui mitmes seda positsiooni katvas lugemis

oli tegemist C-ga ja mitte T-ga. St. kui suur oli seda positsiooni sisaldanud sekveneeritud DNA fragmentide osakaal, kus vastavas positsioonis oli C metüleeritud.

Käesolevas uuringus teostati bisulfitsekveneerimine RRBS meetodil teenustööna ettevõtte Zymo Research poolt (ZR, [www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com)), kellelt pärineb ka järgnev kirjeldus teostatud protseduuride kohta. DNA fragmenteerimiseks lisati proovidele esmalt restriктаas Taq $\alpha$ I ning seejärel MspI (New England Biolabs). DNA ekstraheeriti komplekti DNA Clean & Concentrator-5 Kit (ZR) abil vastavalt toote protokollile. Fragmentidele ligeeriti sekveneerimisadapterid, kus tsütiinid olid asendatud 5-metüülsütosiinidega. Proovid kanti agarosgeelile (NuSieve) ning geelektroforeesi teel eraldati 150–250 bp ja 250–350 bp pikkused DNA lõigud kasutades selleks komplekti Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZR). Teostati bisulfiittöötlus komplektiga EZ DNA Methylation-Lightning Kit (ZR). Viidi läbi PCR reaktsioon ning produktid puhastati komplektiga DNA Clean & Concentrator Kit (ZR). Sekveneerimiseks kasutati platvormi Illumina HiSeq.

Sekveneerimise tulemusena saadi sõltuvalt proovist 20 806 953 - 38 522 241 lugemit. Bisulfiittöötluse edukuseks oli kõikides proovides u. 99%. Lugemite joondamine genoomile teostati tarkvaraga Bismark (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark>), joondamise edukus oli 53-65% (kõrgem proovide puhul, mille kohta oli kasutada vähem lugemeid). Genereeritud metülatsioonandmestik sisaldas sõltuvalt proovist infot 5 073 328 - 5 586 537 CpG jaoks ning keskmine lugemite arv CpG kohta oli 7 - 9. Andmestik salvestati ja edastati meie uurimisrühmale BED-formaadis failidena.

### **2.2.5 Metülatsioonandmestiku eeltöötlus**

Edasine metülatsioonandmestiku töötlus on teostatud käesoleva töö autori poolt. Kasutasin selleks keelt Python (v. 2.7.10), statistilise analüüsi tarkvara R (v. 3.2.4), keelt Bash (v. 3.2.57(1)) ning Unixi-keskkonna tekstitöötlusvahendeid awk ja sed. Kõik töös esitatud joonised on genereeritud tarkvara R abil.

Andmestikus sisalduvate CpG-de asukohakoordinaadid olid antud genoomi versiooni hg19/GRCh37 järgi. Et hiljem oleks võimalik kasutada uusimaid genoomi annotatsioone, konverteerisin koordinaadid versioonile hg38/GRCh38 kasutades selleks programmi LiftOver (<https://genome-store.ucsc.edu/>). Algsetes failides oli CpG-de metülatsioonitase antud DNA päri- ja vastassuunalisel ahelal asuvate dinukleotiidide jaoks eraldi. CpG metülatsiooni peetakse sümmeetriliseks, seetõttu koondasin eri ahela info ning leidsin CpG metülatsioonitaseme mõlema ahela lugemite põhjal. Edasi filtreerisin välja CpG-d, mille puhul oli sekveneerimislugemeid vähem kui 5. Järgnevates analüüsides, kus võrdlesin kõigi 8

proovi andmeid korruga, kasutasin andmestikust ainult neid autosoomidel paiknevaid CpG-sid, mille puhul oli peale filtreerimist andmed olemas kõikide proovide kohta – selliseid positsioone oli 2 043 665.

Töö käigus oli kahel juhul vaja kasutada metülatsiooniinfot koondatult 20 kb pikkuste genoomilõikude kaupa. Selleks viisin andmestiku esitusele, kus iga sellise lõigu kohta oli leitud: sinnajäävate CpG-de keskmine metülatsioonitase, keskmine lugemite arv CpG kohta ning info, kui palju on piirkonna kohta andmestikus kirjeid ning kui palju on CpG positsioone vastavas genoomisekventsisis. Kasutusest jäid välja need 20kb lõigud, mille jaoks oli andmestikus vähem kui 10 CpG-d.

## 2.2.6 Metülatsiooniandmestiku annoteerimine

Mitmes järgnevas analüüsis on tulemused esitatud sõltuvalt genoomi kontekstist. Et see oleks võimalik, oli tarvilik andmestiku annoteerimine infoga, millisesse genoomi piirkonda konkreetne CpG kuulub. Genoomi piirkonnad määrasin geenidest ja CpG saartest lähtuvalt.

Geenide definitsioonidena kasutasin GENCODE projekti annotatsioone (Basic Set, v. 22) (<http://www.encodegenes.org>). Promootoralad piiritlesin sõltuvalt geeni transkriptsiooni alguskohast (TSS): -1000bp kuni +100bp TSS suhtes. Geenikeha alaks määrasin +100bp TSS suhtes kuni transkriptsiooni lõpppositsioonini. Kui CpG paiknes samaaegselt mõne transkripti promootoris ja geenikehas, siis lugesin CpG kuuluvaks promootoralasse.

CpG saarte annotatsioonina kasutasin andmestikku, mis on saadaval UCSC genoomibrauserist (<https://genome.ucsc.edu>). Andmestiku genoomikoordinaadid olid arvutatud genoomi maskeeritud versiooni jaoks (st. versiooni jaoks, kus kordusjärjestuste piirkondades ei ole antud sekventsinfot). Andmestik sisaldas 30477 CpG saart. Grupeerisin need kolme rühma sõltuvalt sellest, kus CpG saar geeni suhtes paiknes:

1) CpG saared, mis olid ülekattes promootoralaga, n=15477

2) CpG saared, mis ei olnud ülekattes promootoriga, aga olid ülekattes geenikehaga või alaga, mis jäi +100bp geeni transkriptsiooni lõpppositsioonist allavoolu (geenikehale järgneva ala kaasamist on peetud oluliseks mitmetes töödes (Illingworth *et al.*, 2010; Maunakea *et al.*, 2010)), n=9160

3) ülejäänud CpG saared, st. need, mis paiknevad intergeenses alal, n=5840.

Kui leidis CpG, mis paiknes samaaegselt CpG saare piirkonnas ja geeni promootoris või geenikehas, siis annoteerisin CpG kuuluvaks CpG saare piirkonda.

CpG saare kaldad defineerisin piirkondadena, mis asuvad CpG saarest 2kb üles- ja

allavoolu. Kui CpG paiknes samaaegselt CpG saare kalda piirkonnas ja geeni promootoris või geenikehas, siis annoteerisin CpG kuuluvaks CpG saare kalda piirkonda.

Andmestiku annoteerimisel kasutasin R tarkvara paketti GenomicRanges (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GenomicRanges.html>). Paketi kasutamine oli otstarbekas seejuures ka CpG saarte grupeerimisel nende asukoha määramiseks geenide suhtes.

### 2.2.7 Statistiline analüüs

Differentsiaalse metülatsiooni analüüsiks kasutasin DSS nime all publitseeritud statistilist meetodit (Feng *et al.*, 2014). Selles lähenemises modelleeritakse võrreldavates gruppides metülatsiooniväärtuste jaotust üksikute CpG-de tasemel beta-binomiaaljaotuse abil. Saadud jaotuste keskmiste väärtuste võrdlemisel kasutatakse null-hüpooteesi testimiseks Wald testi. Meetod arvestab nii bioloogilise varieeruvusega, mis tuleneb erinevustest indiviidide vahel grupisiselt, kui ka varieeruvusega, mis on andmetes tehnilistel põhjustel, kaasates selleks arvutustesse info sekveneerimise sügavuse kohta. Autorid on oma meetodi võrdlemisel teiste olemasolevate lähenemistega toonud välja, et DSS saavutab teistest meetoditest paremaid tulemusi just juhtudel, kus võrreldavate gruppide suurused on väikesed. See oli põhjuseks, miks valisin DSS meetodi käesolevas töös analüüsitava andmestiku juures kasutamiseks.

Rakendasin meetodit tingimustel:  $p$ -väärtus=0,01, metülatsiooni erinevus  $\Delta > 0\%$ . See tähendab, et null-hüpooteesi testimisel kontrollitakse jaotuste keskmiste väärtuste erinevust, nõuet, et vahe peaks teatud väärtusest suurem olema, kasutatud ei ole. Differentsiaalselt metüleeritud alade (DMR) leidmiseks grupeeritakse lähestikku asuvad differentsiaalse metülatsiooniga CpG. DMR ala peab sisaldama vähemalt kolme sellist positsiooni ning nende osakaal peab piirkonnas olema  $> 50\%$ .

Funktsionaalse rikastusanalüüsi jaoks kasutasin tarkvara g:Profiler (Reimand *et al.*, 2016). Rikastusanalüüsi käigus leitakse bioloogilised protsessid, millega seotud geenid on uuritavas geenide nimekirjas statistiliselt ülesindatud. See saab võimalikuks tänu andmebaaside olemasolule, mis haldavad geenide funktsionaalsusega seotud infot. Mõned näited andmekogudest, mida g:Profiler kasutab: GO ontoloogia (<http://geneontology.org>), bioloogiliste radade andmebaasid KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) ja Reactome (<http://www.reactome.org/>), miRNA-de andmebaas mirBase (<http://www.mirbase.org/>), valk-valk interaktsioonide andmebaasid CORUM (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/corum/>) ja BioGRID (<http://thebiogrid.org/>)

jne.. Programm tuvastab uuritavas geenide nimekirjas teatud nähtusega seotud geenide olemasolu ning tulemuse statistilise olulisuse hindamine põhineb hüpergeomeetrilise jaotuse kasutamisel. Mitmese testimise korrigeerimiseks rakendatakse programmi autorite poolt loodud meetodit g:SCS (Reimand *et al.*, 2007).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 RRBS tehnoloogiaga saavutatav genoomi kaetus

Enne põhianalüüside teostamist oli eeltööks ülevaate loomine, mida kasutatav metülatsiooniandmestik täpselt sisaldab. See tähendas kindlaks tegemist, mis genoomi piirkondades andmestikus olevad CpG-d paiknevad ning kontrollimist, et metülatsiooniinfo oleks olemas kõikide kromosoomide jaoks.

Algsest andmestikust jäeti analüüsid kasutamiseks alles autosoomidel paiknevad CpG-d, mis olid kõigi 8 proovi puhul kaetud vähemalt 5 lugemiga – selliseid kirjeid oli kokku 2 043 665. Tabelist 2 on näha, kus andmestiku CpG-d genoomis geenide või CpG saarte ja kallaste suhtes paiknevad. Kuna on teada, et RRBS tehnoloogia annab tulemusi eelkõige CpG-tihedate piirkondade jaoks, siis on ootuspärane, et kõige paremini on kaetud CpG saared

Tabel 2: Uuringus kasutatud andmestikus sisalduvate CpG-de arv genoomi eri elementide lõikes.

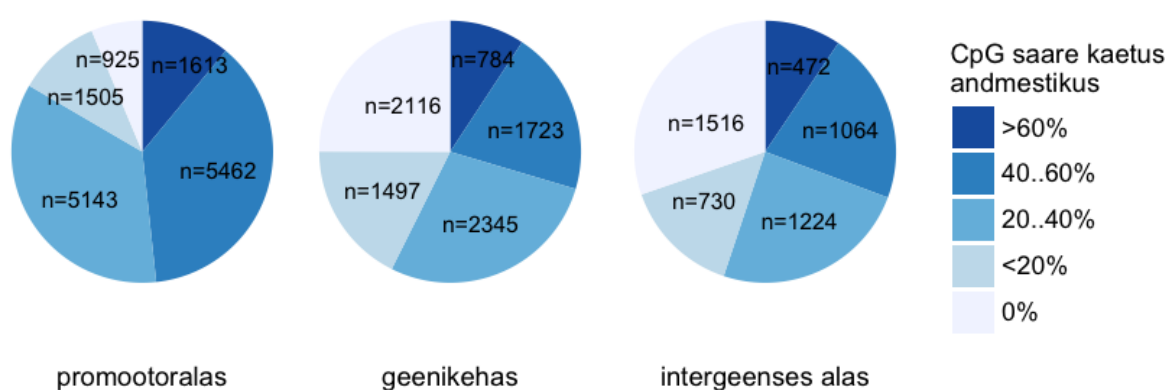
genoomi element <sup>a</sup>	CpG-d genoomis <sup>b</sup>	CpG-d andmestikus	kaetus <sup>c</sup>
CpG saar	2099224	743624	35,4%
promootoralas geenikehas	1430188	556205	38,9%
intergeenses alas	403434	117814	29,2%
	265602	69605	26,2%
CpG saare kallas	1960729	250576	12,8%
promootoralas geenikehas	1036167	136434	13,2%
intergeenses alas	600342	77981	13,0%
	324220	36161	11,2%
muu	25884987	1049462	4,1%
promootorala geenikeha	429509	32990	7,7%
intergeenne ala	12082366	568885	4,7%
	13373112	447587	3,4%
kokku	27845716	2043665	7,3%

<sup>a</sup> CpG saarte asukohad on määratud UCSC genoomibrauseris (<https://genome.ucsc.edu>) kasutatavate asukohakoordinaate abil. CpG saare kallas on defineeritud 2 kb pikkuse alana mõlemal pool CpG saart. Viimasena on hinnatud CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool asuvate CpG-de olemasolu andmestikus.

<sup>b</sup> Genoomi versioon hg38/GRCh38, arvesse on võetud ainult autosoomidel paiknevad CpG-d.

<sup>c</sup> Kaetus väljendab, kui suurele osale genoomi kõigist CpG-dest on metülatsioonitase määratud.

ja kaldad – ligi pooled andmestiku CpG-dest kuuluvad neisse piirkondadesse. Tabelist on näha, et genoomi kõikidest CpG saartesse kuuluvatest CpG-dest on metülatsoonitase määratud 35,4%-le. See aga ei tähenda, et andmestikus oleks esindatud ainult kolmandik kõikidest CpG saartest. Metülatsooninfo on eri CpG saarte jaoks olemas erineval määral. Jooniselt 3 on näha, et andmestikus on kirjeid ligikaudu 95%, 75% ja 70% kõikide vastavalt promootoralaga ja geenikehaga ülekattes olevate ning intergeenses alas paiknevate CpG saarte kohta. Samas võimaldab andmestik uurida ka CpG saarte ja kallastega mitte seotud positsioone – ligi 50% andmestiku CpG-dest ei kuulu neisse piirkondadesse (tabel 2).



### CpG saar

**Joonis 3. CpG saartese kuuluvate CpG positsioonide olemasolu andmestikus.** Iga CpG saare puhul on leitud, kui suurele osale sinnakuuluvatest CpG-dest on metülatsoonitase määratud ning sektordiagrammide abil on näidatud erineva tihedusega kaetud saarte osakaalu andmestikus. CpG saarte asukohad on käesolevas töös määratud UCSC genoomibrauseris (<https://genome.ucsc.edu>) kasutatavate asukohakoordinaate abil ning need piirkonnad on jagatud kolme gruppi sõltuvalt paiknemisest geenide suhtes.

Tabel 3: Uuringus kasutatud andmestikus sisalduvate CpG-de arv kromosoomide kaupa.

CpG-d: genoomis <sup>a</sup>	andmestikus	kaetus	CpG-d: genoomis	andmestikus	kaetus		
chr1	2374437	180637	7,61%	chr13	842469	50662	6,01%
chr2	2191971	148174	6,76%	chr14	895881	66155	7,38%
chr3	1672819	102180	6,11%	chr15	906026	62914	6,94%
chr4	1502927	88837	5,91%	chr16	1150022	104957	9,13%
chr5	1566005	98815	6,31%	chr17	1248328	117628	9,42%
chr6	1511189	90624	6,00%	chr18	755454	45054	5,96%
chr7	1622254	116476	7,18%	chr19	1105620	131414	11,89%
chr8	1338200	87941	6,57%	chr20	773477	64450	8,33%
chr9	1255026	94178	7,50%	chr21	462299	32487	7,03%
chr10	1388446	100638	7,25%	chr22	634646	59528	9,38%
chr11	1333114	104404	7,83%	chrX	1321978	34733	2,63%
chr12	1315106	92606	7,04%	chrY	225181	3792	1,68%

<sup>a</sup> Genoomi versioon hg38/GRCh38.

Tabelist 3 on näha, et andmed on olemas ühtlaselt kõigi kromosoomide jaoks, erandiks on sugukromosoomid. Geenitihedad kromosoomid on kaetud paremini – nt. kromosoomide 19 ja 17 puhul on määratud metülatsioonitase vastavalt 11,9%-le ja 9,4%-le kõigist CpG-dest.

### 2.3.2 Metülatsioonitase genoomi eri elementides

Metülatsioonitaseme kirjeldamiseks genoomi eri elementides on toodud siin tabel 4 ja joonised 4 ja 5. Tabelis 4 on esitatud iga proovi jaoks eraldi kindlasse genoomi konteksti kuuluvate CpG-de metülatsioonitasemete keskmised väärtused. Lisaks on iga CpG positsiooni jaoks arvatud selle metülatsioonitase keskmine üle kõigi proovide ning selliselt saadud väärtuste keskmised on toodud tabeli 4 esimeses tulbas. CpG-de keskmise metülatsiooni paremaks esitamiseks on joonisel 4 näidatud nende väärtuste jaotust, jällegi iga genoomi elemendi jaoks eraldi.

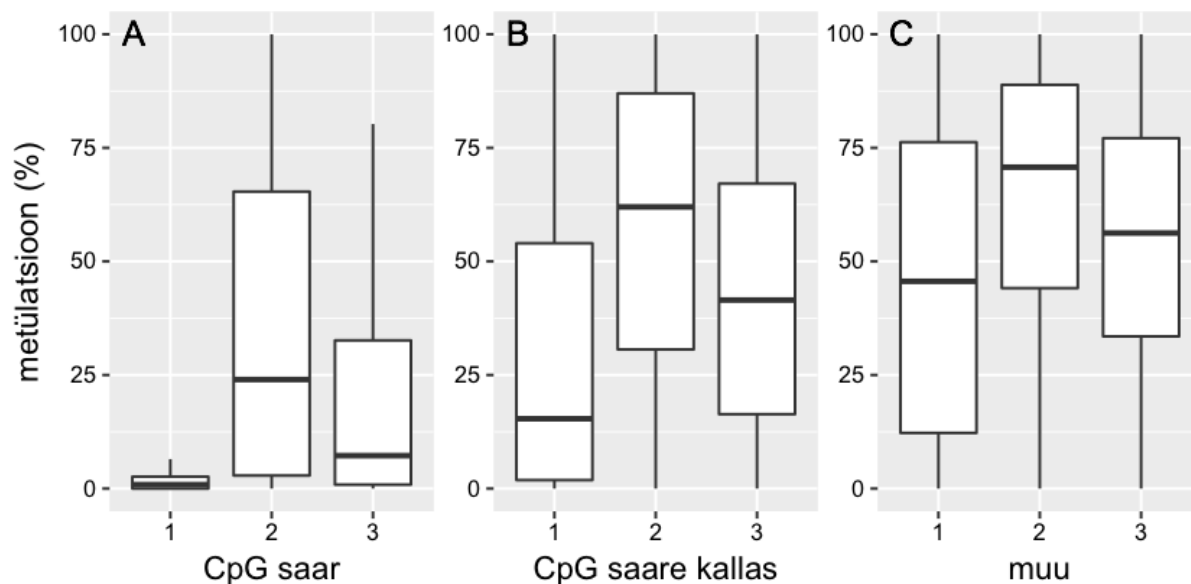
Ootuspäraselt on kõige madalama metülatsioonitasemega geenide promootoralades paiknevad CpG saared – CpG-de keskmise metülatsiooni mediaan on 0,9% (joonis 4). Promootoralast väljaspool paiknevad CpG saared on aga enam metüleeritud – geenikeha CpG-de metülatsiooni mediaaniks on 24,0%, intergeense ala saarte jaoks 7,3%. CpG saarte kaldaid iseloomustab kõrgem metülatsioonitase, mis siiski on madalam võrreldes positsioonidega, mis asuvad CpG saartes ja kallastest väljaspool. Kõige kõrgem on metülatsioon geenikehades – mediaan 70,8%, geenide vahelises alas on see väärtus 56,3%.

Tabel 4: Keskmise metülatsioonitase (%) genoomi eri elementides.

genoomi element <sup>a</sup>	keskmise	OSA1	OSA2	OSA3	OSA4	SPA1	SPA2	MNA1	MNA2 <sup>b</sup>
CpG saar	11,66	13,66	11,25	11,98	10,61	12,63	12,54	9,83	10,81
promootoralas	5,58	7,14	5,27	5,92	4,72	6,34	6,29	4,25	4,68
geenikehas	35,54	38,28	34,71	35,62	34,23	36,78	36,74	32,66	35,27
intergeenses alas	19,91	24,07	19,36	20,36	17,68	22,00	21,59	15,72	18,46
CpG saare kallas	40,06	41,57	39,62	39,70	39,46	40,88	40,52	38,26	40,43
promootoralas	29,49	30,53	28,88	29,48	28,79	30,03	30,05	28,47	29,66
geenikehas	57,28	58,91	57,02	56,46	57,05	58,13	57,60	55,08	58,00
intergeenses alas	42,78	45,81	42,64	42,15	41,78	44,60	43,22	38,93	43,13
muu	59,65	60,79	59,06	58,47	58,96	60,49	58,64	59,07	61,71
promootorala	45,45	46,81	44,93	44,88	44,86	46,33	45,16	44,21	46,43
geenikeha	64,53	65,18	63,74	63,39	63,87	64,91	63,67	64,76	66,72
intergeenne ala	54,49	56,24	54,17	53,21	53,76	55,91	53,24	52,92	56,46
kõik CpG-d	39,79	41,28	39,28	39,25	38,98	40,67	39,64	38,60	40,58

<sup>a</sup> CpG saarte asukohad on määratud UCSC genoomibrauseris (<https://genome.ucsc.edu>) kasutatavate asukoordinaate abil. CpG saare kallas on defineeritud 2 kb pikkuse alana mõlemal pool CpG saart. Viimasena on leitud CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool asuvate CpG-de metülatsioonitase.

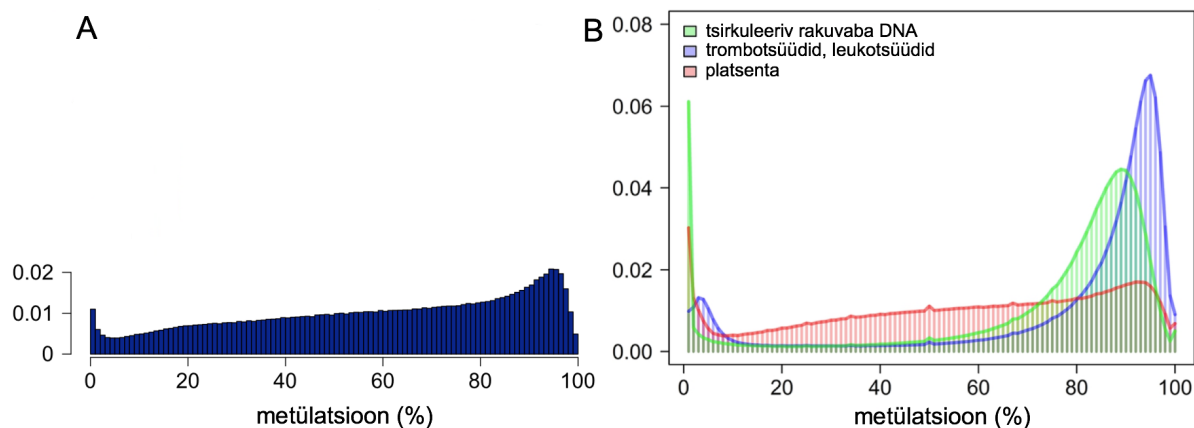
<sup>b</sup> OSA - omal soovil abort, 1. trimester; MNA - meditsiiniliselt näidustatud abort, 2. trimester; SPA - korduv spontaanabort.



1. promootoralas 2. geenikehas 3. intergeenses alas

**Joonis 4. CpG-de metülatsioonitaseme jaotus sõltuvalt genoomsest kontekstist.** CpG saarte asukohad on määratud UCSC genoomibrauseris (<https://genome.ucsc.edu>) kasutatavate asukohakoordinaate abil, kaldad on defineeritud 2 kb pikkuste aladena mõlemal pool CpG saart. Joonise C-osa näitab metülatsiooni jaotust CpG-dele, mis asuvad CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool.

Kõikide CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool asuvate CpG-de metülatsiooniväärtuse jaotust on lisaks näidatud veel joonise 5 A-osas. St. esitatatud tihedusfunktsioon on koostatud kõigi joonise 4 C-osa CpG-de põhjal eristamata kuulumist geeni promootoralasse või geenikehasse. Nende CpG positsioonide metülatsioonitaseme jaotuse esiletõstmise põhjuseks on asjaolu, et tulemus on sarnane tihedusfunktsioonile, mis saadi WGBS (ingl. k. *whole-genome bisulfite sequencing*, eesti k. ülegenoomne bisulfitsekveneerimine) tehnoloogiaga genereeritud 1. trimestri kohta käiva andmestiku põhjal uuringus (Jensen *et al.*, 2015) (WGBS abil on võimalik määrata CpG-de metülatsioonitase peaaegu kogu genoomis). See sarnasus kinnitab, et käesolevas uuringus kasutada olevas metülatsiooniandmestikus ei ole madalama ega kõrgema metülatsioonitasemega piirkonnad ülesindatud. St. DNA raamatukogu, millele bisulfitsekveneerimist rakendati, sisaldas tõepoolest genoomi CpG-tihedamaid piirkondi ning selle koostamisel ei sõltunud fragmentide selekteerimine fragmentide metülatsioonitasemest. RRBS tehnoloogia katab genoomist ainult väikese osa - 7,3% (tabel 2) ning teadmine, et see osa on valitud metülatsioonist sõltumatult, on eelduseks sellele, et tabelis 3 toodud väärtused tõepoolest kirjeldaksid platsenta genoomi tegelikku metülatsioonitaset.



**Joonis 5. Platsenta genoomi CpG nukleotiidide metülatsioonitaseme unikaalne jaotuskõver.** A-osas on esitatud käesolevas töös analüüsitud metülatsioonandmestiku põhjal saadud tihedusfunktsioon. Graafikust on jäetud välja CpG saartes ja kalda piirkondades asuvad CpG-d, sest on antud andmestikus ülesindatud ning on hüpometüleeritud võrreldes genoomi muude CpG positsioonidega. B-osas on toodud artiklis (Jensen *et al.*, 2015) avaldatud platsenta genoomi CpG-de metülatsiooni tihedusfunktsioon võrreldes vere leukotsüütide, trombotsüütide genoomi ja rakuvaba DNA metülatsiooni andmetega. Viidatud uuringus kasutati metülatsiooni määramiseks WGBS tehnoloogiat (ingl. k. *whole-genome bisulfite sequencing*, eesti k. ülegenoomne bisulfitsekveneerimine).

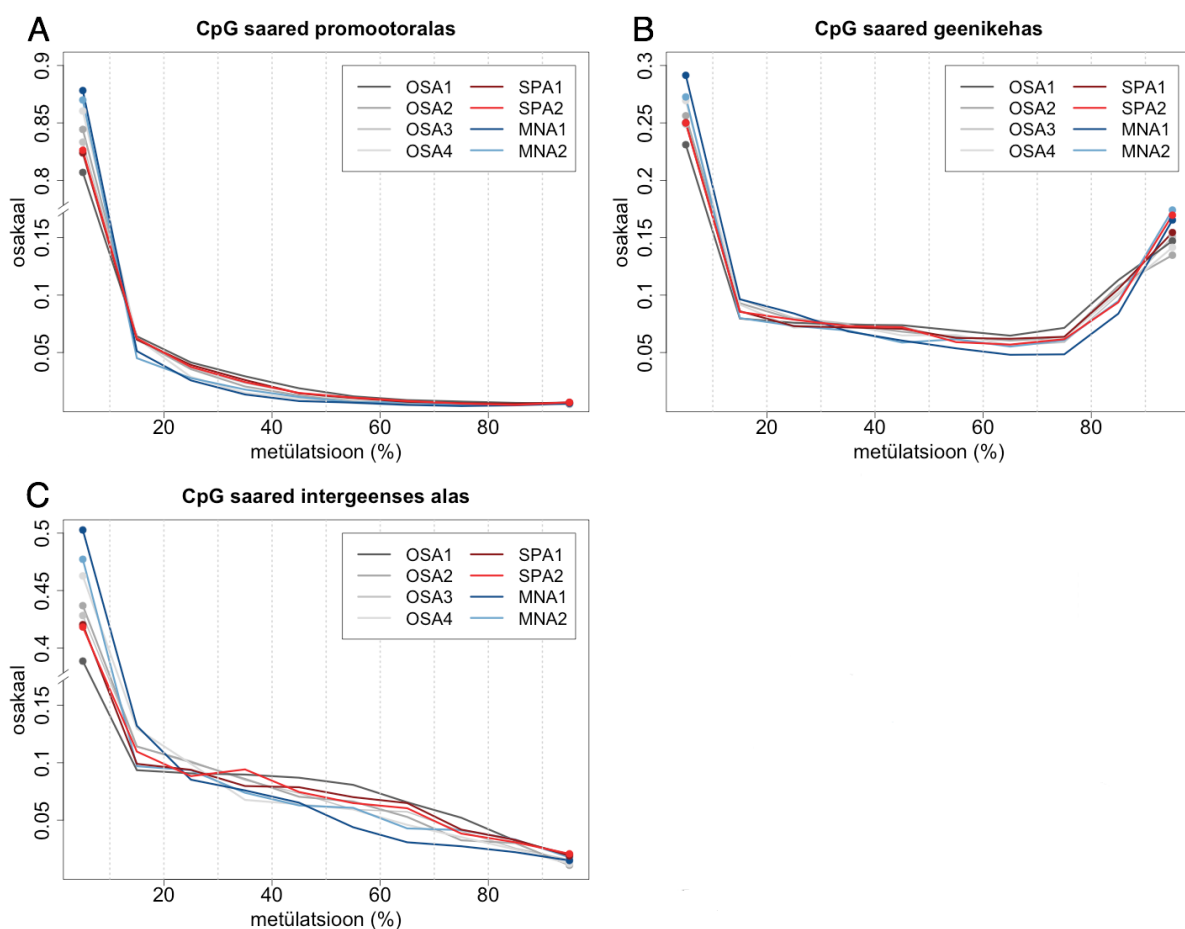
Joonis 5 illustreerib ka seda, mis on juba varasemalt teada – platsenta genoom on teiste inimese kudede võrreldes vähem metüleeritud. CpG positsioonide metülatsioon on ühtlase jaotusega, samal ajal kui tüüpiline oleks kõrgema metülatsioonitasemega CpG-de ülekaal (joonis 5, B-osa).

### 2.3.3 Metülatsioonitase CpG saartes

Ainuüksi keskmiseid väärtuseid võrreldes oli eelmises jaotises näha, et CpG saared on metüleeritud erinevalt sõltuvalt sellest, kus saar geeni suhtes paikneb. See annab alust arvata, et kolme eri rühma kuuluvad CpG saared osalevad ka rakuliste protsesside regulatsioonis erinevalt. Seepärast oli huvipakkuv vaadata CpG saarte metülatsiooni jaotust täpsemalt. Joonisel 6 on esitatud saarte keskmise metülatsioonitaseme jaotused kõikide proovide jaoks eraldi. Kujutatud ei ole üksikute CpG-de metülatsiooni jaotust, vaid iga saare jaoks on leitud sinna kuuluvate CpG-de metülatsiooni keskmine. Välja on jäetud saared, mille kohta oli andmestikus vähem kui 5 andmepunkti.

Uuesti on näha metülatsiooni puudumist promotoraal CpG saartes – kõikides proovides jääb vähemalt 87,1%-l saartest metülatsioonitase alla 20% (joonis 6, A-osa). Kõige madalam on promotoraal CpG saarte metülatsioonitase 2. trimestri platsentakoes – proovis MNA1 on 92,9 %-l ja proovis MNA2 on 91,5 %-l saartest metülatsiooni keskmine alla 20%. Geenide vahelises alas paiknevate saarte metülatsiooni jaotuse joonis erineb selle poolest, et

olemas on vahepealse metülatsioonitasemega saarte fraktsioon – kõigis proovides on vähemalt 32,8% saari, mille keskmine metülatsioon jääb vahemikku 20%-80% (joonis 6, C-osa). Kõrgelt metüleeritud saari, metülatsiooni keskmisega üle 80%, on kõigis proovides alla 5,3%. Seevastu geenikehas paiknevate saarte hulgas on kõrgelt metüleeritud saari enam, kõigis proovides vähemalt 24,2% ning saarte metülatsiooni keskmine omab bimodaalset jaotust (joonis 6, B-osa).



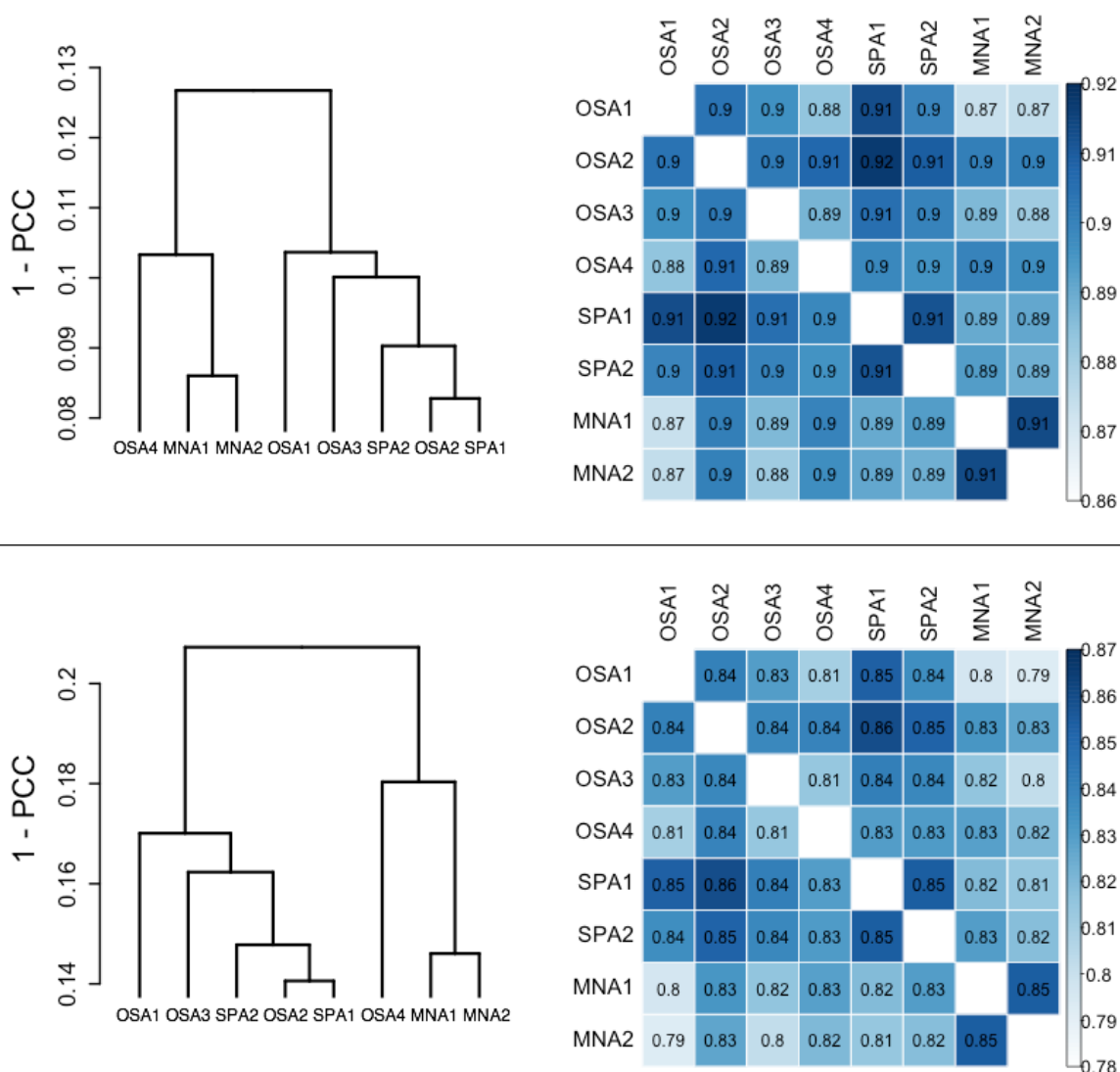
**Joonis 6. CpG saarte keskmise metülatsioonitaseme jaotus.** OSA - omal soovil abort, 1. trimester; MNA - meditsiiniliselt näidustatud abort, 2. trimester; SPA - korduv spontaanabort.

### 2.3.4 Korrelatsioon ja klasterdamine

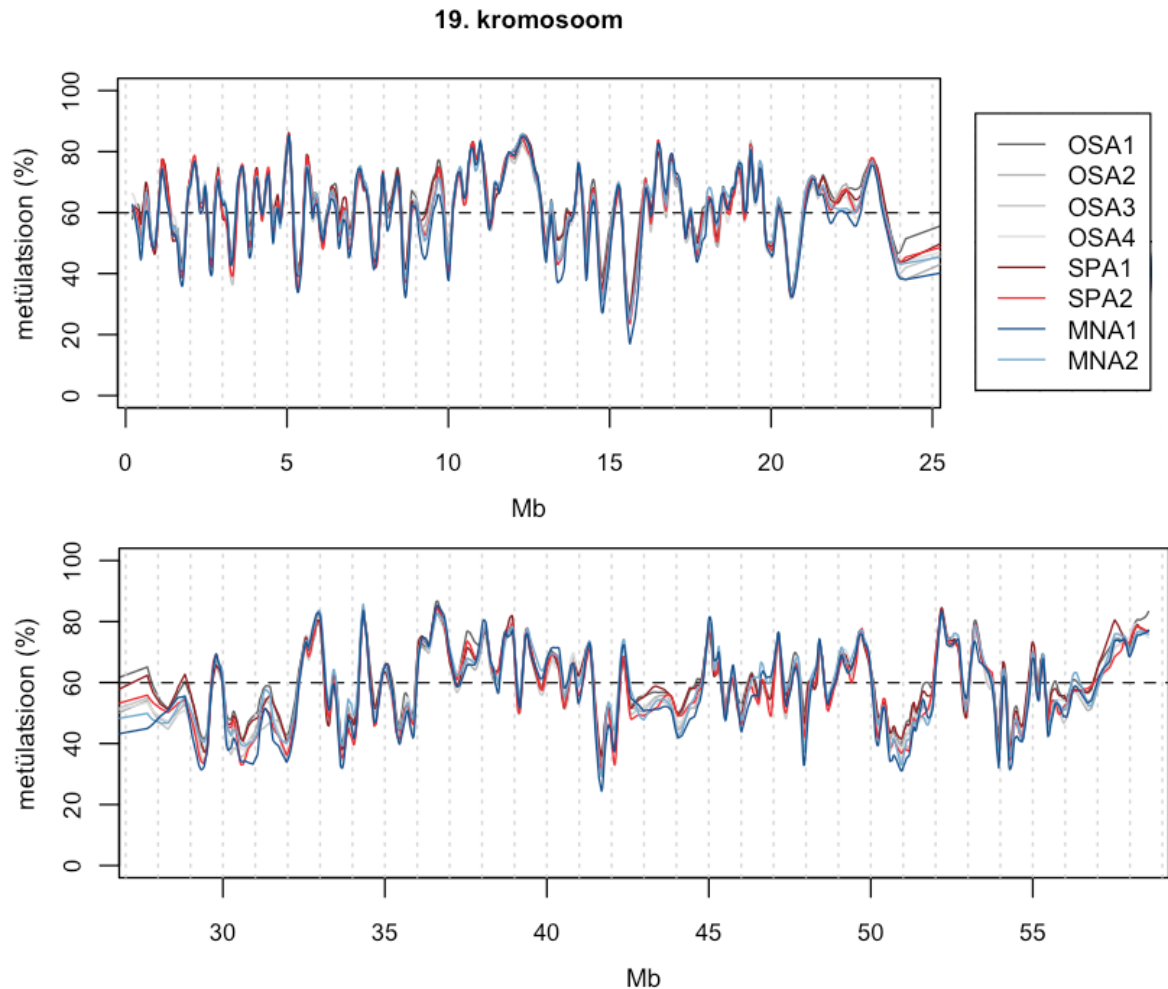
Hindamaks väga üldisel tasemel kõigi 8 platsentakoe proovi metülatsiooni sarnasust arvutasin üksikute CpG-de metülatsioonitasemete põhjal proovidele paarikaupa Pearsoni korrelatsiooni koefitsendi (PCC) (joonis 7). Arvutused on tehtud kogu andmestiku jaoks ning lisaks ka jättes välja CpG saartesse kuuluvad andmepunktid – on teada, et CpG saared on vähem varieeruvad ning kuna andmestikus on need piirkonnad üleesindatud, siis võis arvata, et see võiks tulemusi moonutada. Kasutades väärtust (PCC-1) proovide vahelise kaugusena

rakendasin hierarhilist klasterdamist, algoritmiks täieliku seose meetod (ingl. k *complete-linkage*) ning saadud tulemus on esitatud samuti joonisel 7.

CpG saarte välja jätmine langetas PCC väärtuseid, kuid klasterdamise tulemus jäi samaks. Proovidest moodustuvad grupid gestatsiooniaja põhjal – 1. trimestri ja spontaanabordi juhtude proovid, va. proov OSA4, moodustavad ühe rühma ning 2. trimestri proovid on kõige sarnasemad omavahel. OSA4, mis oli 1. trimestri proovidest kõige hilisema gestatsiooniajaga (76 pv.) on PCC põhjal sarnasem 2. trimestri proovidega. Spontaanabordi juhtude proovid omaette rühma ei moodusta.



**Joonis 7. Platsentakoe proovide metülatsiooni sarnasus Pearsoni korrelatsiooni põhjal.** Ülemisel paneelil on esitatud kogu andmestiku põhjal leitud korrelatsiooni koefitsendid, alumisel paneelil on analüüsi korratud jättes välja CpG saartesse kuuluvad CpG-d. PCC – Pearsoni korrelatsiooni koefitsent; OSA – omal soovil abort, 1. trimester; MNA – meditsiiniliselt näidustatud abort, 2. trimester; SPA – korduv spontaanabort.



**Joonis 8. Metülatsioonitase 19. kromosoomis.** Kõikide proovide jaoks on leitud 20 kb pikkuste genomilõikude kaupa sinnakuuluvate CpG-de metülatsioonitaseme keskmine, saadud väärtustele on rakendatud keele R lokaalse regressiooni meetodit loess. Et oleks võimalik vaadelda ka PMD alade piire, on andmestikust kasutatud ainult positsioone, mis jäävad CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspoole (neisse kuuluvad positsioonid on andmestikus ülesindatud ning nende kaasamine näitaks keskmisest mivadalamat taset ka PMD aladest väljaspool). Sirge katkendjoon tähistab kõikide kasutatud CpG-de metülatsiooni keskmist. OSA – omal soovil abort, 1. trimester; MNA – meditsiiniliselt näidustatud abort, 2. trimester; SPA – korduv spontaanabort.

Korrelatsiooni väärtuste põhjal saab järeldada, et metülatsioon on kõigi 8 proovi võrdluses suhteliselt stabiilne. Selle illustreerimiseks on toodud siin joonis 8, kus on näidatud 19. kromosoomi jaoks metülatsioonitase kõikides proovides. Ka osaliselt metüleeritud alade (PMD) piirid näivad suures osas kattuvat. Käesoleva töö raames siiski PMD alade piire määratud ei ole ning seega ei ole ka võimalik arvuliselt väljendada PMD alade kattuvust eri proovides.

### 2.3.5 Indiviidide vahelise varieeruvuse hindamine

Differentsiaalse metülatsioon analüüsiks on käesolevas töös kasutatud DSS nime all publitseeritud statistilist meetodit (Feng *et al.*, 2014). Meetodi autorite hinnangul on see rakendatav statistiliselt oluliste tulemuste leidmiseks ka juhtudel, kus võrreldavad grupid on väikesed. Käesoleva uuringus see ka nii on – 1. ja 2. trimestri ja spontaanabordi juhtudest moodustuvate gruppide suurusteks on vastavalt 4 ja kahel viimasel juhul 2. Enne meetodi kasutamist pidasin siiski vajalikuks hinnata empiirilisel, kui suur osa gruppide vaheliste erinevustena saadavatest tulemustest võivad ikkagi olla tingitud indiviidide vahelisest varieeruvusest ja mitte olla seotud gestatsiooniaja muutusega või spontaanabordi toimumisega.

Mõlema võrdluse jaoks, st. 1. vs. 2. trimester (OSA vs. MNA) ja 1. trimester vs. spontaanabordi juhtude grupp (OSA vs. SPA), oli kasutada 6 platsentakoe proovi andmed. Rakendasin DSS meetodit kõikvõimalikele 6-st proovist moodustuvatele 4 ja 2 proovi suurustele gruppidele, muutes seejuures statistilise testimise p-väärtuse ja metülatsioonitaseme erinevuse tingimusi. Gruppide vahelistes võrdlustes tulemusena saadud differentsiaalse metülatsiooniga piirkondade (DMR) arv on toodud tabelites 5 ja 6 ning differentsiaalse metülatsiooniga CpG-de arv on toodud lisas 1.

1. ja 2. trimestri võrdluste puhul andsid kõige enam erinevusi kombinatsioonid, kus testitud gruppide proovid olid lähedase gestatsiooniajaga (proovide OSA1 ja OSA2 gestatsiooniaeg on kõige lühem, proovil OSA4 kõige pikem). Viie kõige enam erinevusi andnud kombinatsiooni hulgas on siiski üks juht, kus suur erinevuste arv ei ole gestatsiooniajaga seletatav - tabeli 5 2. rida, kus 2-ne grupp moodustus proovidest OSA1 ja OSA3. Samas osa selle võrdluse juures saadud metülatsiooni erinevustega CpG-dest paiknevad võrdlusest OSA vs. MNA saadud tulemustega samades piirkondades. Nt. kasutades DSS-meetodit tingimustel  $p\text{-väärtus}=0,01$  ja metülatsiooni erinevus  $>0\%$  (tabeli 5 eelviimane veerg, neid tingimusi kasutati ka edaspidises analüüsis) andis võrdlus OSA vs. MNA 698 DMR ala, võrdlus OSA1 ja OSA3 vs. ülejäänud 452 DMR ala, millest omakorda 89 ala kattusid mõnega võrdluses OSA vs. MNA saadud DMR alaga. Seega kokkuvõttes, võrdlus 1. vs. 2. trimester andis valitud statistilise testimise tingimustel ligi 2 korda rohkem erinevusi kui kõik ülejäänud kombinatsioonid. Sellega on vaja arvestada järgnevas jaotises esitatud differentsiaalse metülatsiooni analüüsis saadud tulemuste kasutamisel.

Tabel 5: Differentiaalselt metüleeritud alade arv DSS-meetodi rakendamisel 1. ja 2. trimestri proovidest moodustuvatele gruppidele.

met. erinevus p-väärtus	$\geq 20\%$				$\geq 10\%$				$\geq 5\%$				$> 0\%$			
	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$
MNA1, MNA2	2	4	28	84	9	34	136	742	23	66	437	2768	39	118	698	3298
OSA1, OSA3	0	0	2	50	1	4	85	573	2	25	302	2236	8	66	452	2440
OSA4, MNA1	0	0	0	11	0	0	23	249	0	4	121	1207	1	21	204	1327
OSA1, OSA2	0	0	2	16	0	1	22	222	2	7	100	1130	2	14	164	1221
OSA4, MNA2	0	0	1	8	0	2	12	125	1	7	49	756	2	9	88	838
OSA1, OSA4	0	2	7	14	2	7	21	108	4	10	51	576	5	17	67	589
OSA2, MNA2	0	0	2	11	0	2	16	90	2	6	43	480	2	9	67	556
OSA3, MNA1	0	0	0	6	0	0	10	94	0	2	46	534	0	9	67	541
OSA2, OSA3	0	0	1	10	0	1	15	99	0	5	48	496	2	10	66	539
OSA1, MNA2	0	0	0	0	0	0	2	82	0	0	36	536	0	1	53	546
OSA3, MNA2	0	0	4	9	1	5	13	75	4	7	35	443	5	7	53	467
OSA2, MNA1	0	0	0	5	0	0	8	85	0	3	28	422	1	5	49	471
OSA2, OSA4	0	0	0	2	0	0	5	66	0	1	27	397	0	4	46	413
OSA1, MNA1	0	0	1	6	0	1	8	44	1	3	26	289	1	6	44	301
OSA3, OSA4	0	0	0	2	0	0	3	52	0	2	21	325	1	2	35	310

Märkus. Meetodit rakendati kõikvõimalikele kuuest proovist moodustuvatele 2 ja 4 proovi suurustele gruppidele. Esitatud on statistilise testimise tulemustena saadud differentiaalselt metüleeritud alade arv. Testimisel muudeti p-väärtuse ja metülatsiooni erinevuse (null-hüpoteesi testimisel kasutatud tingimus, kui palju peavad jaotuste keskmised väärtused erinema) tingimusi. Esimeses veerus on toodud testimise 2-se grupi proovid - võrreldi neid proove ülejäänutega. OSA - omal soovil abort, 1. trimester; MNA - meditsiiniliselt näidustatud abort, 2. trimester; SPA - korduv spontaanabort.

Tabel 6: Differentiaalselt metüleeritud alade arv DSS-meetodi rakendamisel 1. trimestri ja spontaanabordi juhtude proovidest moodustatud gruppidele.

met. erinevus p-väärtus	$\geq 20\%$				$\geq 10\%$				$\geq 5\%$				$> 0\%$			
	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-2}$
OSA2, OSA4	0	0	3	17	1	4	27	239	3	11	108	1113	6	23	204	1297
OSA1, SPA1	0	0	2	12	0	3	19	184	2	11	89	959	3	21	157	1126
OSA3, SPA2	0	1	2	14	1	3	15	112	1	8	60	520	5	12	103	614
OSA3, OSA4	0	0	0	12	0	0	17	111	0	4	47	543	1	9	83	587
OSA1, SPA2	0	0	2	8	0	1	14	96	0	6	43	516	1	11	73	561
OSA4, SPA2	0	0	0	4	0	0	6	96	0	2	44	564	0	6	73	597
SPA1, SPA2	1	1	1	7	1	2	9	87	1	5	45	451	3	7	71	509
OSA2, OSA3	1	2	4	11	2	5	12	87	3	10	41	381	6	11	66	459
OSA3, SPA1	0	0	3	10	1	3	15	87	1	7	46	347	4	12	66	369
OSA1, OSA3	0	0	0	6	0	0	8	91	0	3	38	532	0	6	62	552
OSA2, SPA2	0	0	2	3	1	2	4	65	1	2	34	354	2	2	55	459
OSA1, OSA4	0	0	2	12	0	4	16	70	3	11	37	340	5	13	51	345
OSA2, SPA1	0	0	1	6	0	1	10	45	1	5	21	273	2	8	36	276
OSA4, SPA1	0	0	3	7	0	3	10	48	1	8	22	325	3	9	35	350
OSA1, OSA2	0	0	1	2	0	1	5	46	1	2	17	253	1	4	26	241

Märkus. Meetodit rakendati kõikvõimalikele kuuest proovist moodustuvatele 2 ja 4 proovi suurustele gruppidele. Esitatud on statistilise testimise tulemustena saadud differentiaalselt metüleeritud alade arv. Testimisel muudeti p-väärtuse ja metülatsiooni erinevuse (null-hüpooteesi testimisel kasutatud tingimus, kui palju peavad jaotuste keskmised väärtused erinema) tingimusi. Esimeses veerus on toodud testimise 2-se grupi proovid - võrreldi neid proove ülejäänutega. OSA - omal soovil abort, 1. trimester; SPA - korduv spontaanabort.

1. trimestri ja spontaanabordi juhtude proovidest moodustatud gruppide puhul andis kõige enam erinevusi võrdlus OSA2 ja OSA4 vs. ülejäänud ja võrdlus OSA vs. SPA oli alles 7. kohal (tabel 6). Seega tuleb järgnevalt jaotises 2.3.7 esitatavatesse spontaanabordi juhtudes leitud erinevustesse metülatsioonis suhtuda ettevaatlikkusega, kuna muutused metülatsioonitasemes võivad tuleneda gestatsiooniaja erineemisest või indiviidide vahelisest varieeruvusest.

### 2.3.6 Differentiaalne metülatsioon 1. ja 2. trimestri võrdluses

Differentiaalse metülatsiooni analüüsiks rakendasin DSS-meetodit (Feng *et al.*, 2014) tingimustel: p-väärtus=0,01, metülatsiooni erinevus  $\Delta > 0\%$ . Seega CpG loetakse p-väärtuse 0,01 juures kahe grupi võrdluses differentiaalselt metüleerituks kuitahes väikese metülatsioonitaseme erinevuse korral, st. nõuet, et vahe peaks teatud väärtusest suurem olema, kasutatud ei ole. DMR alade leidmiseks grupeeritakse lähestikku asuvad differentiaalse metülatsiooniga CpG – DMR ala peab sisaldama vähemalt kolme sellist positsiooni ning selles piirkonnas peab neid olema rohkem kui 50%.

Tabel 7: Differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-de ja DMR alade arv 1. ja 2. trimestri võrdluses.

genoomi element <sup>a</sup>	differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-d <sup>b</sup>			differenttsiaalse metülatsiooniga alad <sup>c</sup>		
	kokku	met. tõus	met. langus <sup>d</sup>	kokku	met. tõus	met. langus <sup>d</sup>
CpG saar	10575 (13,8%)	1923	8652	233 (23,5%)	64	169
promootoralas	5240 (6,8%)	648	4592	102 (10,3%)	19	83
geenikehas	3423 (4,5%)	1053	2370	92 (9,3%)	42	50
intergeenses alas	1912 (2,5%)	222	1690	39 (3,9%)	3	36
CpG saare kallas	8311 (10,9%)	3615	4696	101 (10,1%)	55	46
promootoralas	3994 (5,2%)	1924	2070	46 (4,6%)	31	15
geenikehas	2817 (3,7%)	1201	1616	39 (3,9%)	19	20
intergeenses alas	1500 (2,0%)	490	1010	16 (1,6%)	5	11
muu	58087 (75,4%)	36249	21838	657 (66,3%)	528	129
promootorala	1380 (1,8%)	726	654	28 (2,8%)	20	8
geenikeha	30659 (39,8%)	20932	9727	399 (40,3%)	338	61
intergeenne ala	26048 (33,8%)	14591	11457	230 (23,2%)	170	60
kokku	76973	41787	35186	991	647	344

<sup>a</sup> CpG saarte asukohad on määratud UCSC genoomibrauseris (<https://genome.ucsc.edu>) kasutatavate asukohakoordinaate abil. CpG saare kallas on defineeritud 2 kb pikkuse alana mõlemal pool CpG saart. Viimase grupi moodustavad kõik CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool asuvad CpG-d.

<sup>b</sup> p-väärtus=0,01, met. erinevus > 0%.

<sup>c</sup> Differenttsiaalse metülatsiooniga ala on defineeritud kui vähemalt 3 differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-d sisaldav piirkond, kus selliseid positsioone on rohkem kui 50%.

<sup>d</sup> Metülatsiooni tõus ja langus 2. trimestri proovides võrrelduna 1. trimestri grupiga.

1. ja 2. trimestri proovide võrdluses tulemustena saadud differenttsiaalselt metüleeritud CpG-de ja DMR alade arv on toodud tabelis 7. Eristatud on, kas tegemist oli metülatsiooni tõusu või langusega ning näidatud on ka CpG-de ja DMR alade jaotumine genoomi eri elementide vahel. Differenttsiaalse metülatsiooniga positsioone oli 76 973 ja DMR alade arv oli 991. Erinevus eelmises jaotises saadud tulemustest (tabel 5, lisa 1) on tingitud sellest, et eri kombinatsioonide võrdlemisel kasutasin andmestikku CpG positsioonidega, mille jaoks oli metülatsioon määratud kõigis 6 proovis. Siin olid analüüsi kaasatud lisaks ka kirjed, mille puhul oli ühes või kahes 1. trimestri proovis CpG metülatsioonitase teadmata. Enamik differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-dest paiknevad CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool – üksikute CpGde võrdluses oli selliseid positsioone 75,4% ja DMR alade puhul 66,3%. Eristades tulemusi metülatsiooni muutuse suuna järgi on ülekaalus metülatsiooni tõusuga CpG-d. Kuid CpG saarte puhul on muutuse suund vastupidine – üksikute positsioonide puhul oli 81,8% tulemustes olnud CpG-dest metülatsiooni langusega, DMR alade puhul oli vastav protsent 72,5%.

Edasises analüüsis keskendusin DMR aladele. Leitud 991 ala olid ülekattes 555 geeniga. Saadud geenide nimekirja esmaseks tõlgendamiseks viisin läbi funktsionaalse rikastusanalüüsi tarkvaraga g:Profiler (Reimand *et al.*, 2016). Statistiliselt oluline rikastus leiti 53 GO ontoloogia (<http://geneontology.org/>) kategooria suhtes, lisaks üksikud vasted teistest andmebaasidest. Valik tulemustes olnud kategooriatest on toodud tabelis 8 ning kogu programmi väljund on esitatud lisas 2. Nimekirjas on ülekaalus küllaltki üldised organismi arengulisi protsesse hõlmavad kategooriad, sh. on suur osa vastetest seotud närvisüsteemi arenguga. Lisaks näitab analüüs rikastatust rakkude liikumisega, signalisatsiooniga ning transkriptsiooni regulatsiooniga seotud kategooriate suhtes.

Tabel 8: Olulisemad tulemused funktsionaalsest rikastusanalüüsist, mida rakendati 1. ja 2. trimestri võrdluses differentsiaalset metülatsiooni omanud piirkondi sisaldanud geenidele.<sup>a</sup>

korrigeeritud p-väärtus	geenide arv <sup>b</sup>	GO ontoloogia termin <sup>c</sup>
1,72·10 <sup>-5</sup>	191	anatomilise struktuuri areng (ingl. k. <i>anatomical structure development</i> )
4,63·10 <sup>-8</sup>	121	anatomilise struktuuri morfogenees (ingl. k. <i>anatomical structure morphogenesis</i> )
1,05·10 <sup>-5</sup>	177	mitmerakulise organismi areng (ingl. k. <i>multicellular organism development</i> )
3,01·10 <sup>-2</sup>	111	looma organi areng (ingl. k. <i>animal organ development</i> )
1,70·10 <sup>-6</sup>	156	raku arenguline protsess (ingl. k. <i>cellular developmental process</i> )
8,28·10 <sup>-4</sup>	70	rakulise komponendi morfogenees (ingl. k. <i>cellular component morphogenesis</i> )
5,97·10 <sup>-4</sup>	68	raku morfogenees (ingl. k. <i>cell morphogenesis</i> )
4,66·10 <sup>-6</sup>	146	raku differentseerumine (ingl. k. <i>cell differentiation</i> )
4,52·10 <sup>-5</sup>	101	närvisüsteemi areng (ingl. k. <i>nervous system development</i> )
4,28·10 <sup>-7</sup>	85	neurogenees (ingl. k. <i>neurogenesis</i> )
4,67·10 <sup>-4</sup>	48	neuroni projektsiooni morfogenees (ingl. k. <i>neuron projection morphogenesis</i> )
9,43·10 <sup>-6</sup>	85	liikumine (ingl. k. <i>locomotion</i> )
2,97·10 <sup>-4</sup>	48	kemotaksis (ingl. k. <i>chemotaxis</i> )
2,04·10 <sup>-5</sup>	88	raku või subtsellulaarse komponendi liikumine (ingl. k. <i>movement of cell or subcellular component</i> )
1,22·10 <sup>-2</sup>	55	transkriptsiooni negatiivne regulatsioon (ingl. k. <i>negative regulation of transcription, DNA-templated</i> )
4,37·10 <sup>-2</sup>	72	transkriptsiooni regulatsioon RNA polümeraas II promootorilt (ingl. k. <i>regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i> )
2,13·10 <sup>-2</sup>	108	signalisatsiooni regulatsioon (ingl. k. <i>regulation of signaling</i> )
2,50·10 <sup>-2</sup>	103	rakupinna retseptori signalisatsioonirada (ingl. k. <i>cell surface receptor signaling pathway</i> )
2,06·10 <sup>-2</sup>	15	cAMP signalisatsioonirada (ingl. k. <i>cAMP signaling pathway</i> ) <sup>b</sup>
2,83·10 <sup>-2</sup>	12	Wnt signalisatsioonirada (ingl. k. <i>Wnt signaling pathway</i> ) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Täielik nimekiri rikastusanalüüsi tulemustega on esitatud lisas 2.

<sup>b</sup> Geenide arv analüüsitava geenide nimekirjas, mis kuuluvad ontoloogia kategooriasse.

<sup>c</sup> Kategooriad pärinevad KEGG andmebaasist (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Sama analüüsi kordamine eraldi geenide jaoks, mille puhul metülatsioon oli kas tõusnud või langenud, lisainformatsiooni ei andnud. Mõlemal juhul jäid tulemustesse funktsionaalselt sarnased kategooriad, samas väiksem geenide hulk mõne muu, esialgses nimekirjas mitteesinenud bioloogilise protsessi suhtes rikastatud ei olnud. Küll aga osutusid huvipakkuvaks alamosaks algsest nimekirjast geenid, mille jaoks oli metülatsiooni muutus olnud promootorala CpG saares, täpsemalt need juhud, kus oli metülatsioonitase 2. trimestris madalam. Sellised geene oli 72 ning need oli rikastatud 43 GO kategooria suhtes (lisa 2). Nende hulgas olid taas arenguliste protsessidega seotud kategooriad, lisandunud olid aga biosünteesi ja selle regulatsiooniga seotud protsessid, näited: lämmastikalust sisaldava ühendi biosüntees (ingl. k. *nucleobase-containing compound biosynthetic process*), rakulise biosünteesi regulatsioon (ingl. k. *regulation of cellular biosynthetic process*). Samuti omas see lühem geenide nimekiri rikastatust valgu molekulaarset funktsiooni kirjeldavate GO kategooriate suhtes, mis kõik olid seotud valgu seondumisega DNA-le, näited: järjestusest sõltuv DNA-ga seondumine (ingl. k. *sequence-specific DNA binding*), seondumine DNA-ga transkriptsiooni regulaatoralas (ingl. k. *transcription regulatory region DNA binding*).

### **2.3.7 Differentsiaalne metülatsioon 1. trimestri ja spontaanabordi juhtude võrdluses**

1. trimestri normaalselt kulgenud raseduste ja korduva spontaanabordi juhtude proovidele rakendatud differentsiaalse metülatsiooni analüüsi ( $p=0,01$ , metülatsiooni erinevus  $\Delta > 0\%$ ) tulemused on esitatud tabelis 9. Differentsiaalse metülatsiooniga CpG-de arv oli 30035 ja DMR alade arv oli 87, mida on 1. ja 2. trimestri võrdluse tulemustest vastavalt ligi 3 ja 11 korda vähem. Seega lisaks sellele, et üksikute metülatsiooni erinevustega CpG-de arv oli väiksem, paiknesid need ka hajusamalt. Differentsiaalselt metüleeritud CpG-de hulgas oli jällegi kõige enam positsioone, mis paiknesid CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool – 76,8%, DMR alade puhul oli selliste piirkondade osakaal väiksem – 47,1%. DMR alade hulgas oli märkimisväärne hulk CpG saartega ülekattes olevaid piirkondi – 41,1% ning spontaanabordi juhtude proovides omasid enamus neist 1. trimestri proovidega võrreldes kõrgemat metülatsioonitaset.

Funktsionaalne rikastusanalüüs g:Profiler tarkvaraga siin tulemuste tõlgendamisel abiks ei olnud. Grupeerides geene sõltuvalt metülatsiooni muutuse suunast või muutusest mõjutatud geeni piirkonna järgi, sain küll üksikuid statistiliselt olulisi vasteid, kuid need ei selgitanud geenide omavahelist seotust.

Tabel 9: Differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-de ja DMR alade arv 1. trimestri normaalselt kulgenud raseduste ja korduva spontaanabordi juhtude võrdluses.

genoomi element <sup>a</sup>	differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-d <sup>b</sup>			differenttsiaalse metülatsiooniga alad <sup>c</sup>		
	kokku	met. tõus	met. langus <sup>d</sup>	kokku	met. tõus	met. langus <sup>d</sup>
CpG saar	4086 (13,6%)	3204	882	36 (41,4%)	30	6
promootoralas	1988 (6,6%)	1674	314	20 (23,0%)	17	3
geenikehas	1374 (4,6%)	974	400	10 (11,5%)	8	2
intergeenses alas	724 (2,4%)	556	168	6 (6,9%)	5	1
CpG saare kallas	2887 (9,6%)	1720	1167	10 (11,5%)	5	5
promootoralas	1265 (4,2%)	765	500	2 (2,3%)	0	2
geenikehas	1054 (3,5%)	592	462	6 (6,9%)	3	3
intergeenses alas	568 (1,9%)	363	205	2 (2,3%)	2	0
muu	23062 (76,8%)	12612	10450	41 (47,1%)	23	18
promootorala	519 (1,7%)	285	234	2 (2,3%)	1	1
geenikeha	11497 (38,3%)	6293	5204	22 (25,3%)	15	7
intergeenne ala	11046 (36,8%)	6034	5012	17 (19,5%)	7	10
kokku	30035	17536	12499	87	58	29

<sup>a</sup> CpG saarte asukohad on määratud UCSC genoomibrauseris (<https://genome.ucsc.edu>) kasutatavate asuko- hakoordinaate abil. CpG saare kallas on defineeritud 2 kb pikkuse alana mõlemal pool CpG saart. Viimase grupi moodustavad kõik CpG saarte ja kalda piirkondadest väljaspool asuvad CpG-d.

<sup>b</sup> p-väärtus=0,01, met. erinevus > 0%.

<sup>c</sup> Differenttsiaalse metülatsiooniga ala on defineeritud kui vähemalt 3 differenttsiaalse metülatsiooniga CpG-d sisaldav piirkond, kus selliseid positsioone on rohkem kui 50%.

<sup>d</sup> Metülatsiooni tõus ja langus spontaanabordi juhtude proovides võrrelduna 1. trimestri grupiga.

## 2.4 Arutelu

Et käesoleva töö põhieesmärgiks oli võrrelda 1. ja 2. trimestri platsentakoe metüloome ja korduva spontaanabordiga lõppenud raseduse platsentakoe metüloome, siis on siinkohal fookuses nendest võrdlustest saadud tulemused.

### 2.4.1 1. ja 2. trimestri platsentakoe metüloomide võrdlus

1. ja 2. trimestri proovide võrdluses tuvastati 76 973 differenttsiaalselt metüleeritud CpG-d, mis on ligi 3,8% kõigist testitud positsioonidest. Seega mõjutab gestatsiooniaeg raseduse esimeses pooles metülatsiooni väga väikese hulga CpG-de jaoks. Samas tuleb siinkohal mees pidada, et uuritud valim oli väike (vastavalt 4 ja 2 proovi) ning sekveneermisel oli keskmiseks sügavuseks 7-9 lugemit CpG kohta. Suurem valim ja sekveneermise sügavuse tõstmine võib differenttsiaalselt metüleeritud CpG-de osakaalu suurendada. Varasemalt on uuringutes keskendunud promootoraladele ja CpG saartele, kuid taas kinnitab ülegenoomse lähenemise kasutamine, et enamik muutustest leiab aset neist piirkondadest väljaspool (79,3% differenttsiaalselt metüleeritud positsioonidest ei kuulu ei

promootoralasse ega CpG saare koosseisu). Samas oli huvitav, et CpG saared eristusid ülejäänud piirkondadest metülatsiooni muutuse suuna poolest – 1. ja 2. trimestri võrdluses oli üldiselt enam metülatsiooni tõusuga postsioone, CpG saarte jaoks oli aga muutuse suund vastupidine. Ka uuringus (Novakovic *et al.*, 2011), kus kasutati metülatsiooni määramiseks hübriidsatsioonikiipi, mis võimaldas määrata üksikute CpG-de metülatsiooni ~14 000 geeni promootoralas, leiti sama – CpG saartesse jäävate CpG-de puhul oli enam positsioone, mille jaoks metülatsiooni langes.

Leidmaks differentsiaalse metülatsiooni poolt mõjutatud geenid, grupeerisin lähestikku asuvad differentsiaalse metülatsiooniga CpG-d ning filtreerisin välja need geenid, mis olid moodustunud differentsiaalselt metüleeritud aladega ülekattes. Geenide arvuks oli 555 ning nimekirja tõlgendamiseks viisin läbi funktsionaalse rikastusanalüüsi. Saadud tulemused aga ei näidanud geenide osalust protsessides, mis oleksid seotud platsenta põhiülesannetega – transpordiga, endokriinse regulatsiooniga või kaitsefunktsiooniga. Tulemustes domineerisid üldised organismi arenguliste protsessidega seotud kategooriad, seejuures olid paljud vasted seotud närvisüsteemi arenguga. Lisaks oli geenide nimekiri rikastatud rakkude liikumisega, signalisatsiooniga ning transkriptsiooni regulatsiooniga seotud kategooriate suhtes. Varasemas platsenta metülatsiooni ülegenoomselt uurinud töös on leitud, et paljud 1. ja 2. trimestri võrdluses promootoralas differentsiaalset metülatsiooni omavatest geenidest on seotud immuunsüsteemiga (Novakovic *et al.*, 2011). Käesolevas töös sama järeldada ei saa. Küll aga on tulemused kooskõlas 1. ja 2. trimestri platsentakoe proovide geeniekspresiooni võrrelnud tööga (Uusküla *et al.*, 2012).

Viidatud töös oli uuritavaid proove 10 (gestatsiooniajaga 38-132 päeva) ning sõltuvalt sellest, kas proove analüüsiti jaotatuna kahte gruppi või hinnati geeniekspresiooni muutuse seost proovi täpse gestatsiooniajaga, tuvastati statistiliselt oluline geeniekspresiooni muutus vastavalt 229 ja 154 geeni puhul. Enam oli geeniekspresiooni tõusuga geene – vastavalt 205 ja 105. Need geenid küll ei kattunud käesolevas töös leitud differentsiaalselt metüleeritud geenidega, kuid funktsionaalse rikastusanalüüsiga saadud tulemused olid sarnased. Kõik eelnevalt nimetatud funktsionaalsed kategooriad või neile lähedased kategooriad olid esindatud ka (Uusküla *et al.*, 2012) uuringus ekspresiooni tõusuga geenidele rakendatud rikastusanalüüsis saadud tulemustes. Erandiks on üksikud konkreetseid signalisatsiooniradu puudutavad kategooriad - cAMP ja Wnt signalisatsioonirada, millega seotust ei leitud. Ka ei olnud viidatud uuringu tulemustes kitsamaid närvirakkude morfogeneesi puudutavaid kategooriad, samas geenide seotust närvisüsteemi arenguga leiti ka seal. Ehk väärib just seos närvisüsteemiga eraldi esile tõstmist, kuna see toetab hüpoteese, mille järgi võib platsental

olla teatav roll loote aju arengu reguleerimisel (Zeltser ja Leibel, 2011). Mainitud Wnt signalisatsioonirajale, mis on seotud rakkude proliferatsiooniga ja differentseerumisega, on aga pööratud tähelepanu uuringus, kus võrreldi 1. ja 2. trimestri platsenta geeniekspresiooni 3. trimestriga (Mikheev *et al.*, 2008). Uuringus tuvastati 3. trimestris signalisatsioonirada negatiivselt reguleerivate geenide ekspresiooni tõus ning rajaga seotud retseptorvalkude ekspresiooni langus. Selle põhjal ning ka  $\beta$ -kateniini hulga ja lokaliseerimise põhjal järeldati, et kanooniline Wnt signalisatsioonirada on raseduse 1. ja 2. trimestri jooksul aktiivne.

Viimase märkusena on 1. ja 2. trimestri võrdluse tulemuste juures oluline juhtida tähelepanu võimalusele, et leitud erinevused ei pea tingimata tähendama, et need kindlad genoomi piirkondi kaotaksid metülatsiooni või saaksid *de novo* metüleeritud. Erinevused metülatsioonis võivad tuleneda ka proovide erinevast rakulisest koosseisust, st. eri rakutüüpide erinevast osakaalust proovides. 1. ja 2. trimestri proovid koguti erinevatel põhimõtetel. 1. trimestri proovide puhul on tegemist platsenta hattude trofoblastirakkude fraktsiooniga, mis sisaldavad vähesel määral ka mesenhüümirakke. 2. trimestri puhul koguti koeproovid tervet platsentat läbivalt, seega sisaldavad need proovid kõiki platsenta rakutüüpe, kuid domineerib siiski trofoblasti rakkude fraktsioon.

#### **2.4.2 Normaalselt kulgenud raseduse ja spontaanabordiga lõppenud raseduse platsentakoe metüloomide võrdlus**

Korduva spontaanabordi proovide puhul sai lükatud ümber algne hüpotees, et raseduse katkemine võiks olla põhjustatud üldistest kogu genoomi puudutavatest häiretest metülatsioonis. Kuigi selgus, et antud juhtudel suuri, kogu genoomi hõlmaivad muutuseid ei esinenud, siis ei ole välistatud, et üksikutes lookustes aset leidnud muutused ei võinuks olla seotud raseduse katkemisega. Samas differentiaalse metülatsiooni poolt mõjutatud geenide esialgne analüüs ei toetanud ka seda võimalust - tuntuid platsenta funktsiooniga seotud gene saadud nimekirjas ei olnud ning paljud neist geenidest seniteadaolevalt platsentas ei ekspresseerugi (andmekogu *The Human Protein Atlas* põhjal, <http://www.proteinatlas.org>). Erinevused geenide metülatsioonis võisid tuleneda indiviidide vahelisest varieeruvusest või olla põhjustatud gestatsiooniaja erinevustest. Varasemalt on uuritud korduva spontaanabordi juhtude platsentakoe metüloomide hübridisatsioonikiibi tehnoloogiat kasutades, mis võimaldab määrata üksikute CpG-de metülatsiooni ~14 000 geeni promotoralas (Hanna *et al.*, 2013) ning sarnaselt käesoleva uuringuga oli ka seal vähe leide - differentiaalse metülatsiooniga oli spontaanabordi juhtudes vaid 11 CpG-d.

### 2.4.3 Uurimistöö jätkamine

Uurimistöö sama andmestiku põhjal jätkub ning kavas on teostada järgmised analüüsid:

1) Võrrelda differentsiaalse metülatsiooni analüüsi tulemusi samade proovide geeniekspressiooni andmetega.

2) Teha kindlaks, kas leidub differentsiaalselt metüleeritud piirkondi, mis kattuksid imprintingu kontrollregioonidega.

3) Teha kindlaks, kas differentsiaalselt metüleeritud alad kattuvad transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadega.

4) Platsentale on omased genoomi somaatilised struktuuralsed ümberkorraldused ning eksisteerivad kindlad piirkonnad, kus need muutused leiavad aset keskmisest kõrgema sagedusega (Kasak *et al.*, 2015). Kavas on hinnata differentsiaalselt metüleeritud alade kattuvust piirkondadega, millele on omased struktuuralsed ümberkorraldused.

5) Analüüsida platsenta osaliselt metüleeritud alasid, sh. nende piirkondade kattuvust aladega, kus leiavad sagedamini aset struktuuralsed ümberkorraldused.

## Kokkuvõte

Magistritöö raames analüüsiti normaalselt kulgenud raseduse 1. ja 2. trimestri platsentakoe metüloome ning korduva spontaanabordi juhtude platsentakoe metüloome. Uuritavaid proove oli 8 – 4 1. trimestri proovi ning 2. trimestri ja korduva spontaanabordi juhtude kohta mõlemal juhul 2 proovi.

Esmalt kirjeldati, mis piirkondade jaoks genoomis kasutada olev andmestik metülatsiooniinfot sisaldas, seejuures ka seda, kui suurele osale kõigist genoomi CpG-dest oli metülatsioon määratud. Andmestikus oli kõigi uuritavate proovide jaoks piisava sügavusega ( $\geq 5$  lugemit) kaetud autosoomide 2 043 665 CpG positsiooni, mis on 7,3% kõigist genoomi CpG-dest. Ligi pool kirjetest kuulusid CpG saarte või kalda piirkondadesse ning sõltuvalt saare asukohast geeni suhtes oli andmestikus info olemas 70-95% kõikide CpG saarte kohta. Ülejäänud andmestik sisaldas metülatsiooniinfot CpG saartest ja kalda piirkondadest väljaspoole jäävatele positsioonidele, seega võimaldab metülatsiooni määramiseks kasutatud metodoloogia uurida ka piirkondi, mis ei ole CpG saartega seotud.

Järgnevalt määrati kõigi proovide puhul metülatsioonitase genoomis sõltuvalt genoomsest kontekstist. CpG saari puudutavad tulemused olid ootuspärased – promootorala CpG saared olid valdavalt metüleerimata (87,1%-l saartest oli metülatsioonitase  $< 20\%$ ) ning geenikehaga ülekattes olevate saarte hulgas oli märkimisväärne hulk kõrgelt metüleeritud saari (24,2%-l oli saartest metülatsioonitase  $> 80\%$ ). Kinnitust leidis ka varasemalt teadaolev platsenta genoomi üldine madal metülatsioonitase – väljaspool CpG saari ja kalda piirkondi asuvate CpG-de keskmiseks metülatsiooniks oli 59,7%.

Töö põhieesmärgiks oli eri proovigruppide võrdlus. Pearson korrelatsiooni põhjal eristusid ülejäänutest 2. trimestri proovid, samas spontaanabordi juhtude proovid omasid 1. trimestri proovidega kõrget korrelatsiooni. Ka differentiaalse metülatsiooni analüüsi põhjal oli spontaanabordi juhtude platsentakoe metüloom sarnane normaalse raseduse 1. trimestri proovidele – leiti vaid 87 differentiaalselt metüleeritud ala (DMR). Algne hüpotees, et raseduse katkemise võisid neil patsientidel põhjustada üleüldised kogu genoomi puudutavad häired metülatsioonis, ei leidnud kinnitust.

1. ja 2. trimestri proovide võrdlemisel tuvastati differentiaalse metülatsiooni analüüsiga 991 DMR ala. Enam olid metülatsiooni tõusuga piirkondi – 65,3% kõigist, samas promootorala CpG saari iseloomustas vastupidine muutuse suund – 81,4% kõigi nende piirkondadega ülekattes olevate DMR alade jaoks metülatsioon langes. Leitud DMR alad olid ülekattes 555 geeniga, milles paljud olid seotud organismi üldiste arenguliste protsessidega, seejuures ka närvisüsteemi arenguga.

# The profile and dynamics of placental methylome during the first half of pregnancy

Aivi Kaljuvee

## Summary

The placenta is a temporary organ that both supports fetal growth and modulates the changes in maternal physiology that take place during pregnancy. Problems in its function are associated with a number of pregnancy complications, understanding its development and function is therefore of great importance. Most of what we know about the human placenta comes from studies focusing on the fully developed organ from the 3rd trimester. The reason being that accessing samples from term pregnancies is easier. But it is important also to understand the development of the placenta during the 1st half of pregnancy. The goal of this master's project was to analyze methylation in placental samples from 1st and 2nd trimester pregnancies. In addition, also in samples derived from patients who are suffering from recurrent miscarriage. Recurrent miscarriage affects 1-3% of couples aiming to bear children (Berry *et al.*, 1995; Branch *et al.*, 2010) and for about 50% of all cases the reason for the problem is not known (Rull *et al.*, 2012). In the current project we asked whether in the 2 samples being analyzed spontaneous abortion could have been caused by general perturbations in methylation affecting the whole genome.

The role of the author of the master's thesis in the project was to conduct data analysis, placental sampling and all laboratory work for measuring methylation had been completed by other contributors to the project.

The methodology used for measuring methylation was reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). The first step of the analysis was to assess how well the dataset acquired with this technology covers the genome. Next the general methylation profile for all samples was described by estimating the methylation level in different functional elements in the genome. The main focus of the analysis was to compare different sample groups and for that differential methylation analysis was used.

The initial hypothesis about samples from recurrent miscarriage was not confirmed. The general methylation profile of these samples was highly similar to the 1st trimester samples from pregnancies without complications. This does not rule out the possibility that abortions could have been caused by changes in methylation in specific loci - differential methylation revealed 87 differentially methylated regions in these samples. Initial analysis of the affected genes did not support this possibility though – many of the genes are not expressed in the placenta.

The analysis of the samples from normal pregnancies revealed interesting dynamics associated with changes in gestational age. 991 regions were differentially methylated between these samples and the regions overlapped with 555 genes. 65.3% of the differentially methylated regions showed increase in methylation, regions that overlapped CpG islands located in promoters showed different direction for the changes – decrease in methylation was dominant. Functional enrichment analysis of the affected genes showed that many were associated with general developmental processes, including processes associated with nervous system development. This again possibly points to the link between the placenta and brain development. The idea that placenta could have a role in regulating fetal brain development has gained attention for some time now (Zeltser and Leibel, 2011).

## **Kasutatud kirjandus**

Berry, C. W., Brambati, B., Eskes, T. K., Exalto, N., Fox, H., Geraedts, J. P., Gerhard, I., Gonzales Gomes, F., Grudzinskas, J. G. and Hustin, J. (1995). The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 10: 1516-1520.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21.

Boogaard, E. van den, Vissenberg, R., Land, J. A., Wely M. van, Post J., A. van der, Goddijn M. and Bisschop P. H. (2011). Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 17: 605-619.

Branch, D. W., Gibson, M. and Silver, R. M. (2010). Recurrent miscarriage. *N. Engl. J. Med.* 363: 1740-1747.

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L.-H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A. and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* 10: 2709-2721.

Feng, H., Conneely, K. N. and Wu, H. (2014). A Bayesian hierarchical model to detect differentially methylated loci from single nucleotide resolution sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42: e69.

Fowden, A. L., Coan, P. M., Angiolini, E., Burton, G. J. and Constancia, M. (2011). Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype. *Prog. BioPhys. Mol. Biol.* 106: 281-288.

Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura, K., Miyazaki, T., Ogura, C., Okazaki, Y. And Jinno, Y. (2004). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann. Hum. Genet.* 68: 196-204.

Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. and King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.* 114: 397-407.

Hanna, C. W., McFadden, D. E. and Robinson, W. P. (2013). DNA methylation profiling of placental villi from karyotypically normal miscarriage and recurrent miscarriage. *Am. J. Pathol.* 182: 2276-2284.

Holliday, R. and Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226-232.

Hon, G. C., Hawkins, R. D., Caballero, O. L., Lo, C., Lister, R., Pelizzola, M., Valsesia, A., Ye, Z., Kuan, S., Edsall, L. E., Camargo, A. A., Stevenson, B. J., Ecker, J. R.,

Bafna, V., Strausberg, R. L., Simpson, A. J., and Ren, B. (2012). Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res.* 22: 246-258.

Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *J. Clin. Pathol.* 61:1296–1302.

Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R. W., James, K. D., Turner, D. J., Smith, C. Harrison, D. J., Andrews, R. and Bird, A. P. (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* 6: e1001134.

Jauniaux, E., Farquharson, R. G., Christiansen, O. B. and Exalto, N. (2006). Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 21: 2216-2222.

Jensen, T. J., Kim, S. K., Zhu, Z., Chin, C., Gebhard, C., Lu, T., Deciu, C., Boom, D. van den and Ehrich, M. (2015). Whole genome bisulfite sequencing of cell-free DNA and its cellular contributors uncovers placenta hypomethylated domains. *Genome Biol.* 16: 78.

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Rev. Genet.* 13: 484-492.

Kasak, L., Rull, K., Vaas, P., Teesalu, P. and Laan, M. (2015). Extensive load of somatic CNVs in the human placenta. *Sci. Rep.* 5: 8342.

Kolte, A. M., Bernardi, L. A., Christiansen, O. B., Quenby, S., Farquharson, R. G., Goddijn, M. and Stephenson, M. D. (2015). Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum. Reprod.* 30: 495-498.

Larsen, E., C., Christiansen, O. B., Kolte, A. M. and Macklon, N. (2013). New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med.* 11: 154.

Li, E., Bestor, T. H. and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B. and Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315-322.

Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghghi, F. G., Sejnowski, T. J., Behrens, M. M. and Ecker, J. R. (2013). Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain

development. *Science* 341.

Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., Johnson, B. E., Hong, C., Nielsen, C., Zhao, Y., Turecki, G., Delaney, A., Varhol, R., Thiessen, N., Shchors, K., Heine, V. M., Rowitch, D. H., Xing, X., Fiore, C., Schillebeeckx, M., Jones, S. J. M., Haussler, D., Marra, M. A., Hirst, M., Wang, T. and Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466: 253-257.

McNamee, K., Dawood, F. and Farquharson, R. (2012). Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 24: 229-234.

Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S. and Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 33: 5868-5877.

Mikheev, A. M., Nabekura, T., Kaddoumi, A., Bammler, T. K., Govindarajan, R., Hebert, M. F. and Unadkat, J. D. (2008). Profiling gene expression in human placentae of different gestational ages: an OPRU Network and UW SCOR Study. *Reprod. Sci.* 15: 866–877.

Novakovic B., Yuen, R. K., Gordon, L., Penaherrera, M. S., Sharkey, A., Moffett, A., Graig, J. M., Robinson, W. P. and Saffery, R. (2011). Evidence for widespread changes in promoter methylation profile in human placenta in response to increasing gestational age and environmental/stochastic factors. *BMC Genomics* 12: 529.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257.

Peters, J. (2014). The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Rev. Genet.* 15: 517-530.

Rai, R. and Regan, R. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet* 368: 601-6011.

Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H. and Vilo, J. (2016). g:Profiler – a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* 44: W83-W89.

Reimand, J. Kull, M., Peterson, H., Hansen, J. and Vilo, J. (2007). g:Profiler – a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res.* 35: W193-W200.

Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* 14: 9-25.

Robinson, W. P. and Price, E. M. (2015). The human placental methylome. *Cold*

Spring Harb. Perspect. Med. 5: a023044.

Rull, K., Nagirnaja, L. and Laan, M. (2012). Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front. Genet.* 3: 34.

Schroeder, D. I., Blair, J. D., Lott, P., Ken Yu, H.O., Hong, D., Crary, F., Ashwood, P., Walker, C., Korf, I., Robinson, W. P. and LaSalle, J. M. (2013). The human placenta methylome. *PNAS* 110: 6037-6042.

Schultz, M. D., He, Y., Whitaker, J. W., Hariharan, M., Mukamel, E. A., Leung, D., Rajagopal, N., Nery, J. R., Urich, M. A., Chen, H., Lin, S., Lin, Y., Jung, I., Schmitt, A. D., Selvaraj, S., Ren, B., Sejnowski, T. J., Wang, W. and Ecker, J. R. (2015). Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature* 523: 212-216.

Smith, Z. D. and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Rev. Genet.* 14: 204-220.

Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Katano, K., Suzumori, N., Kitaori, T. and Mizutani, E. (2012). Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 27: 2297-2303.

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

Yin, L.-J., Zhang, Y., Lv, P.-P., He, W.-H., Wu, Y.-T., Liu, A.-X., Ding, G.-L., Dong, M.-Y., Qu, F., Xu, C.-M., Zhu, X.-M. and Huang, H.-F. (2012). Insufficient maintenance DNA methylation is associated with abnormal embryonic development. *BMC Med.* 10: 26.

Zeldovich, V. B., Robbins, J. R., Kapidzic, M., Lauer, P. and Bakardjiev, A. I. (2011). Invasive extravillous trophoblasts restrict intracellular growth and spread of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 7: e1002005.

Zeltser, L. M. and Leibel, R. L. (2011). Roles of the placenta in fetal brain development. *PNAS* 108: 15667-15668.

Ziller, M. J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T.-Y., Kohlbacher, O., De Jager, P. L., Rosen, E. D., Bennett, D. A., Bernstein, B. E., Gnirke, A. and Alexander Meissner, A. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500: 477-481.

Tabel L.1: Differentiaalse metülatsiooniga CpG-de arv DSS-meetodi rakendamisel 1. ja 2. trimestri proovidest moodustatud gruppidele.

met. erinevus p-väärtus	≥ 20%				≥ 10%				≥ 5%				> 0%			
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-2</sup>
MNA1, MNA2	452	1260	4825	16353	2055	5916	21909	71467	4474	12840	48844	162399	7127	19436	64768	176833
OSA1, OSA3	404	1000	3617	13381	1482	4144	16883	61732	2998	9112	39335	145935	4717	13656	50267	149731
OSA1, OSA2	142	400	1696	7577	605	1879	9659	41719	1270	4615	24675	111047	2061	7144	32459	114707
OSA4, MNA1	173	428	1707	7282	633	1953	9510	40240	1360	4731	24249	105936	2220	7446	32374	110419
OSA4, MNA2	162	382	1518	6343	559	1726	8014	34978	1180	3973	20574	96078	1951	6138	27450	99528
OSA3, MNA1	123	296	1176	5090	428	1321	6456	30101	912	3141	17377	83924	1451	4840	23018	85547
OSA1, OSA4	139	357	1354	5756	494	1465	6931	31465	1004	3384	17744	88345	1550	5061	22966	86986
OSA1, MNA2	108	303	1253	5216	453	1388	6597	29683	965	3213	17229	81681	1530	4948	22400	82159
OSA2, OSA3	159	361	1272	5352	481	1380	6634	30001	962	3166	17081	85060	1457	4773	22317	85783
OSA2, OSA4	120	311	1223	5132	441	1307	6339	29603	921	3041	16765	84141	1400	4673	21947	85120
OSA2, MNA2	132	342	1245	4898	471	1375	6124	28051	984	3064	16134	79423	1509	4685	21716	82801
OSA3, MNA2	131	317	1206	4996	473	1323	6241	27161	924	3068	15751	76198	1477	4736	20706	77217
OSA2, MNA1	99	254	927	4304	351	1025	5367	25439	655	2541	14487	74625	1110	3940	19379	77367
OSA3, OSA4	129	303	1207	4865	422	1242	5781	26981	864	2795	14948	75958	1289	4083	18979	73311
OSA1, MNA1	110	297	978	4005	393	1055	4980	23115	751	2416	13099	68069	1156	3674	17456	68879

Märkus. Meetodit rakendati kõikvõimalikele kuuest proovist moodustatud 2 ja 4 proovi suurustele gruppidele. Esitatud on statistiliste testimise tulemustena saadud differentiaalse metülatsiooniga CpG-de arv, testimisel muudeti p-väärtuse ja metülatsiooni erinevuse tingimusi. Esimeses veerus on testimise 2-se grupi proovid.

Tabel L2: Differentiaalse metülatsooniga CpG-de arv DSS-meetodi rakendamisel 1. trimestri ja spontaanabordi juhtude proovidest moodustatud gruppidele.

met. erinevus p-väärtus	≥ 20%		≥ 10%		≥ 5%		> 0%									
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	5·10 <sup>-2</sup>								
OSA2, OSA4	149	370	1528	6436	559	1757	8460	36546	1223	4217	21888	100393	2061	6698	29917	106577
OSA1, SPA1	140	345	1366	5922	507	1583	7910	35553	1093	3927	21172	98655	1829	6248	29377	106561
OSA1, OSA3	273	670	2134	7254	923	2340	8919	34779	1753	4823	20872	91746	2583	7014	27117	93341
OSA4, SPA2	152	387	1411	5955	538	1589	7629	32922	1103	3820	19549	90714	1806	5947	26060	94101
OSA3, SPA2	137	351	1380	5633	525	1591	7201	30967	1136	3617	18522	86144	1846	5652	25084	90591
OSA3, OSA4	132	350	1289	5249	508	1463	6580	29772	1036	3215	17235	83805	1624	4913	22819	84039
OSA1, SPA2	139	319	1155	4728	454	1274	6116	27646	919	3027	16294	78628	1440	4691	21819	82350
SPA1, SPA2	120	280	1102	4496	405	1236	5839	26625	851	2899	15775	77555	1396	4610	21714	83594
OSA2, SPA2	125	309	1132	4662	439	1259	5921	26650	868	2998	15504	76577	1397	4571	21350	81492
OSA4, SPA1	146	329	1126	4335	435	1202	5429	25088	854	2705	14467	73509	1316	4096	19345	76869
OSA3, SPA1	116	271	995	4087	382	1107	5174	24228	770	2546	13931	71270	1245	3937	18680	74422
OSA2, OSA3	117	275	1004	4164	384	1092	5189	24138	762	2546	13766	70730	1199	3904	18501	73285
OSA1, OSA4	138	324	1114	4375	439	1188	5322	24438	829	2602	13715	71157	1276	3889	17903	70828
OSA2, SPA1	104	256	949	3827	357	1027	4884	23148	721	2351	13118	68874	1143	3637	17897	73545
OSA1, OSA2	141	285	988	3981	389	1074	4901	22738	749	2431	12847	67649	1156	3664	16983	69601

Märkus. Meetodit rakendati kõikvõimalikele kuuest proovist moodustatud 2 ja 4 proovi suurustele gruppidele. Esitatud on statistiliste testimise tulemustena saadud differentiaalse metülatsooniga CpG-de arv, testimisel muudeti p-väärtuse ja metülatsooni erinevuse tingimusi. Esimeses veerus on testimise 2-se grupi proovid.

## Lisa 2

**Tabell 3:** Funktsionaalse rikastusanalüüsi tulemus geenidele, mis sisaldasid 1. ja 2. trimestri võrdluses differentsiaalselt metüleeritud piirkondi.

korrigeeritud p-väärtus	geenide arv kategoorias	päringus	kattegoria identifikaator	AB <sup>a</sup>	kattegoria nimetus inglise keeles
2,50E-02	2758	103	GO:0007166	BP	cell surface receptor signaling pathway
4,49E-02	1229	55	GO:0007167	BP	enzyme linked receptor protein signaling pathway
4,05E-03	6936	221	GO:0032501	BP	multicellular organismal process
4,14E-05	2479	105	GO:0051239	BP	regulation of multicellular organismal process
1,28E-05	5940	206	GO:0044707	BP	single-multicellular organism process
1,30E-05	5755	201	GO:0032502	BP	developmental process
1,72E-05	5404	191	GO:0048856	BP	anatomical structure development
4,63E-08	2694	121	GO:0009653	BP	anatomical structure morphogenesis
2,88E-02	1120	52	GO:0048646	BP	anatomical structure formation involved in morphogenesis
9,43E-06	1794	85	GO:0040011	BP	locomotion
3,08E-04	853	48	GO:0042330	BP	taxis
2,97E-04	852	48	GO:0006935	BP	chemotaxis
6,07E-06	5669	200	GO:0044767	BP	single-organism developmental process
1,05E-05	4865	177	GO:0007275	BP	multicellular organism development
2,83E-06	4327	164	GO:0048731	BP	system development
3,01E-02	3045	111	GO:0048513	BP	animal organ development
4,52E-05	2355	101	GO:0007399	BP	nervous system development
1,33E-05	2113	95	GO:0050793	BP	regulation of developmental process
4,04E-02	898	44	GO:0022603	BP	regulation of anatomical structure morphogenesis
9,00E-07	1593	81	GO:2000026	BP	regulation of multicellular organismal development
5,85E-03	750	41	GO:0051960	BP	regulation of nervous system development
2,04E-05	1915	88	GO:0006928	BP	movement of cell or subcellular component
7,55E-03	1488	66	GO:0030030	BP	cell projection organization
1,70E-06	4021	156	GO:0048869	BP	cellular developmental process
8,28E-04	1517	70	GO:0032989	BP	cellular component morphogenesis
3,96E-04	1109	57	GO:0032990	BP	cell part morphogenesis
5,97E-04	1444	68	GO:0000902	BP	cell morphogenesis
5,24E-04	1090	56	GO:0048858	BP	cell projection morphogenesis
4,66E-06	3731	146	GO:0030154	BP	cell differentiation
4,28E-07	1684	85	GO:0022008	BP	neurogenesis
3,12E-06	1606	80	GO:0048699	BP	generation of neurons
4,33E-05	1494	73	GO:0030182	BP	neuron differentiation
3,13E-07	2149	101	GO:0048468	BP	cell development
1,14E-03	1031	53	GO:0000904	BP	cell morphogenesis involved in differentiation
1,57E-03	1244	60	GO:0048666	BP	neuron development
9,96E-03	1108	53	GO:0031175	BP	neuron projection development
4,92E-03	772	42	GO:0061564	BP	axon development
4,67E-04	865	48	GO:0048812	BP	neuron projection morphogenesis
2,69E-03	571	35	GO:0097485	BP	neuron projection guidance
2,17E-03	829	45	GO:0048667	BP	cell morphogenesis involved in neuron differentiation
4,62E-03	743	41	GO:0007409	BP	axonogenesis
2,69E-03	571	35	GO:0007411	BP	axon guidance
5,67E-03	5369	179	GO:0048518	BP	positive regulation of biological process
3,53E-02	3511	124	GO:0009893	BP	positive regulation of metabolic process
2,20E-02	1229	56	GO:1902679	BP	negative regulation of RNA biosynthetic process
1,53E-02	1214	56	GO:1903507	BP	negative regulation of nucleic acid-templated transcription
1,22E-02	1175	55	GO:0045892	BP	negative regulation of transcription, DNA-templated
2,13E-02	2919	108	GO:0023051	BP	regulation of signaling
4,23E-02	2964	108	GO:0010646	BP	regulation of cell communication
1,66E-02	2597	99	GO:0009966	BP	regulation of signal transduction
1,11E-02	1980	81	GO:0006366	BP	transcription from RNA polymerase II promoter
4,37E-02	1761	72	GO:0006357	BP	regulation of transcription from RNP II promoter

järgneb

**Tabel L3 jätk**

korrigeeritud p-väärtus	geenide arv kategoorias	kategooria päringus	identifikaator	AB <sup>a</sup> kategooria nimetus inglise keeles <sup>b</sup>
1,88E-02	212	18	GO:0003714	MF transcription corepressor activity
8,74E-04	3	3	CORUM:518	cor AKAP250-PKA-PDE4D complex
8,74E-04	3	3	CORUM:621	cor AKAP250-PKA-PDE4D complex
2,06E-02	201	15	KEGG:04024	keg cAMP signaling pathway
2,83E-02	142	12	KEGG:04310	keg Wnt signaling pathway
4,83E-02	538	28	MI:hsa-miR-21	mi MI:hsa-miR-21*
1,08E-02	520	28	REAC:422475	rea Axon guidance

<sup>a</sup> Rikastusanalüüsil kasutatud andmebaas: BP, MF - GO ontoloogiad bioloogiliste protsesside ja molekulaarsete funktsioonide kohta (<http://geneontology.org>), cor - CORUM (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/corum/>), keg - KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), mi - miRBase (<http://www.mirbase.org/>), rea - Reactome (<http://www.reactome.org/>).

<sup>b</sup> Taane nimetuse ees on näitamaks, mis tasemel kategooria ontoloogias asub.

**Tabel L4:** Funktsionaalse rikastusanalüüsi tulemus geenidele, mille promotoraal CpG saare metüülatsioonitase oli 2. trimestri proovides madalam kui 1. trimestri proovides.

korrigeeritud p-väärtus	geenide arv kategoorias	kategooria päringus	identifikaator	AB <sup>a</sup> kategooria nimetus inglise keeles <sup>b</sup>
3,43E-02	772	12	GO:0061564	BP axon development
2,34E-02	743	12	GO:0007409	BP axonogenesis
1,95E-02	4182	31	GO:0009889	BP regulation of biosynthetic process
3,47E-02	5729	37	GO:0080090	BP regulation of primary metabolic process
4,86E-02	5807	37	GO:0031323	BP regulation of cellular metabolic process
1,50E-02	4132	31	GO:0031326	BP regulation of cellular biosynthetic process
1,80E-02	3944	30	GO:0019219	BP regulation of nucleobase-containing compound metabolism
3,26E-02	1514	17	GO:0009890	BP negative regulation of biosynthetic process
2,64E-02	1490	17	GO:0031327	BP negative regulation of cellular biosynthetic process
4,49E-02	1229	15	GO:1902679	BP negative regulation of RNA biosynthetic process
3,88E-02	1214	15	GO:1903507	BP negative regulation of nucleic acid-templated transcription
2,63E-02	1175	15	GO:0045892	BP negative regulation of transcription, DNA-templated
3,89E-02	5755	37	GO:0032502	BP developmental process
7,85E-03	5404	37	GO:0048856	BP anatomical structure development
1,76E-02	2694	24	GO:0009653	BP anatomical structure morphogenesis
2,67E-02	5669	37	GO:0044767	BP single-organism developmental process
2,91E-02	5940	38	GO:0044707	BP single-multicellular organism process
1,72E-03	4865	36	GO:0007275	BP multicellular organism development
3,86E-03	4327	33	GO:0048731	BP system development
1,57E-03	2355	24	GO:0007399	BP nervous system development
3,78E-04	1684	21	GO:0022008	BP neurogenesis
8,45E-04	1606	20	GO:0048699	BP generation of neurons
3,08E-02	899	13	GO:0007417	BP central nervous system development
1,51E-02	2479	23	GO:0051239	BP regulation of multicellular organismal process
1,54E-02	1593	18	GO:2000026	BP regulation of multicellular organismal development
1,25E-03	2149	23	GO:0048468	BP cell development
6,24E-03	1494	18	GO:0030182	BP neuron differentiation
2,29E-03	1244	17	GO:0048666	BP neuron development
1,93E-02	4406	32	GO:1901362	BP organic cyclic compound biosynthetic process
3,24E-02	4282	31	GO:0018130	BP heterocycle biosynthetic process
3,25E-02	4283	31	GO:0019438	BP aromatic compound biosynthetic process
2,31E-02	4215	31	GO:0034654	BP nucleobase-containing compound biosynthetic process
8,61E-03	799	13	GO:0001067	MF regulatory region nucleic acid binding
2,87E-03	2434	24	GO:0003677	MF DNA binding
2,01E-05	1018	18	GO:0043565	MF sequence-specific DNA binding
8,49E-03	798	13	GO:0000975	MF regulatory region DNA binding
8,15E-03	795	13	GO:0044212	MF transcription regulatory region DNA binding
1,35E-02	368	9	GO:0001159	MF core promoter proximal region DNA binding
3,86E-02	652	11	GO:0000976	MF transcription regulatory region sequence-specific DNA binding
1,29E-02	366	9	GO:0000987	MF promoter proximal region sequence-specific DNA binding

järgneb

**Tabel L4 jätk**

korregeeritud p-väärtus	geenide arv kategoorias	paringus	kategooria identifikaator	AB <sup>a</sup> kategooria nimetus inglise keeles <sup>b</sup>
2,26E-02	1160	15	GO:0001071	MF nucleic acid binding transcription factor activity
2,26E-02	1160	15	GO:0003700	MF transcription factor activity, sequence-specific DNA binding
3,08E-03	610	12	GO:0000981	MF RNP II TF activity, sequence-specific DNA binding
4,59E-03	201	6	kegG:04024	keg cAMP signaling pathway
2,70E-02	278	6	kegG:04080	keg Neuroactive ligand-receptor interaction
2,89E-02	31	3	REAC:418990	rea Adherens junctions interactions

<sup>a</sup> Rikastusanalüüsil kasutatud andmebaas: BP, MF - GO ontoloogiad bioloogiliste protsesside ja molekulaarsete funktsioonide kohta (<http://geneontology.org>), keg - KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), rea - Reactome (<http://www.reactome.org/>).

<sup>b</sup> Taane nimetuse ees on näitamaks, mis tasemel kategooria ontoloogias asub.

## **Lihtlitsents**

### **lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Aivi Kaljuvee (sünnikuupäev: 15.10.1984)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Platsenta metüloomi profiil ja dünaamika raseduse esimeses pooles“, mille juhendajad on prof. Maris Laan ja Siim Sõber,
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 17.08.2016