

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

ja

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
INIMESE GENEETIKA ÕPPETOOL

***FLT1* geeni dinukleotiidkorduste rikka regulaatorala haplotüüpide esinemine preeklamptilistes
platsentades**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Karita Helde

Juhendajad PhD Triin Kikas
prof Ants Kurg

TARTU 2023

INFOLEHT

„*FLT1* geeni dinukleotiidkorduste rikka regulaatorala haplotüüpide esinemine preeklampilistes platsentades“

Preeklampsia on rasedusaegne haigus, mis esineb ligi 5-8% naistel maailmas ning viib sageli nii ema kui loote surmani. Haiguse etioloogia ja kulg pole veel lõplikult välja selgitatud. *FLT1* geeni seost preeklampsia vastuvõtlikusega on mainitud varasemalt välja antud artiklites ja selle toodetud valgu sFlt-1 kõrge tase on üks varajastest preeklampsia markeritest. Varasemalt on erinevaid *FLT1* geeni lähistel asuvaid dinukleotiidkorduseid (DNK) ja SNPsid on seostatud preeklampsia esinemise kõrge riski ning ka *FLT1* geeni ekspressiooniga. Käesolevas bakalaureuse töös antakse ülevaade preeklampsiast, *FLT1* geeni mõjust selle riskile ning uuritakse indiviidide täpse *FLT1* DNK-rikka regulaatorala haplotüübi mõju preeklampsia riskile ning *FLT1* ekspressioonile.

Märksõnad: preeklampsia, dinukleotiidkordused, *FLT1* geen.

CERCS kood: B220 geneetika, tsütogeneetika; B570 sünnitusabi, günekoloogia, androloogia, paljunemine, seksuaalsus; B790 kliiniline geneetika.

"Occurrence of the dinucleotide-repeat-rich regulatory region haplotypes near the *FLT1* gene in preeclamptic placentas"

Preeclampsia is a medical diagnosis during pregnancy that occurs in nearly 5-8% of women worldwide and often leads to the death of both mother and fetus. The etiology and course of the disease have not yet been definitively elucidated. The association of the *FLT1* gene with susceptibility to preeclampsia has been shown in previously published articles. Elevated levels of the soluble isoform of its protein, sFlt-1, is one of the early markers of preeclampsia. Various dinucleotide repeats (DNR) and SNPs have been associated with *FLT1* gene expression. Current bachelor's thesis gives an overview of preeclampsia and the risk effect of the *FLT1* gene, as well as investigates the effect of the exact *FLT1* DNR-rich region haplotype of individuals on the risk of preeclampsia and the expression of *FLT1*.

Keywords: preeclampsia, dinucleotide repeat-rich regions, *FLT1* gene.

CERCS code: B220 genetics, cytogenetics; B570 obstetrics, gynaecology, andrology, reproduction, sexuality; B790 clinical genetics.

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
1. KASUTATUD LÜHENDID	5
2. SISSEJUHATUS	7
3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
3.1. Preeklampsia.....	8
3.1.1. Preeklampsia tekkemehhanismid	9
3.1.2. Pikaajalised tüsistused preeklampsiat põdevatel naistel.....	10
3.1.3. Preeklampsia geneetika	11
3.1.4. <i>FLTI</i> geen ja selle isovorm sFlt-1	13
3.1.5. Preeklampsia ravi ja ennetamine	14
3.2. Mikrosatelliidid kui geneetilised markerid.....	16
3.3. Meetodid STRide tuvastamiseks	17
4. PRAKTILINE OSA.....	20
4.1. Töö eesmärgid	20
4.2. Materjal ja meetodika.....	21
4.2.1. Uuringu disain	21
4.2.2. Valim	21
4.2.3. <i>FLTI</i> DNK-rikka ala PCR.....	23
4.2.4. Sekveneerimine	24
4.2.5. Statistiline analüüs	25
4.3. Tulemused	25
4.3.1. DNK rikka piirkonna iseloomustus	25
4.3.2. Fragmendi pikkuse seos preeklampsia riskiga	26
4.3.3. Fragmendi pikkuse seos <i>FLTI</i> ekspressiooniga	29
4.4. Arutelu	32
4.4.1. <i>FLTI</i> DNK piirkonna mõju preeklampsiale.....	32

4.4.2. <i>FLTI</i> geeni ekspressiooni seos STRdega	33
5. KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	36
TÄNUSÕNAD	38
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
LIHTLITSENTS.....	44

1. KASUTATUD LÜHENDID

Ang-II	angiotensiin-II
ASPREE	<i>Combined Multimarker Screening and Randomized Patient Treatment with Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention</i> ; kombineeritud multimarker-sõeluuringud ja randomiseeritud patsientide ravi aspiriiniga tõenditepõhiseks preeklampsia ennetamiseks
AT1	1. tüüpi angiotensiin-II
CEU	<i>Utah residents with Northern and Western European ancestry</i> ; Põhja- ja Lääne-Euroopa päritoluga Utah elanikud
DNA	desoksüribonukleinhape
DNK-rikka	dinukleotiidkorduste rikka
eQTL	<i>expression quantitative trait loci</i> ; ekspressioonikvantitatiivsete tunnuste lookus
ET-1	endoteliin-1
<i>FLT1</i>	fms-sarnane türosiinkinaas-1
GD	<i>gestation diabetes</i> ; gestatsiooni diabeet
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> ; ülegenoomne assotsiatsiooniuuring
HELLP	<u><i>hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets</i></u> ; hemolüüs, maksaensüümide suurenenud aktiivsus ja vereliistakute vähesus veres, preeklampsia kõige tõsisem vorm
HR	<i>hazard ratio</i> , ohumäär
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i> ; emakasisene kasvupiirang
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i> ; kinaasi sisemise domeeni retseptor
LD	<i>linkage disequilibrium</i> ; geenide aheldatus
lncRNA	<i>long non coding RNA</i> , pikk mittekodeeriv RNA
LO-PE	<i>late onset preeclampsia</i> ; hiline preeklampsia
MAF	<i>minor allele frequency</i> , minoorse alleeli sagedus
NA	<i>not applicable</i> ; mitte kohaldatav
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; polümeraasi ahelreaktsioon

PE	preeklampsia
PIGF	platsenta kasvufaktor
ROS	reaktiivsed hapnikuliigid
RR	<i>relative risk</i> , riskisuhe
sEng	lahustuv endogliin
sFlt-1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase</i> ; lahustuv fms-sarnane türosiinkinaas-1
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , ühenukleotiidne polüformism
STR	<i>short tandem repeats</i> , lühikesed tandem kordusjärjestused
VEGF	veresoonte endoteeli kasvufaktor

2. SISSEJUHATUS

Igal aastal on preeklampsia ligi 70 000 ema ja 500 000 loote surma põhjustajaks maailmas (Rana et al., 2019). Kahjuks preeklampsia tekkemehhanismid ja haiguse täpne kulg pole tänase päevani lõpuni teada.

Preeklampsia tekib tavaliselt raseduse hilises faasis ja kõige tavapärasemateks tunnusteks peetakse proteinuuriat ja hüpertensiooni. Preeklampsia diagnoos määratakse juba tekkinud sümptomite põhjal, kuid nende kaudu ei ole kahjuks võimalik haigust ennetada. Preeklampsiale omaste biomarkerite, sealhulgas STRide (*short tandem repeats*), kindlaks määramine aitaks kaasa tulevikus haiguse riski määramisele.

Varasemalt on välja toodud *FLT1* geeni üleekspressioon raseduse ajal lootes ning on välja pakutud, et sFlt1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1*) valgu suurenenud tase on üks preeklampsia tekke ja progresseerumise põhjuseid. Antud valgu taseme üles reguleerimise molekulaarset mehhanismi pole veel aga täielikult välja selgitatud (Jena et al., 2020).

Esimest korda viidi läbi antud töös uuring, kus analüüsiti nii terve *FLT1* piirkonna kui ka eraldiseisvate STRide mõju preeklampsiale. Mitmed varasemad uuringud on viidanud rs149427560 STRi võimalikule seosele preeklampsiaga, kuid tulemused ei ole olnud üheselt selged (McGinnis et al., 2017; Ohwaki et al., 2020; Yoshizawa et al., 2022). Käesolevas töös anti kirjanduse põhjal ülevaade preeklampsiast ja *FLT1* geenist ning seni preeklampsiaga seostatud STRdest. Lisaks analüüsiti eksperimentaalselt nelja STRi mõju ja seost preeklampsia riskiga.

3. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

3.1. Preeklampsia

Preeklampsia (PE) on raseduse ajal tekkiv hüpertensiivne ehk kõrgvererõhu haigus, mis mõjutab igal aastal 5-8% naistest kogu maailmas (English et al., 2015). Aastal 2021 oli Eestis preeklampsia tõttu katkenud rasedusi 2,1% (Helle Karro et al., 1992-2021). Sageli on just see peamine rasedustüsistus ja võib mõjutada nii ema kui ka loodet. Peamised riskifaktorid preeklampsia tekkeks on varasem PE esinemine perekonnas, eelnev PE, diabeet, mitmikrasedus, esmasrasedus, preeklampsiaga varasemalt tüsistunud rasedus, ülekaalulisus, vanus >40 eluaasta ja eelnev hüpertensiooni olemasolu (English et al., 2015).

Preeklampsiat defineeritakse süstoolse vererõhu tõusu ≥ 140 mmHg, diastoolse rõhu tõusuga kuni ≥ 90 mmHg (varasemalt normotensiivsel patsiendil), proteinuuriaga (≥ 300 mg 24-tunnise kogumise järel) või uriinivalgu/kreatiniini suhte järgi (0,3 g/g), pärast 20 rasedusnädalat (Brown et al., 2018). Lisasümptomiteks võib olla lapse kasvupeetus või ema neerude kahjustus, mis tekib pärast kahekümnendat rasedusnädalat (Phipps et al., 2019). Preeklampsia võib kaasnedagi ka koos kroonilise hüpertensiooniga. Ligikaudu 25% naistel, kellel on eelnev krooniline hüpertensioon areneb ka preeklampsia. Preeklampsia diagnoos pannakse, kui lisaks kroonilise hüpertensiooni tunnustele on arenenud naisel ka mõni eelpool nimetatud preeklampsia tunnus (Brown et al., 2018; Rana et al., 2019).

PE-t saab jaotada diagnoosi aja järgi varajaseks PE-ks (diagnoos <34 nädalat) ning hiliseks PE-ks (diagnoos ≥ 34 nädalat) (Poon et al., 2019). Varajase preeklampsia puhul põhjustab ema veresoonte ebanormaalne ümberkujunemine platsenta väärarengut, põletikku, hüpoksiat ning sünsüüsiotrofoblastide stressi, mis põhjustab loote kasvupeetust. Hilise preeklampsia korral põhjustab samuti eelnevalt normaalse platsenta vananemine sünsüüsiotrofoblastide stressi, kuid mõjutab vähem loote kasvupiirangut (Deysenroth et al., 2020). Samuti kujuneb hilise preeklampsia korral haigus pigem kergemaks ja võib piirduda vaid hüpertensiooni ning proteinuuriaga. Haigus võib areneda kiiresti ja viia tõsiste tüsistusteni nagu ema ja loote surm (Rana et al., 2019). Samuti on varajasel preeklampsial täheldatud pikaajalisemat mõju, kus südame-veresoonkonna haigustega seotud surma risk emadel on peaaegu 10 korda suurem, võrreldes hilise algusega preeklampsia korral (Mongraw-Chaffin et al., 2010).

Tõsiste tüsistuste korral võib preeklampsiaast areneda HELLP (*hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets*) sündroom, mida iseloomustab hemolüüs, maksaensüümide

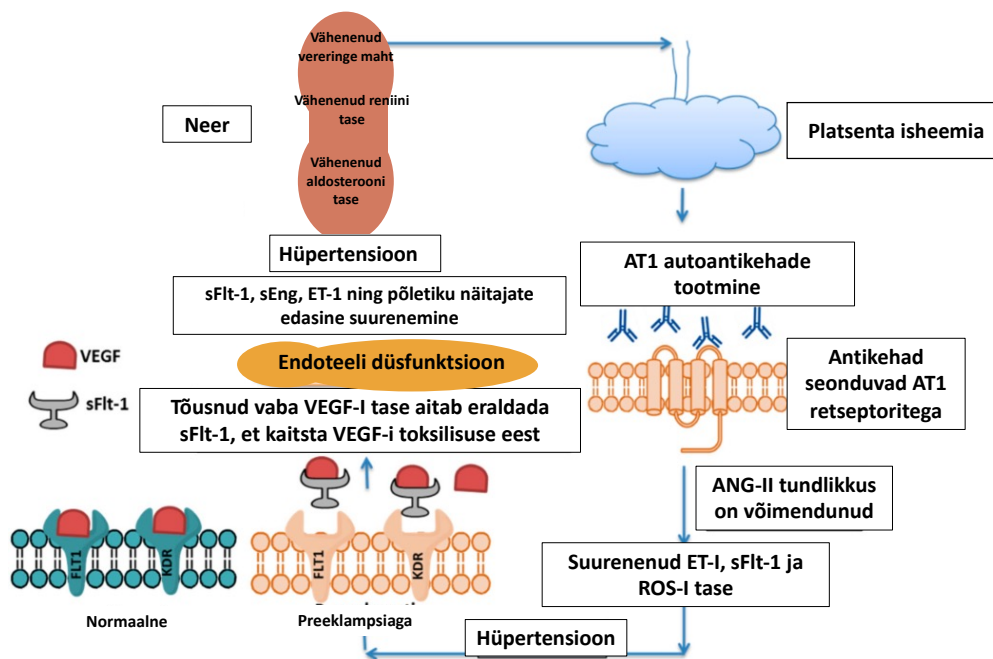
suurenenud aktiivsus ja vereliistakute vähesus veres. Antud sündroom on preeklampsia kõige tõsisem vorm (Brown et al., 2018).

3.1.1. Preeklampsia tekkemehhanismid

Preeklampsia on tihedalt seotud platsenta toimemehhanismidega. Platsenta on ajutine organ, mis koosneb trofoblastidest, mis aitavad kaasa toitainete, gaaside ja jääkainete transportimisele ema ja loote vere vahel (Gude et al., 2004). Kui normaalse raseduse korral suureneb arterite ümberkujundamisel platsenta läbivool, siis preeklampsias on see osaliselt puudulik. Juhul, kui raseduse ajal on avastatud platsenta hüpoksia näitab see, et platsenta hapnikutaseme regulatsioon ei toimi korrektselt (Sasagawa et al., 2021). Hüpoksia tagajärjeks on veresoonte ahenemine ning tulemuseks on kehaosa vere juurdevoolu vähenemine. See viib omakorda ebanormaalse platsentatsiooni ja platsenta veresoonte haigusteni, mis võivad põhjustada rasedusega seotud tüsistusi, seejuures ka preeklampsiat. (Jim & Karumanchi, 2017; Rana et al., 2019; Tomimatsu et al., 2019).

PE etioloogia pole veel lõplikult selge, kuid on teada, et selles mängib suurt rolli platsenta talitlushäire. Suuresti on see seotud spiraalarteri ümberkujunemisega ja lahustuva fms-sarnase türosiinkinaas-1 (sFlt-1), vaskulaarse endoteeli kasvufaktori (VEGF) retseptori VEGF retseptor 1 (VEGFR) lahustuva vormi, liigse vabanemisega (Jena et al., 2020).

Preeklampsia patogeneesi mehhanism algab platsenta isheemiast, mis indutseerib AT1 (1. tüüpi angiotensiin-II) autoantikehade moodustumist. See omakorda suurendab Ang-II (angiotensiin-II) tundlikust ja ET-1 (endoteliin-1), sFlt-1 (lahustuv fms-sarnane türosiinkinaas-1), ROS-de (reaktiivsed hapnikuvormid) tootmist. sFlt-1 blokeerib VEGF-i (veresoonte endoteeli kasvufaktor) seostumiste, et kaitsta loodet liigse VEGF-i toksilisuse eest. Selle tagajärjedeks on endoteeli düsfunktsioon ja neerude kahjustused (Joonis 1) (Jena et al., 2020).



Joonis 1. Platsenta isheemia indutseerib AT1 autoantikehade moodustumist. See omakorda suurendab Ang-II tundlikkust ja ET-1, sFlt-1, ROS-de tootmist. sFlt-1 blokeerib VEGF-i seostumise. Tagajärgedeks on endoteeli düsfunktsioon ja neerude kahjustused (Jena et al., 2020). AT1, 1. tüüpi angiotensiin-II; Ang-II, angiotensiin-II; ET-1, endoteliin-1; sFlt-1, lahustuv fms-sarnane türosiinkinaas-1; ROS, reaktiivsed hapnikuliigid; VEGF, veresoonte endoteeli kasvufaktor; KDR, *Kinase insert Domain Receptor*; sEng, lahustuv endogliin.

3.1.2. Pikaajalised tüsistused preeklampsiat põdevatel naistel

Enam ei pea paika arvamus, et preeklampsia on iseenesest taanduv seisund, isegi kui kõik rasedusel tekkivad sümptomid kaovad platsenta irdumisel sünnitusel. Aina rohkem saadakse juurde epidemioloogilisi andmeid, mis näitavad olulisi pikaajalisi kardiovaskulaarseid, metaboolseid, neerudega seotud probleeme ning esineb isegi surmasid. Tagajärjed võivad tekkida aastakümneid pärast preeklampsiat. On leitud, et preeklampsia võib soodustada haigete emade järglastel südame-veresoonkonna haiguste teket täiskasvanueas. Haiguse põdemine võib jätta järglaste kopsuvereringesse püsiva defekti, mis hiljem elus võib stressi korral põhjustada südame-veresoonkonna haigusi (Jim & Karumanchi, 2017).

Tabel 1. Preeklampsiaga kaasnevad riskid ema hilisemas elus.

Risk	Kirjeldus	Riskisuhe (CI 95%)	Viide
Krooniline hüpertensioon	Hüpertensioon raseduse ajal suurendab ka tulevikus hüpertensiooni riski.	3.7 (2.7-5.1)	(Bellamy et al., 2007)
Südame- veresoonkonna haigused	Isheemiline südamehaigus	2.16 (1.9-2.5)	(Bellamy et al., 2007)
	Südameatakk	1.8 (1.5-2.3)	(Bellamy et al., 2007)
	Venoosne tromboembolism emal	1.8 (1.37-2.3)	(Bellamy et al., 2007)
Neeruhaigused	Keskmine albumiini eritumise määr on 3-5 aastat pärast sünnitust oluliselt kõrgem, võrreldes normiga.	4.7 (3.6-6.1)	(Vikse et al., 2008)
Ainevahetushäired	Oht diabeedi tekkeks.	3.68 (3.04-4.46) ^a	(Jim & Karumanchi, 2017)
Surmaoht	Varajast preeklampsiat põdenud naistel on suurem surmarisk.	1.5 (1.1-2.1)	(Bellamy et al., 2007)

^a Artiklis raporteeriti HR (*hazard ratio*, ohumäär).

3.1.3. Preeklampsia geneetika

Preeklampsia ja perekondade omavahelist seost mainiti kirjanduses juba aastal 1870. See näitab PE tugevat geneetilist alust. Juhul, kui perekonnas on varem esinenud PE, suureneb sellest sõltuvalt ka naise haigestumine PE-sse. Erinevate perekondade populatsiooniuuringud näitavad selget preeklampsia ülekandumist mitmete põlvkondade kaupa (Yong et al., 2018). Preeklampsiat põdenud naiste tütaridel ja ka poegade partneritel on omakorda kõrgenenud risk PE tekkeks raseduse ajal (Ardett et al., 2001; Skjærven et al., 2005). Norras läbiviidud uuringus

kasutati riikliku sünniregistriga, mis näitas, et preeklampsiat põdenud rasedate naiste tütarde suurenemine enda haigestumise risk 2,2 korda. PE-ga rasedusest sündinud mehed suurendasid partneri haigestumist 1,5 korda. Isegi normotensiivse rasedusega sündinud õdedel, kelle õed-vennad olid põdenud PE-d, oli kaks korda suurem risk haigestuda PE-sse (Yong et al., 2018). PE esinemissagedust mõjutavad suuresti ka rass ja etniline kuuluvus. Näiteks on Aafrika-Ameerika naistel suurem risk preeklampsia tekkeks kui valgetel naistel (Shahul et al., 2015).

PE-l on keeruline geneetiline alus, mida ei saa seletada ainult lihtsa Mendeli pärandumisega. PE pärilikkus on hinnanguliselt vahemikus 31% kuni 54% (Staines-Urias et al., 2012). Ligi pooled PE-t põhjustavatest teguritest on tingitud ema geneetikast. Ülejäänud moodustab platsenta geneetika (Yong et al., 2018).

PE geneetilise tausta määramisel on kolm olulist aspekti:

1. Tuvastatud geene saab kasutada kliiniliste biomarkeritena, et tuvastada kõrge PE riskiga naisi sõeluuringu abil ning pakkuda varajast ravivõimalust ja jälgimist.
2. Geenide toimimise mõistmine annab uued teadmised seni arusaamatuks jäänud PE põhjustest.
3. Potentsiaalsed uued ravimeetodid võivad tuleneda PE paremast patogeneesi mõistmisest. See leevendab haiguse riski ja minimeerib selle mõju tulevastele põlvkondadele (Yong et al., 2018).

PE-i geneetilisi uuringuid on raskendanud siiani vastuolulised tulemused ja korratavuse puudumine, kuna geneetilisi seoseid otsitakse paljudest populatsioonidest. Esimeseks probleemiks on see, et teadmised PE etioloogiast ja patofüsioloogiast ei ole piisavad ning see mõjutab kandidaatgeenide valikut analüüsimisel. Siiski on osaliselt aidanud kogu genoomi hõlmav lähenemisviis, mis on parandanud selektsiooniprotsesse ja võimaldanud tuvastada uusi kandidaatgeene, nagu *STOX1* ja *ACVR2A*. Teiseks probleemiks on erinevate populatsioonide erinev geneetiline taust. Tõenäoliselt leidub erinevaid põhjuslikke geenivariante, mis vähendavad põhjuslikku geenivariandi uuringu korratavust. Lisaks tekitavad segadust võimalikud valepositiivsed tulemused, mis tekivad, kui uuringutel on kasutatud väikest valimit (nt. 15-124 perekonda) (Yong et al., 2018).

Võttes arvesse PE keerukust, on suure tõenäosusega tegemist mitmete geenidega, kus neil kõikidel on väike mõju mitmest funktsionaalsest rajast. Sellest lähtuvalt saab järeldada, et PE geneetilise panuse kindlakstegemisel on vaja suurt valimit ja selle saavutab ainult ülemaailmne koostöö täpselt määratletud proovidega (Gray, Kovacheva, et al., 2018; Yong et al., 2018).

Preeklampsia uurimiseks käib pidev töö uute kandidaatgeenide otsimisega. Peamised geenid, mida siiani on PEga seotud, näiteks *FLT1*, *MTHFR*, *AGT*, *F5*, *NOS3*. *MTHFR* geen asub homotsüsteiinirajas, *AGT* on vererõhu reguleerija, *F5* on osa verehüübimisrajast ning *NOS3* omab olulist rolli veresoonte laienemisel (Abbasi et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2016). Hiljuti aga avaldati McGinnis jt. poolt GWAS (ülegenoomne assotsiatsiooniuuring) artikkel, mis oli esimesi artikleid, kus keskenduti loote genoomi variantide seosele preeklampsiaga. Antud artiklis tuvastati 13. kromosoomis *FLT1* (Fms-like türosiinkinaas 1) geeni lähedal assotsiatsioonisignaali. See GWAS-i leid annab veenvaid tõendeid selle kohta, et muutused *FLT1* lookuse läheduses inimese loote genoomis on põhjuslikud preeklampsia arengus (McGinnis et al., 2017).

3.1.4. *FLT1* geen ja selle isovorm sFlt-1

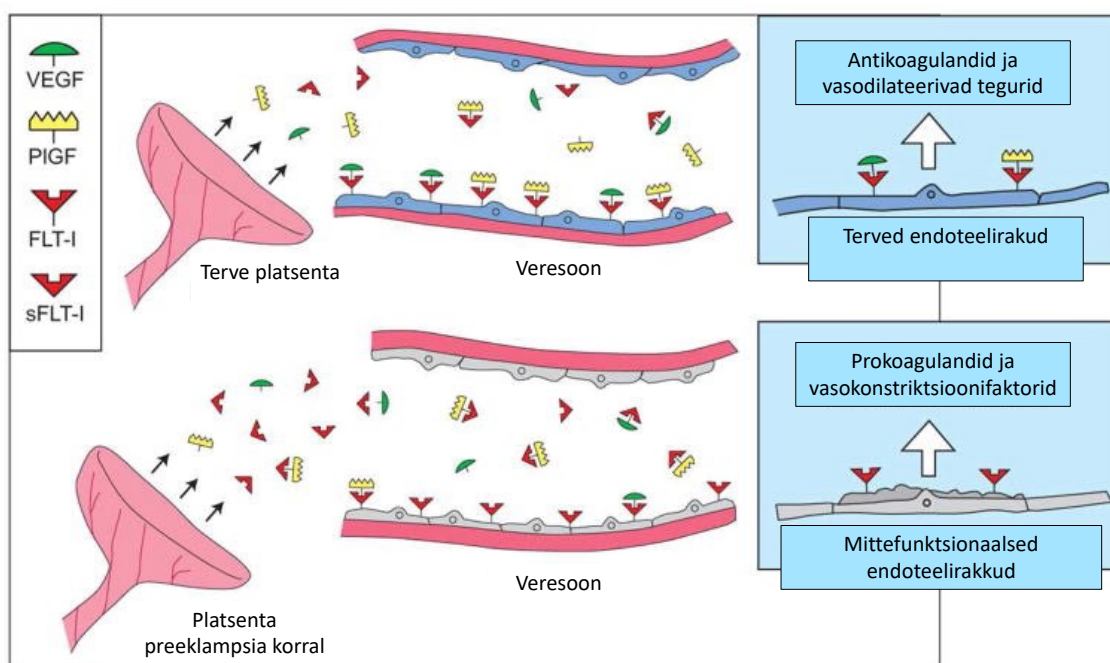
FLT1 geeni ekspresseeritakse raseduse ajal peamiselt loote trofoblastides ning selle ekspressiooni tase on preeklampsia puhul võrdlemisi kõrge. On leitud, et *FLT1* kodeerib transmembraanset türosiinkinaasi retseptorit Flt-1te, mis vahendab angiogeneesi ühendades omavahel veresoonte endoteeli kasvufaktori (VEGFA) ja platsenta kasvufaktori (PIGF). Alternatiivse splaissingu tulemusel toodetud proteiin sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1*), lahustuv vorm, mis jõuab läbi platsenta ema vereringesse, antagoniseerib angiogeneesi (Block & Biller, 2014). sFlt-1 toimib peibutusretseptorina, mis eraldab VEGFi ja takistab rakusisese signaaliülekanne algust. Üldiselt on sFlt-1 ema organismis vähe ekspresseeritud ning raseduse ajal nähtavad ekspressiooni muutused on tõenäoliselt platsenta päritolu. Seetõttu on laialdaselt aktsepteeritud, et tsirkuleeriva sFlt1 suurenenud tase võib aidata kaasa preeklampsia tekkele ja progresseerumisele, antagoniseerides VEGFi ja PIGFi aktiivsust (Joonis 2), mille tulemuseks on ema endoteeli düsfunktsioonist tingitud hüpertensioon ja proteiinuuria (Jim & Karumanchi, 2017; Sasagawa et al., 2021).

Kõrge sFlt-1 ja madal PIGF kontsentratsioon ema veres on üks varajase preeklampsia markeritest. Antud valgu kõrge tase mõjutab VEGF/PIGF suhet (Jim & Karumanchi, 2017). Siiski ei ole preeklampsia korral sFlt-1 ülesreguleerimise aluseks olevat molekulaarset mehhanismi veel täielikult välja selgitatud (Jena et al., 2020).

Välja on toodud ka, et neeru kapillaaride endoteel on väga tundlik VEGF-i suhtes, mis on vajalik neerude filtreerimisvõime säilitamiseks. See võib selgitada, miks preeklampsiast põhjustatud neerufunktsiooni häired (proteiinuuria ja hüpertensioon) on haiguse oluline ja varajane marker (Block & Biller, 2014). On ka tõendeid, et *FLT1* polümorfismid on tugevalt

seotud hilise preeklampsiaga, mis viitab sellele, et trofoblastide funktsioon on samuti oluline (McGinnis et al., 2017).

Juba varem mainitud McGinnis jt. uuringus leiti seos *FLT1* geeni lähedal asuvate kahe SNPga (rs4769613, rs12050029) ja põgusalt mainiti ka STR rs149427560 seost preeklampsiaga, kuigi edasistesse uuringutesse seda ei kaasatud (McGinnis et al., 2017). Ka teistes hilisemates uuringutes on kinnitatud STR rs149427560 lühema fragmendi (474/476; 474 kui lühem alleel) pikkuse seost preeklampsiaga ning välja on toodud ka rs149427560 homosügooti (476/476) seos *MG828507* lncRNAGA (Ohwaki et al., 2020; Yoshizawa et al., 2022).



Joonis 2. Terve platsenta korral saavad antikoagulandid ja vasodilateerivad tegurid kinnituda endoteeli rakkudele, mis tagavad organi normaalse talitluse. Preeklampsia korral kinnitub sFlt-1 enne PlGFi ja VEGFiga, kui need endoteelirakkudeni jõuavad. Seetõttu nad enam Flt-1-ga kinnituda ei saa ning tulemuseks on mittefunktsionaalsed endoteelirakud ja organi düsfunktsioon (Gray, Saxena, et al., 2018). Rohkem koguneb prokoagulante ja vasokonstriksioonifaktoreid. *FLT1*, geen; sFlt-1, Flt-1 isovorm, PlGF, platsenta kasvufaktori; VEGF, veresoonte endoteeli kasvufaktor.

3.1.5. Preeklampsia ravi ja ennetamine

Tänapäeval on ainus lõplik ravivõimalus loote sünnitamine, kuigi käib pidev töö uudsete ravimeetodite väljatöötamisel, mis tunduvad paljutöotavad (Phipps et al., 2019). Raseduse esimestel trimestritel viiakse läbi küll loote sõeluuringud, kuid nende uuringute abil ei ole võimalik preeklampsia täpset teket kahjuks ennustada. Uuringud ei tuvasta preeklampsia teket,

kuid suudavad siiski ennustada ema riskifaktoreid, mille põhjal määratakse ravimid, mis hoiavad ära varajase preeklampsia tekke ja leevendavad preeklampsia tunnuseid (Brown et al., 2018).

ASPREE (*Combined Multimarker Screening and Randomized Patient Treatment with Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention*) uuringus avastati, et aspiriin vähendab märkimisväärselt enneaegse PE esinemissagedust (Shen et al., 2021). Ka teistest uuringutes on näidatud, et aspiriini manustamine aitab ära hoida preeklampsiat ja emakasisest kasvupiirangu (IUGR ehk *Intrauterine growth restriction*) esinemissagedust (Jim & Karumanchi, 2017; Roberge et al., 2018). Kahjuks ei ole avaldatud uuringuid, mis näitaks aspiriiniravi kasulikkust mõju, kuid kõrge haigestumise riskiga naistel soovitatakse võtta siiski raseduse vältel väikestes kogustes aspiriini (Phipps et al., 2019).

Tähtsaks peetakse ka magneesiumi manustamist. Tihti võivad patsienti vaevata krampid, mille täpne patogenees on ebaselge. Enamjaolt esinevad need eklampsia puhul, kuid võivad kaasneda ka preeklampsiaga. Krampide ärahoidmiseks manustatakse magneesium sulfaati, mis on tõhus ja aitab kaasa loote neuroproteksioonile, kuid mille toimemehhanism teadmata (Brown et al., 2018; Jim & Karumanchi, 2017).

Uuritud on ka erinevate antioksidantide ravivõimalusi preeklampsiale. PE ennetamisel C- ja E-vitamiini kasutamine oksüdatiivse stressi allika leevendamiseks ei ole andnud tõhusaid tulemusi (Phipps et al., 2019). Samuti on uuritud statiinravi, mis parandab veresoonte funktsiooni ning vähendab sFlt-1 produktsiooni. On leitud, et statiinravi kasutamine võib haigust nõrgendada ja vähendada ema ning loote kahjulikke tagajärgi. Neid on kasutatud vähestes loomudelites, kuid need on andnud paljulubavaid tulemusi (Phipps et al., 2019).

3.1.5.1. sFlt-1 kui terapeutiline sihtmärk

Üheks preeklampsia ravimeetodiks on sFlt-1 kasutamine terapeutilise sihtmärgina. Mitmeid väljatöötamisel olevaid ravimeetodeid, mis on väljatöötamisel, suunatakse just sFlt-1-le. Need hõlmavad näiteks rekombinantse sFlt-1 ligandi rPIGF-i infusioone ning tsirkuleeriva sFlt-1 eemaldumist verest. Mõlemad mehhanismid potentsiaalselt leevendavad ema haigust ning pikendavad rasedust (Lemoine & Thadhani, 2019).

3.2. Mikrosatelliidid kui geneetilised markerid

Umbes 3 miljoni nukleotiidi hulgas inimese genoomis on piirkondi, kus asub mitu lühikeste korduvate järjestuste koopiit. Igal indiviidil esineb erinev arv kordusi. Selliseid piirkondi nimetatakse "lühikesteks tandemkordusteks" (STR, *short tandem repeats*) (Shbair et al., 2021). Mikrosatelliidid on korduvad DNA järjestused, mille pikkuseks on tavaliselt 1-10 aluspaari ning katavad hinnanguliselt umbes 3% inimese genoomist (Dumbovic et al., 2017). STRid koosnevad üldiselt mittekodeerivast DNAST ega ole geenide osad. Peamiselt kasutatakse neid geneetiliste markeritena, et jälgida geenide pärandumist perekondades (Shbair et al., 2021).

Enam kui 25 pärilikku haigust on põhjustatud STR ebastabiilsest laienemisest. Küsimusele, miks osad STRid on vastuvõtlikud patoloogilisele laienemisele samas kui tuhanded ülejäänud STRid on suhteliselt stabiilsed, pole siiani vastust leitud. Tervetel inimestel on kümneid tuhandeid STRe kogu nende genoomis. Normaalse pikkusega STRid on üldiselt stabiilsed, kuid väike osa neist võivad läbida mitoosis järsu korduste arvu laienemise ning jõuda mutatsioonieelsele või haiguspõhjusliku korduste arvuni. Peamised haigused, mille põhjustavad STRid on näiteks Fragiilse X-i sündroom, Huntingtoni tõbi ja Friedreichi ataksia. Patsiendid kannatavad mitmesuguste sümptomite all nagu näiteks südamerikked, ärevus, madal IQ, hingamisraskused, krambid vms (Sun et al., 2018).

Mikrosatelliidid paiknevad tavaliselt intergeenses järjestuses ilma ilmselge funktsionaalse tähtsusega ning eeldatakse, et selle korduse spetsiifilised alleelid võivad olla aheldunud lähedalasuva polümorfismiga, mis mõjutab haiguse vastuvõtlikkust. Korea rahvastikus uuriti *FLT1* geeni 3' otsas korduvat dinukleotiidi $(TG)_n$ (asukoht; chr13:28300509-28300557) polümorfismi preeklampsia patsientidel. Kuid *FLT1* $(TG)_n$ polümorfismi alleeli sagedused ei olnud seotud Korea naistes preeklampsia tekkega (Kim et al., 2008). Yoshizawa jt. avaldatud artiklis uuriti MG828507 lncRNA seost STR rs149427560-ga ning täheldati, et homosügootide (476/476) proovid preeklampsia korral näitasid oluliselt kõrgemat MG828507 ekspressiooni taset ($p < 0,05$) (Yoshizawa et al., 2022). Antud STR võib toimida ekspressioonikvantitatiivsete tunnuste lookusena (eQTL) ja seeläbi mõjutada *FLT1* geeni ekspressiooni muutust. Antud geeni ekspressiooni muutus võib põhjustada suuremat preeklampsia tõenäosust (McGinnis et al., 2017; Ohwaki et al., 2020; Yoshizawa et al., 2022).

Võttes arvesse *FLT1* geeni olulist rolli raseduse ajal, võivad olla selle geeni funktsionaalsed polümorfismid potentsiaalselt olulised geneetilised markerid preeklampsia puhul (Kim et al., 2008; Turecki et al., 1998).

3.3. Meetodid STRide tuvastamiseks

Erinevate STR variantide tuvastamiseks on kasutusel mitmed meetodid. Meetod valitakse vastavalt informatsioonile, mida soovitakse teada. Iga meetodi puhul esineb nii eeliseid kui puuduseid. Tabelis 2 on välja toodud erinevate meetodite omavaheline võrdlus. Kõige kiirem ja odavam on PCR meetod, millega saame teada DNA fragmentide pikkuse. PCRs kasutatavalt agarosgeelilt ei ole aga võimalik eristada väikseid pikkuste erinevusi, mida eeldame *FLTI* dinukleotiidvariantide puhul. Sangeri sekveneerimine on mahukam ja aeglasem meetod, millega saab teada DNA järjestuse. Sekveneerimisega saame määrata erinevate STRide alleeli pikkuseid. Kõige töömahukamaks meetodiks on kloneerimine, kuid sellega saab määrata täpse haplotüübi. Kloneerimine on ka kõige kallim meetod, kuna ühe indiviidi kohta on vaja sekveneerida vähemalt 10 klooni, et kindlustada mõlema alleeli esinemine kloonides. Võrreldes lihtsa sekveneerimisega, kus indiviidi kohta sekveneeritakse vaid üks proov. Viimaseks on fragmentanalüüs, mille hind on sarnane PCRga, kuid antud meetodiga saab tuvastada DNA pikkust ja ühe nukleotiidseid erinevusi. Fragmentanalüüs on hea meetod väikeste pikkuste eristamiseks ning sellepärast on see hea ka *FLTI* dinukleotiidvariantide määramiseks.

Tabel 2. Erinevad meetodid STRde tuvastamiseks.

Meetod	Täpsus	Vajaminevad materjalid	Eelised	Puudused	Hind ^a	Viited
PCR + agarosgeel	Tuvastab fragmendi pikkuse	Praimerid, DNA polümeraas, DNA nukleotiidid, genoomne DNA, PCR puhver, agarosgeel-elektroforees	1. lihtne, kiire, odav 2. vajab väikest kogust DNA-d (ng)	1. praimerite disainimiseks on vaja teada DNA järjestust. 2. oht kontaminatsioonile 3. limiteeritud amplikoni pikkus	\$	(Lynn B. Jorde, n.d.)
Sanger sekveneerimine	Tuvastab fragmendi järjestuse.	PCR komponendid, fluorestseeruva märgisega dideoksünukleotiidid	1. saab tuvastada ka ühenukleotiidseid variante 2. saab teada täpse DNA järjestuse	1. veaohlik 2. aeglane 3. töömahukas ei erista indiviidi erinevaid allelele	\$\$	(Lynn B. Jorde, n.d.)
Kloneerimine koos Sangeri sekveneerimisega	Saab teada täpse haplotüübi.	Endonukleaasid, plasmiidid, bakter (kus plasmide	Võimaldab eristada indiviidi erinevaid allelele	1. vajab DNA-d (µg), rohkem võrreldes PCR-ga 2. kallis	\$\$\$	(Lynn B. Jorde, n.d.)

		paljundatakse, rakkude paljunemisel)				
Fragmentanalüüs	Tuvastab pikkuse erinevusi juba alates ühest nukleotiidist	PCR komponendid, fluorestsentsmärgisega praimeripaar, kapillaar- elektroforees, pikkusmarkerite komplekt	1. odav, kiire Võimaldab eristada indiviidi erinevaid allele	Ei tuvasta täpset asukohta, kus muutus on toimunud	\$\$/\$\$	(ThermoFi sher Scientific, 2012)

^a Erinevate analüüside läbiviimise kulukuse võrdlus.

4. PRAKTILINE OSA

4.1. Töö eesmärgid

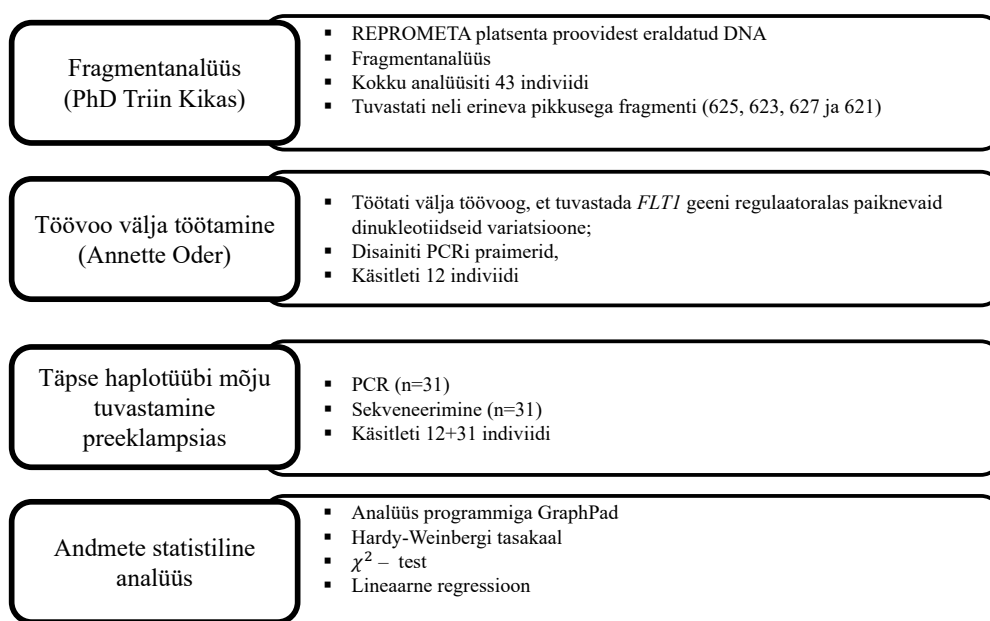
Töö üldine eesmärk on anda detailne ülevaade *FLT1* geeni DNK-rikka (dinukleotiidkorduste) regulaatorala haplotüüpide esinemisest preeklamptilistes platsentades. Töö spetsiifilisemad eesmärgid on:

- a) anda ülevaade preeklampsias ja *FLT1* geeni mõjust selle riskile;
- b) tuvastada indiviidide täpse haplotüübi mõju preeklampsia riskile ning *FLT1* ekspressioonile.

4.2. Materjal ja metoodika

4.2.1. Uuringu disain

Antud töö põhineb varasemalt Triin Kikase poolt juhendatud uuringul, mille eesmärk oli tuvastada *FLT1* geeni regulaatoralas olevaid dinukleotiidi korduseid (Oder, 2021). Eelnevalt on fragmentanalüüsil (Chr13:28,531,348-28,531,969) tuvastatud neli erineva pikkusega fragmenti (621, 623, 625 ja 627) 43 indiviidi seas. Varasema töö autor Annette Oder töötas välja töövoogu antud piirkonna sekveneerimiseks ning tuvastas 12 indiviidil täpse haplotüübi. Varasemalt tehtud 12 sekveneerimisele analüüsiti lisaks 31 indiviidi ja kõik individid kaasati edasisesse analüüsidesse. (Joonis 3)



Joonis 3. Metoodiline tööskema teostatud etappidest.

4.2.2. Valim

Uuringus kasutati proove REPROMETA ehk “REPROgrammeeritud loote ja/või ema METAbolismi” andmekogust. Valim koguti aastatel 2006-2011 koostöös SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Naistekliinikuga. REPROMETA valim sisaldab perekondade (n=366) bioloogilist informatsiooni ning uuringus keskenduti rasedusaegsetele tüsistustele. Peamisteks rasedusaegseteks tüsistusteks olid preeklampsia, gestatsioonidiabeet ja gestatsiooniaja kohta liiga väikesed või suured vastsündinud. Valimis olevad individid, on jaotatud alagruppideks sünnikaalu ning raseduskomplikatsiooni puudumise/olemasolu alusel. Normaalsel rasedusel

puudusid hilised raseduskomplikatsioonid ning vastsündinu kaal määrati >10 ja <90 protsentiili kasvukõvera alusel.

Kõik uuringus osalejad kinnitasid oma nõusolekut kirjalikult. Uuring on kinnitanud Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee poolt (volitus no. 146/18, 27. veebruar, 2006; 150/33, 18. juuni, 2006; 158/80, 26. märts, 2007; 221/T-6, 17. detsember, 2012; 286/M-18, 15. oktoober, 2018). Uuring viidi läbi vastavalt Helsingi deklaratsiooni juhistele. Hiljuti on antud valimit kirjeldatud järgnevatel töödes: Kikas jt, 2019; Sõber jt, 2015.

Käesolevas töös käsitletakse kõiki 43 indiviidi, kellest 23 on preeklampsilise rasedusega ning 20 normaalse rasedusega. Vastsündinute ning ema kliiniliste parameetrite kirjeldus on toodud tabelis 3.

4.2.2.1. *FLT1* geeniekspressiooni andmed

FLT1 geeni ekspressiooni andmed pärinevad varasemalt avaldatud uuringust, kus teostati *FLT1* ekspressiooni määramine nii RNA sekveneerimisel (*FLT1*_{RNAseq}) kui RT-qPCRiga (*FLT1*_{RTqPCR}) (Sõber jt, 2015).

RNA sekveneerimine viidi läbi Soome molekulaarse meditsiini instituudi (Finnish Institute of Molecular Medicine; FIMM) sekveneerimise osakonna poolt, kasutades Illumina HiSeq 2000 platvormi. Analüüsis kasutati normaliseeritud lugemite arvu proovi kõigi lugemite suhtes. RT-qPCR viidi läbi eeldisainitud TaqMani geeniekspressiooni praimeritega. Kõigis katsetes kasutati kontrollina majapidamisgeeni *Ubiquitin C* (UBC). Ekspressiooni määramiseks kasutati suhtelise CT meetodit.

Antud töös kasutati 13 indiviidi ekspressiooniandmeid. 13 indiviidil oli saadaval *FLT1*_{RTqPCR} andmed ning neist 12 indiviidil *FLT1*_{RNA} andmed (Sõber, Reiman, Kikas, Rull, Inno, Vaas, Teesalu, Marti, et al., 2015).

Tabel 3. Emade ja laste valimi parameetrite keskmised väärtused.

	Ühik	Norm	PE	P-väärtus ^a
<i>Emade parameetrid</i>				
Vanus	aasta	28,1± 6,4	27,1±7,3	0,67
Pikkus	cm	166,2±6,6	167,6±4,9	0,41
Kaal	kg	65,6±14,5	71,3±14,7	0,21
Gestatsiooniaeg	päev	274,1±7,5	244±21,0	<0,0001
Keisrilõige/vaginaalne sünnitus (erakC/planC/vag)	n	1/3/16	18/5	0,0001
<i>Vastsündinute parameetrid</i>				
Sünnikaal	g	3511,15±447,45	2162,27±738,53	<0,0001
Sugu (N/M)	n	9/11	11/12	0,85
Sünnipikkus	cm	50,35±1,65	45,1±3,82	<0,0001
Platsenta kaal	g	544,53±139,23	544,53±104,43	0,0009
Ponderaal indeks	kg/m ³	2,75±0,26	2,42±0,34	0,0016

Norm, normaalne rasedus; PE, preeklamptiline rasedus; erakC, erakorraline keisrilõige; planC, planeeritud keisrilõige; vag, vaginaalne sünnitus.

^a P-väärtus, mis on leitud Student T-testiga (pidevad tunnused), χ^2 testiga.

4.2.3. *FLT1* DNK-rikka ala PCR

Antud uurimistöös viidi läbi PCR *FLT1* DNK-rikka ala amplifitseerimiseks (n=31). Töös kasutatud töövoog oli disainitud Annette Oderi poolt bakalauruse töö raames (Oder, 2021). Varasemalt väljatöötatud PCR töövoog protokoll on välja toodud tabelis 4 ja programm joonisel 4. PCR produkti olemasolu kontrolliti 2% agarosgeelil (0,5x TBE).

Tabel 4. PCR praimeritega.

Reagentid	Kogus (μ l) 25 μ l kohta
DNA	1 (50ng/ μ l)
Solis Biodyne HOT FIREPol Taq DNA polümeraas	0,2 (U/ μ l)
Thermo Scientific MgCl ₂	2,5 (25mM)
Solis Biodyne dNTP	2,5 (20mM)
Solis Biodyne 10x reaktsiooni puhver (NH ₄)SO ₂ -ga	2,5
Vasak praimer	1 (10 μ M)
Parem praimer	1 (10 μ M)
Vesi	14,8

Algne denaturatsioon	95°	15 min	} 35 tsüklit
Denaturatsioon	95°	20 sek	
Praimerite seondumine	47°	30 sek	
Ekstensioon	72°	50 sek	
Inkubatsioon	72°	10 min	
Säilitamine	4°		

Joonis 4. PCR2 praimerite PCR programm.

4.2.4. Sekvenerimine

Proovid sekveneriti (Chr13:28531334-28532146; n=31) Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris, kasutades keerulise matriitsi sekvenerimist. PCR produktile teostati enne

sekveneerimist ka SAP/exo töötlus. Sekveneerimistulemuste vaatlemiseks ja analüüsimiseks kasutati SnapGene programmi (versioon 6.2.1).

4.2.5. Statistiline analüüs

Kahe olulisema STRi jaoks arvutati HWE (Hardy-Weinbergi tasakaal). Fragmendi pikkuse seost normaalse ja preeklamptilise rasedusega analüüsiti kasutades χ^2 testi.

Fragmendi pikkuse seose uurimiseks *FLTI* geeni ekspressiooniga viidi läbi T-test ning lineaarne regressioon.

Kõik statistilised analüüsid teostati programmiga GraphPad Prism (v9.5.1). Statistilise olulisuse määraks peeti $p < 0,05$.

4.3. Tulemused

4.3.1. DNK rikka piirkonna iseloomustus

Sekveneeriti *FLTI* geeni lähedal asuv DNK-rikka ala piirkond, mis sisaldab 4 STRi (rs149427560; rs58800262; rs138006164; rs200749017) (Joonis 5). Antud piirkonna sekveneeritava DNK-rikka ala piirkonna referents pikkuseks oli 480 bp. Võimalikud saadud alleelid olid lühike (476/478, n=14) ja norm (480/482, n=72). Sekveneerimine õnnestus kõigil indiviididel (n=31, 100%). Sekveneerimistulemuste kattuvus fragmentanalüüsist saadud tulemustega oli 93,02%. Kolm indiviidi ei olnud vastavuses fragmentanalüüsiga (indiviidi ID N133, N140 ja N159). Sekveneerimistulemusi analüüsides tuvastati muutused, mis viitavad kahe eri pikkusega alleeli olemasolule, fragmentanalüüsiga tuvastati aga ainult üks pikkus. Lisaks tuvastas sekveneerimine, et kolmel indiviidil (N182, N215, P727) on toimunud rohkem kui üks korduste arvu muutus analüüsis olevatest STRidest. Kasutades fragmentanalüüsi saab järeldada, et muutused on kõigil kolmel toimunud sama kromosoomi peal. Kuna indiviidid, kellel oli toimunud samal ahelal nii lühenemine kui pikenemine näitas fragmentanalüüs normaalset pikkus.

Antud töös kasutatud valimis on rs149427560 sagedus kõrgem kui üldpopulatsioonis. Võimalik, et selle kõrgem sagedus on tingitud PE-st, mis on meie valimis sagedasem kui tavaliselt üldpopulatsioonis või väiksest valimist. Üldine populatsioon on heterogeensem grupp ja hõlmab rohkem terveid inimesi (Tabel 5). Kõige sagedasemad uuritud variantidest on rs149427560 ja rs58800262 (MAF 8,1%; 8,1%, vastavalt populatsioonis 4,0%; 8,6%).

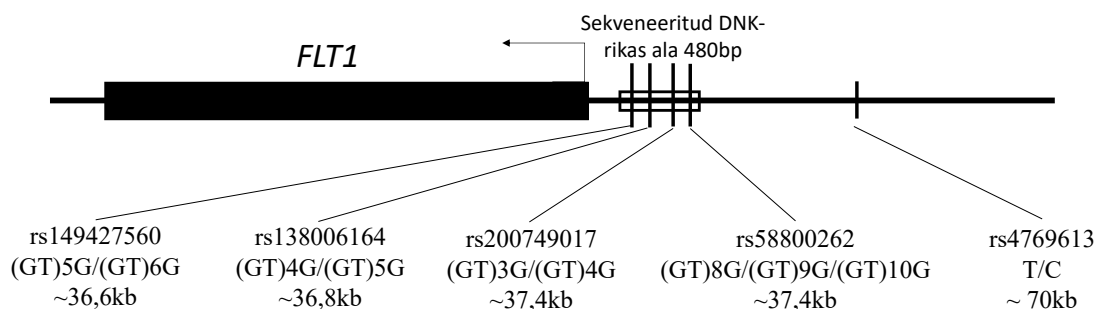
Variantide rs138006164 ja rs200749017 esinemissagedused osutusid antud töös kasutatud valimis liiga madalaks, et kaasata edasistesse analüüsidesse.

4.3.2. Fragmendi pikkuse seos preeklampsia riskiga

Läbiviidud töös analüüsiti omavahel fragmendi pikkuse, rs149427560 pikkuse ja rs58800262 pikkuse seost preeklampsia ja normaalse rasedusega. Võrreldes üldist fragmendi pikkust preeklamptilise ja normaalse platsentaga leiti, et lühikest alleeli (fragmendi pikkus 476/478) esineb PE grupis poolteist korda enam kui normaalses platsentas (n=9 (19.6%) vs. 5 (12.5%), vastavalt), kuid statistilist olulisust nende vahel ei esinenud (χ^2 test, P=0,38). (Joonis 6A)

Samuti vaadati seost rs149427560 lühenenud (5) ja normaalse alleeli variandi (6) ning rs58800262 lühenenud (8) ja normaalse alleeli variandi (9/10) seost preeklamptilise ja normaalse platsentaga (Joonis 6B-C). Statistiliselt olulist erinevust nende kahe grupi vahel ei esinenud.

Testiti, kas ka rs4769613 mõjutab DNK-rikka ala pikkust, kuna varasemalt on McGinnis jt. artiklis välja toodud SNP rs4769613 seos preeklampsiaga. Analüüsi läbiviimisel võeti arvesse minoorse alleeli esinemist ja fragmendi pikkust ning selle läbiviimisel selgus, et omavaheline seos neil puudub (χ^2 test, P=0,50).



Joonis 5. Nelja STRi (rs149427560; rs58800262; rs138006164; rs200749017) ja ühe SNPi (rs4769613) kaugus *FLT1* geenist.

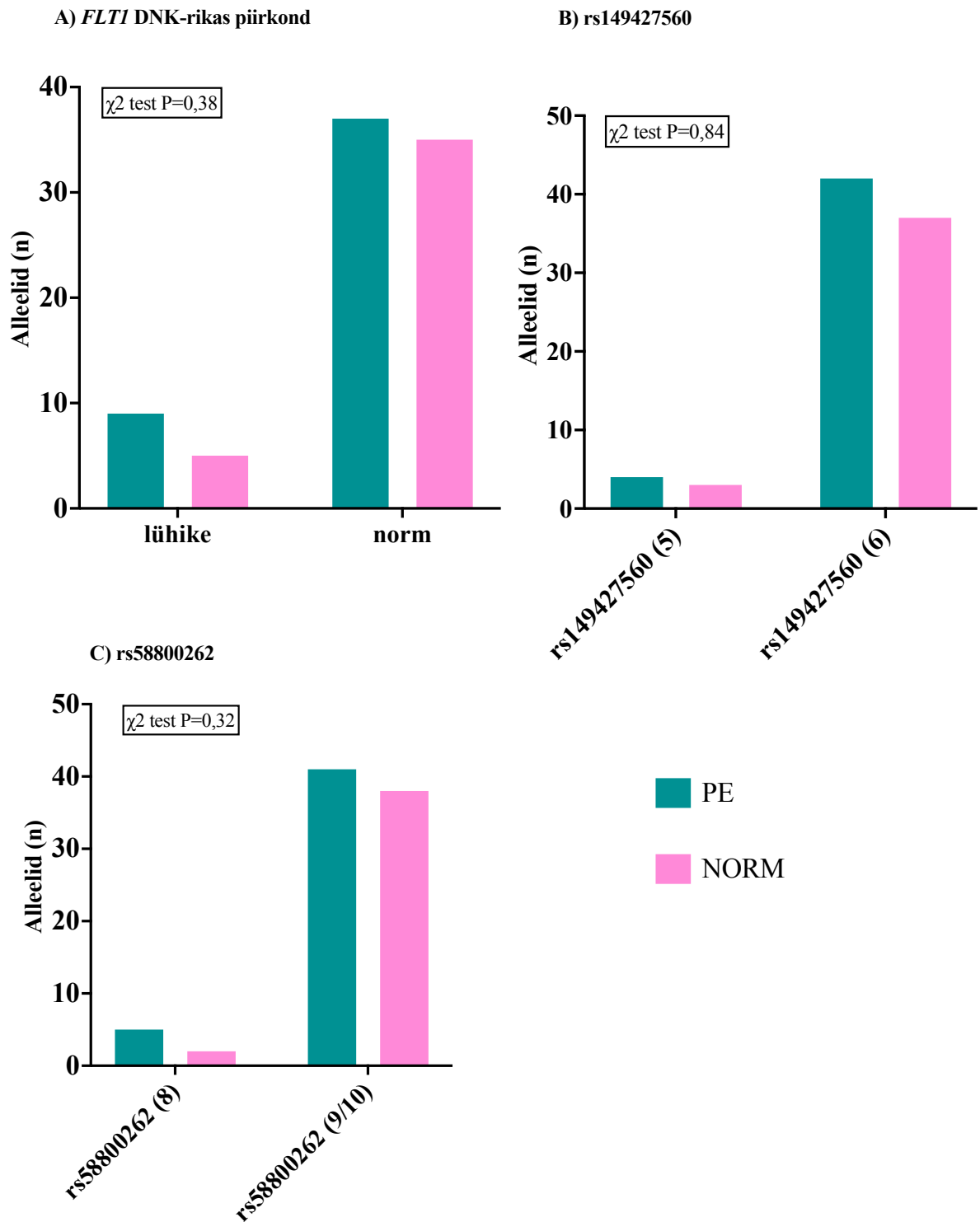
Tabel 5. DNK ja kogu reguleeriva piirkonna sagedused antud valimis ning Euroopa populatsioonis.

	Min. alleel	MAF (%)	Min. alleel	MAF2 (%)	HWE	Pop. sagedus ^a	Pop. sagedus 2 ^a
rs149427560	(GT)5G	8,14	NA	NA	p=0,35	4,0%	NA
rs138006164	(GT)4G	2,32	NA	NA		3,5%	NA
rs200749017	(GT)3G	1,16	NA	NA		2,5%	NA
rs58800262	(GT)8G	8,14	(GT)10G	12,79	p=0,84	8,6%	16,2%
Fragmendi pikkus^b	476/478	15,12	482	9,3		NA	NA

Min. alleel, minoorne alleel; MAF, minor allele frequency, minoorse alleeli sagedus; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium, Hardy-Weinberg tasakaal; pop. Sagedus, populatsiooni sagedus, NA – *not applicable*, andmed puuduvad.

^a Populatsiooniks kasutati 1000 genoomi projekti CEU (*Utah residents with Northern and Western European ancestry*) populatsiooni andmeid Ensembl (v109) andmebaasist.

^b Sekvenerimisel tuvastatud DNK-rikka ala pikkus.



Joonis 6. *FLTI* DNK rikka piirkonna (A), rs149427560 (B) ja rs58800262 (C) alleelide jaotus platsentades kaasuva preeklampsiaga võrrelduna normaalsete rasedustega.

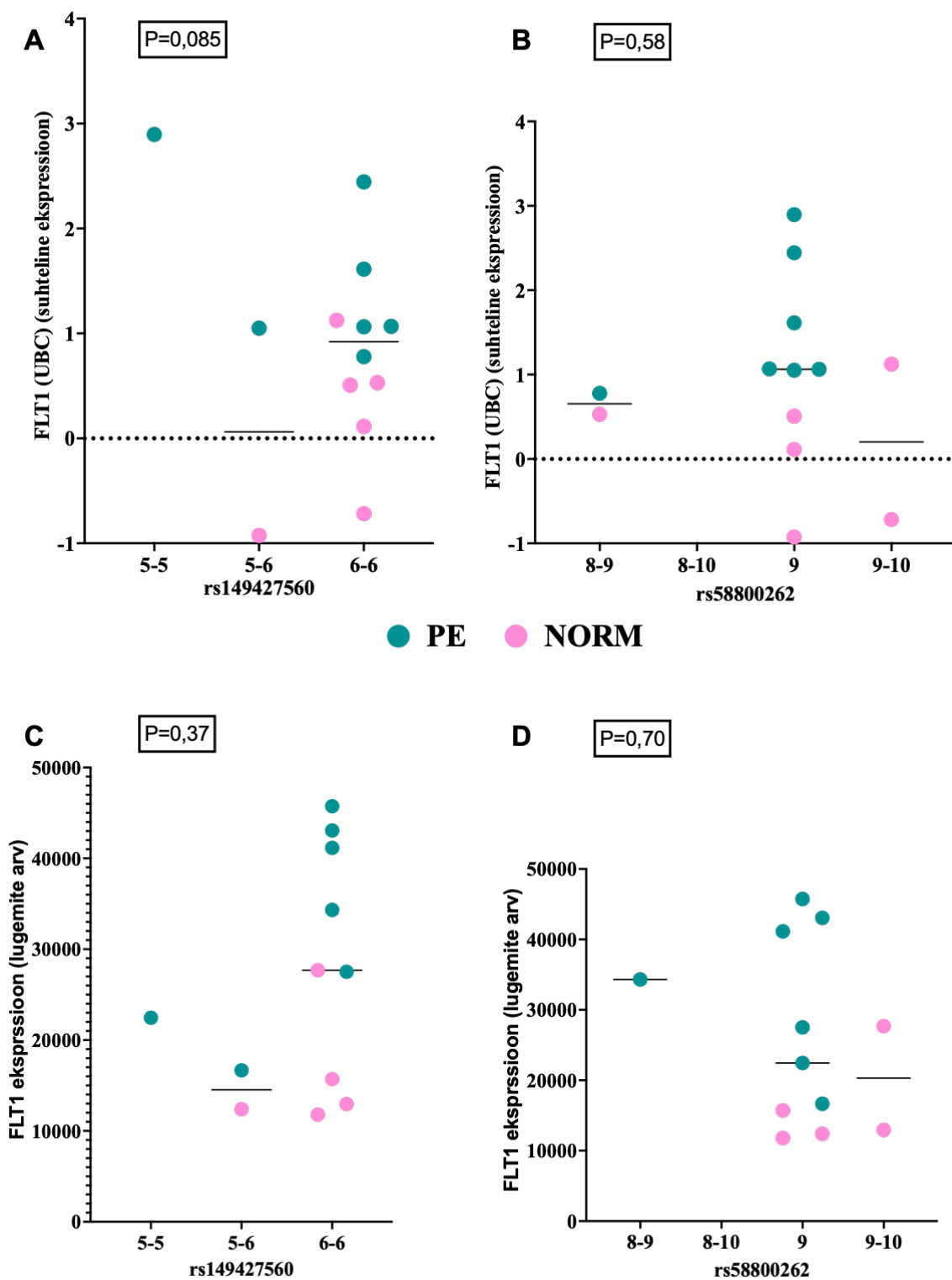
4.3.3. Fragmendi pikkuse seos *FLT1* ekspressiooniga

Algselt uuriti genotüübi seost *FLT1* ekspressiooniga, kasutades varasemalt avaldatud *FLT1* ekspressiooniandmeid (*FLT1*_{RNAseq} ja *FLT1*_{RTqPCR}, (Söber et al., 2015)). Viidi läbi *ANOVA oneway* dispersioonanalüüs uurimaks, kas erinevate genotüüpide puhul esineb erisusi *FLT1* ekspressioonis.

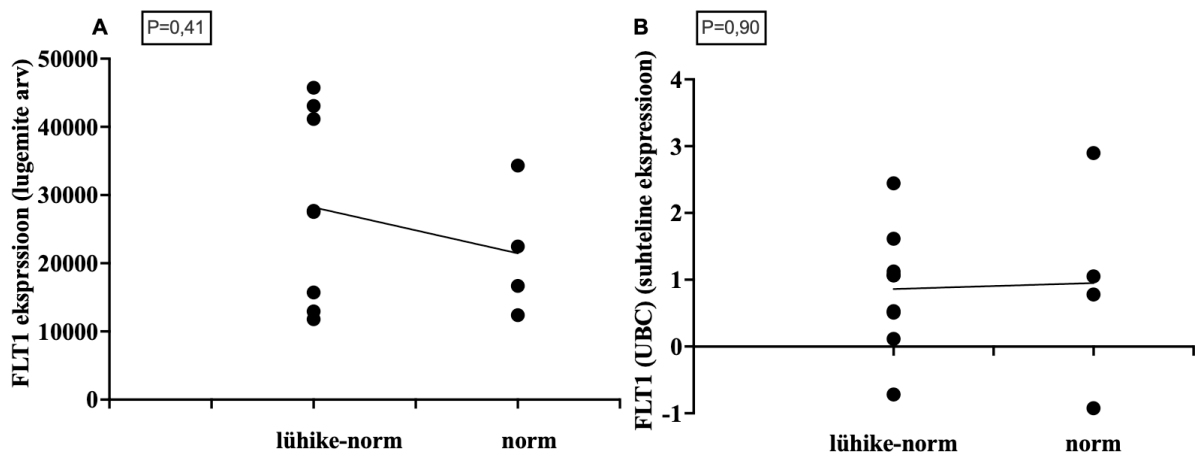
Statistiliselt olulisi tulemusi rs149427560 ja rs58800262 genotüüpide ning *FLT1*_{RNAseq} (P=0,37; P=0,70, vastavalt) ja *FLT1*_{RTqPCR} andmete vahel ei esinenud (P=0,084; P=0,58, vastavalt). Siiski täheldati rs149427560 puhul teatav trendi, kus genotüübi 5/6 korral esines madalam ekspressioonitase. (Joonis 7)

Töös analüüsiti ka fragmendi pikkuse seost *FLT1* ekspressiooniga, et teada saada, kas üldine fragmendi pikkus mõjutab ekspressiooni taset. Selleks kasutati varasemalt avaldatud andmeid (*FLT1*_{RNAseq} ja *FLT1*_{RTqPCR}, (Söber et al., 2015)). Fragmendi pikkused jagati vastavalt lühenenud alleeli esinemisele või puudumisele. Kuna lühike-lühike (478/478) fragmendi pikkust esines vaid üks kord, lisati see lühike-norm (478/480) alla. Kasutades lineaarset regressiooni, analüüsiti, kas kahe muutuja, fragmendi pikkuse ja *FLT1* ekspressiooni, vahel esineb omavahelist seost. Fragmendi pikkus määratleti arvuliselt, kus lühenenud alleel oli märgitud arvuga üks ja selle mitte esinemisel kasutati arvu 0. Statistiliselt olulist tulemust ei leitud (P=0,41, *FLT1*_{RNAseq}; P=0,90, *FLT1*_{RTqPCR}; Joonis 8).

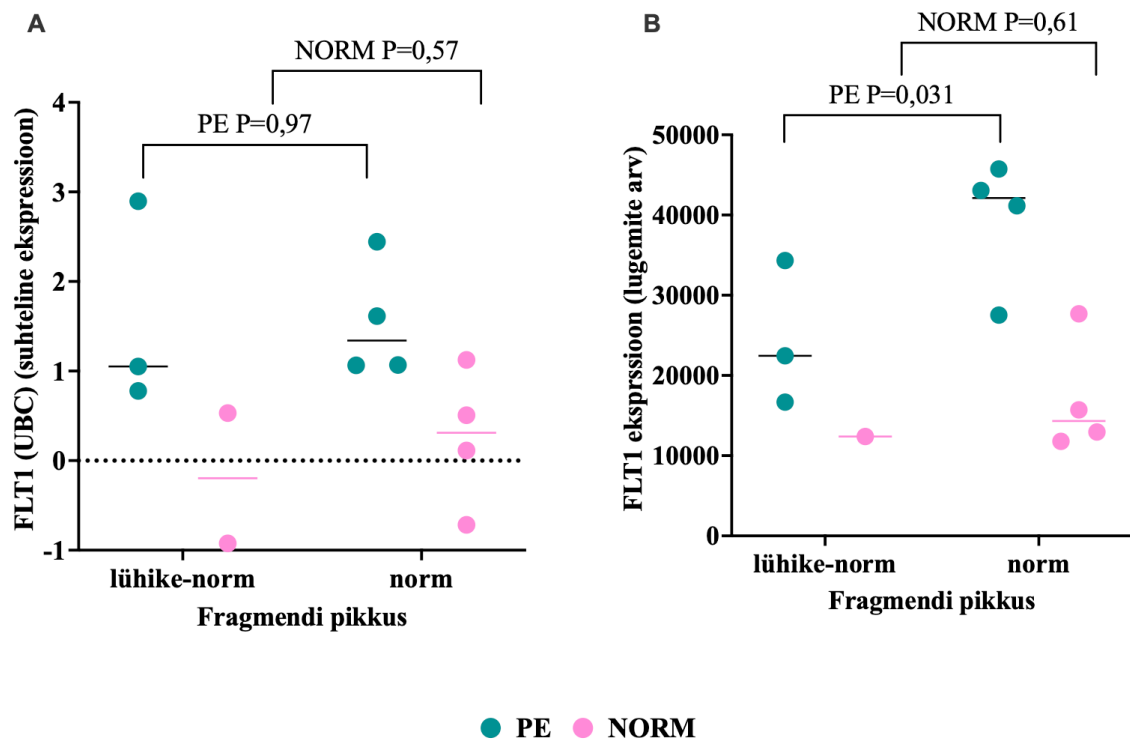
Järgnevalt võrreldi DNK-rikka ala fragmendi pikkuse seost *FLT1* ekspressiooniga alagruppides eraldi, sest preeklampsiaga indiviididel osutus *FLT1* ekspressiooni tase ootuspäraselt ühtlaselt kõrgemaks võrreldes normaalsete indiviididega. Kasutades T-testi, leiti, et lühike fragmendi pikkus on preeklampsia grupis seotud madalama *FLT1*_{RNAseq} ekspressiooniga (P=0,031). Samuti analüüsiti *FLT1*_{RNAseq} ekspressiooni normaalse raseduse grupis, kuid antud kahe tunnuse vahel statistilist seost ei ole (P=0,61) (Joonis 8). T-testiga analüüsiti ka fragmendi pikkuse ja *FLT1*_{RTqPCR} omavahelist seost nii preeklamptilises kui ka normaalses raseduses. Mõlemal juhul statistilist seost ei esinenud (P=0,97; P=0,57) (Joonis 9).



Joonis 7. STRide erinevate alleeli pikkuste võrdlus *FLT1* ekspressiooniga. A ja B võrdlevad rs149427560 ja rs58800262 seost *FLT1*_{RTqPCR} ekspressiooniga (*ANOVA oneway*; $P=0,085$; $P=0,58$). C ja D võrdlevad rs149427560 ja rs58800262 seost *FLT1*_{RNAseq} ekspressiooniga (*ANOVA oneway*; $P=0,37$; $P=0,70$). *FLT1* ekspressiooniandmeid (*FLT1*_{RNAseq} ja *FLT1*_{RTqPCR}, (Söber et al., 2015)).



Joonis 8. A – lineaarne regression fragmendi pikkuse ja $FLT1_{RNAseq}$ vahel. B – lineaarne regression fragmendi pikkuse ja $FLT1_{RTqPCR}$ vahel. $FLT1$ ekspressiooniandmeid ($FLT1_{RNAseq}$ ja $FLT1_{RTqPCR}$) on varasemalt avaldatud artiklis (Sõber et al., 2015)).



Joonis 9. Fragmendi pikkuste seos $FLT1$ ekspressiooniga (A; $FLT1_{RTqPCR}$ ja B; $FLT1_{RNAseq}$). $FLT1$ ekspressiooniandmeid ($FLT1_{RNAseq}$ ja $FLT1_{RTqPCR}$, (Sõber et al., 2015)).

4.4. Arutelu

4.4.1. *FLTI* DNK piirkonna mõju preeklampsiale

Preeklampsia kui haiguse tunnuseid on dokumenteeritud juba ligi 200 aastat ning eelkõige mõjutab see ema ja loodet (Burton et al., 2019). Preeklampsia täpseid tekkepõhjuseid ja haiguse kulgu veel ei teata, kuid haiguse kiire kulgu võib viia tõsiste tüsistusteni (Bernstein et al., 2017). Käesolevas töös uuritud geeni *FLTI* ja selle valguga platsenta isovormi (sFlt-1) on varasemalt seotud preeklampsia patoloogiaga. *FLTI* geeni toodetud valguga sFlt-1 liigne vabanemine tekitab emadel endoteeli düsfunktsiooni ning on üks varajastest preeklampsia markeritest (McGinnis et al., 2017).

Antud töö eesmärk oli välja selgitada, kas preeklampsiaga on seotud üldine *FLTI* geeni lähistel asuva DNK-rikka regulaatorala üldine fragmendi pikkus või konkreetsete mikrosatelliitide (rs149427560 ja rs58800262) korduste arv. Töö käigus viidi läbi sekveneerimine, mida võrreldi varasemalt saadud fragmentanalüüsi tulemustega. Antud töös analüüsiti nelja erinevat STRi: rs58800262; rs149427560; rs138006164; rs200749017. Uuritud neljast vaid kaks STRi (rs58800262; rs149427560) osutusid populatsioonis sagedaseks. Ülejäänud kaks STRi on harva esinevad ning tõenäoliselt nende panus DNK-rikka ala muutustele ei ole oluline. Mõlema lähemalt uuritud STRi minoorse alleeli sagedus on vastavalt (CEU) 4% ja 8,6%. Antud töös uuritud kahest STRist on ühte (rs149427560) varasemalt seostatud preeklampsiaga ka teistes artiklites (McGinnis et al., 2017; Ohwaki et al., 2020; Yoshizawa et al., 2022).

Esimest korda uuriti antud töös nii terve *FLTI* piirkonna kui ka eraldiseisvate STRide mõju preeklampsiale. Varasemalt läbiviidud uuringutes on lähemalt uuritud vaid STRi rs149427560 või tervet piirkonda fragmentanalüüsiga (Ohwaki et al., 2020; Yoshizawa et al., 2022). Samuti ei ole kindel, kas antud töödes teostatud fragmentanalüüs sisaldas tervet DNK-rikka ala piirkonda, sest avaldatud artiklis ei mainitud täpseid koordinaate ega PCRks kasutatud primereid (Ohwaki et al., 2020; Yoshizawa et al., 2022).

McGinnis jt. artiklis toodi välja STR rs149427560 lühema alleeli seos kõrgeenenud preeklampsia riskiga. STR rs149427560 ei saavutanud ülegenoomset statistiliselt olulist tulemust ning ei valideerunud edaspidises replikatsiooni valimis. Replikatsioonivalimiks kasutati Soome populatsiooni ning STRi rs149427560 asemel uuriti sellega kõrges LDs ($r^2=0.88$) olevat SNPi rs4769613 (McGinnis et al., 2017). Antud uuringus saadud tulemusi võib mõjutada see, et Soome populatsioon on ülejäänud Euroopaga võrreldes geneetiliselt üsnagi erinev, kuna on ajalooliselt läbinud populatsiooni pudelikaela efekti. Samuti pole

uuringus kasutatud SNPide LD 100% , mis võib mõjutada ka rs149427560 tegelike genotüüpide jaotuvust.

Läbiviidud uuringus selgus, et kahe põhjalikumalt analüüsitud STRi alleelisagedused ei ole olulised PE tekkel. Siiski nähti trendi üldise fragmendi pikkuse seose uurimisel PE ja normaalse rasedusega, kus lühemat fragmenti (476/478) esineb preeklampsias rohkem. See võib olla seotud PE tekke põhjusega. Eelneva kinnitamiseks oleks vaja viia läbi katse suurema valimiga. Statistiliselt olulisust nende vahel ei esine. 2020. aastal viidi Ohwaki jt. poolt läbi uuring rs149427560 esinemisest Jaapani populatsioonis. Alleelianalüüsis ei leitud seost PE ja NORM platsentades. Siiski märgati genotüpiseerimisel, et heterosügooti (474/476; 474 kui lühem alleel) esines preeklampsias oluliselt vähem ($p < 0,05$) kui normaalses raseduses (Ohwaki et al., 2020). McGinnis jt. uuringu ning selle läbiviidud töö andmete põhjal tehtud eeldus osutus vastupidiseks Ohwaki jt. (2020) poolt läbiviidud uuringu tulemustest. Kummaski uuringus seost alleelisageduste ja PE vahel ei täheldatud, kuid mõlemas uuringus nähti seost lühema fragmendi pikkuse esinemise ja PE vahel. Kui antud läbiviidud töös leiti, et lühema fragmendi esinemine on sagedasem preeklampsias, siis Jaapani rahvastikus esines lühemat fragmenti PE puhul harvemini. Kuna PE esinemissagedust mõjutavad suuresti ka rass ja etniline kuuluvus võib välja toodud erinevus põhineda just sellel.

McGinnis jt. artiklis toodi esile STRi rs149427560 ja SNPi rs4769613 omavaheline LD ($r^2=0.88$) (McGinnis et al., 2017). Läbiviidud uuringus SNPi rs4769613 mõju üldisele DNK-rikka regulaatorala fragmendi pikkusele ei nähtud. Testiti ka STRide (rs58800262; rs149427560) ja SNPi (rs4769613) omavahelist LDi (*linkage disequilibrium, ensemble andmebaas*). Tulemuslikku seost nende vahel ei täheldatud. Seega saab järeldada, et töös uuritud STRide potentsiaalne mõju preeklampsiale on individuaalne ning kõik STRid oleks vaja tulevikus eraldi *FLT1* geeni lähistel tuvastada.

4.4.2. *FLT1* geeni ekspressiooni seos STRdega

Antud töös rs149427560 ja rs58800262 alleelitüüpide võrdlemisel ekspressioonitasemega sooviti teada saada, kas minoorsed alleelid mõjutavad *FLT1* geeni (*FLT1*_{RTqPCR}; *FLT1*_{RNAseq}) ekspressioonitaset. Statistiliselt olulist tulemust ei esinenud. Ka Ohwaki jt. uuringus analüüsitud STRi rs149427560 seost *FLT1*_{RTqPCR} geeni ekspressiooniga olulist tulemust ei täheldatud (Ohwaki et al., 2020). Sellest saab eeldada, et alleelitüüpide erinevus preeklampsia vastuvõtlikkust ei mõjuta. Analüüsiti ka fragmendi üldise pikkuse seost *FLT1* ekspressiooniga.

Statistiliselt oluline tulemus esines vaid $FLT1_{RNAseq}$ ekspressioonitaseme ja preeklampilise raseduse vahel. Antud seost peaks kontrollima suurema valimiga. Arvesse peaks võtma, et meetodid ekspressiooni andmete leidmiseks on väga erinevad. Sekveneerimise puhul kasutatakse normaliseeritud, kuid otseseid lugemite arve, aga RTqPCR puhul on kasutusel vaid suhteline ekspressioon. Antud meetodite skaalad on võrdlemisi erinevad, mis võivad samuti mõjutada statistiliste testide tulemusi. See võib ka selgitada põhjust, miks ühe ekspressiooni andmestiku ($FLT1_{RNAseq}$) korral leiti seos, kuid teise ($FLT1_{RTqPCR}$) puhul mitte.

Yoshizawa jt. artiklis uuriti $FLT1$ geeni ümbritseva leiti seos rs149427560 homosügooti (476/476) ja $MG828507$ lncRNAGA, mis asub $FLT1$ geenist ülesvoolu (Yoshizawa et al., 2022). Lisaks varasemalt märgitud rs149427560 seosele lncRNAGA on võimalik, et ka teistel STRidel on mõju lncRNAdega, kuid seda ei ole seni uuritud.

Üldiselt ei mõjuta konkreetsed STRid preeklampsia riski, kuid esile tõusis trend fragmendi üldise pikkusega. Sellest tulenevalt oleks edaspidi mõistlik lähtuda fragmentanalüüsist. Sekveneerimise tulemused aitaksid suurema valimi korral kontrollida fragment analüüsi tulemusi. Põhjusteks, miks läbiviidud uuringus ei kattunud fragmentanalüüsi ja sekveneerimise tulemused 100% võivad olla piirkondade omavaheline erinevus või mingi muutuse võimalik toimumine alas, mis ei kattunud kahe meetodiga. Kuigi varasemalt on leitud seost PE ja STRide vahel, siis võivad erinevused olla tingitud erinevatest populatsioonidest või on STRide mõju võrdlemisi minimaalne, et väikses valimis seda tuvastada ei ole võimalik. Võttes arvesse preeklampsia keerukust, oleks edaspidi vaja kindlasti suurendada valimi suurust, et kontrollida, kas antud tulemused on vastavad ka suurema valimi korral.

5. KOKKUVÕTE

Preeklampsia täpseid tekkepõhjuseid ja haiguse kulgu veel ei teata, kuid haiguse kiire kulgu võivad viia tõsiste tüsistusteni, sealhulgas nii ema kui ka loote surmani. PE tunnuseid on palju, kuid kõige tavapärasemateks peetakse proteinuuriat ja hüpertensiooni.

Käesolevas töös anti kirjanduse põhjal ülevaade preeklampsia patofüsioloogiast, geneetikast ja ravimeetoditest. Lisaks anti ülevaade seni preeklampsiaga seostatud STRdest, *FLT1* geenist ja vastava valguga toimest preeklampsias.

Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli tuvastada nelja STRi mõju ja seos preeklampsia riskiga. Selleks kasutati sekveneerimist, mis võimaldas analüüsida kõikide STRide fragmendipikkust ning neid võrrelda fragmentanalüüsi andmetega. Analüüsimiseks kasutati programmi GraphPad.

Algselt uuriti nelja STRi, millest kaks osutusid oluliseks (rs58800262; rs149427560). Uuriti *FLT1* geeni DNK-rikka regulaatorala fragmendi pikkuse seost PE ja normaalse rasedusega. Analüüsidest nähti trendi lühema fragmendi pikkuse ja PE vahel, kuid statistilist olulisust nende vahel ei esine. Antud väite kinnitamiseks oleks vaja suurendada valimit.

Sealjuures uuriti ka fragmendi pikkuse ja alleelitüüpide seost *FLT1* ekspressioonitasemega. Statistiliselt oluliseks osutus fragmendi pikkuse ja *FLT1_{RNAseq}* ekspressioonitaseme omavaheline seos ($P=0,03$). Võrreldi ka alleelitüüpe ja ekspressioonitaset, et uurida, kas minoorseid alleelid on seotud ekspressioonitasemega. Leiti, et omavaheline seos puudub. Sellest saab järeldada, et STRid läbi üksteise fragmendi pikkust ei mõjuta. Kui siis on iga STRi mõju fragmendi pikkusele individuaalne.

Kuigi varasemalt on märgitud seost preeklampsia ning STRide vahel, siis väikeses valimis võib olla nende mõju võrdlemisi minimaalne. Valimi suurendamine aitaks kinnitada edaspidi antud töös saadud tulemusi.

Occurrence of haplotypes in the dinucleotide repeat-rich regulatory region of the *FLT1* gene in preeclamptic placentas

Karita Helde

SUMMARY

Pre-eclampsia is a hypertensive or high blood pressure disease that occurs during pregnancy and affects 5-8% of women worldwide every year. The exact causes of pre-eclampsia and the course of the disease are still unknown, but the rapid progression of this condition can lead to serious complications, including the death of both the mother and the fetus.

In this work, an overview of the pathophysiology, genetics, and treatment methods of pre-eclampsia were given based on the literature. In addition, an overview was given of the STRs associated with pre-eclampsia, the *FLT1* gene, and the effect of the corresponding protein in pre-eclampsia.

The aim of the experimental part was to identify the effect and relationship of certain STRs with the risk of pre-eclampsia. Furthermore it was studied whether specific allele lengths affect susceptibility to pre-eclampsia or is the length of the entire fragment important. Sequencing was used for this work, which made it possible to analyze the fragment length of all STRs and compare them with fragment analysis data.

Four STRs were initially investigated, two of which were found to be significant (rs58800262; rs149427560). Analyzing the association of allele lengths with preeclampsia, no statistical significance was found. The association of fragment length with pre-eclampsia and normal pregnancy was also investigated. In the analyses, the presence of a shorter fragment was found to be associated with pre-eclampsia, but there was no statistical significance between them.

The association of fragment length and allelic types with *FLT1* expression level was also analysed. The relationship between fragment length and expression level was statistically significant ($P=0.03$).

From this, it can be concluded that STR does not affect the length of the fragment through each other, and if it does, then each SNP on the length of the fragment is individual.

The work revealed that specific alleles do not affect susceptibility to pre-eclampsia, but the overall length of the fragment is important. Increasing the sample would help to confirm the results obtained in this work in the future.

TÄNUSÕNAD

Soovin avaldada omapoolset suurt tänu juhendajale Triin Kikas, kes andis märkimisväärse panuse käesoleva töö valmimisse ning innustas pidevalt oma põhjalikkusega. Lisaks sooviksin tänada võimaluse eest, et sain osa olla just selles uurimistöögrupist ning tutvuda põneva laboritööga.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abbasi, H., Dastgheib, S. A., Hadadan, A., Karimi-Zarchi, M., Javaheri, A., Meibodi, B., Zandbagh, L., Tabatabaei, R. S., & Neamatzadeh, H. (2020). Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase 894G > T Polymorphism with Preeclampsia Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis based on 35 Studies. *Https://Doi.Org/10.1080/15513815.2019.1710880*, 40(5), 455–470. <https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1710880>
- Annette Oder. (2021). *FLT1 geeni regulaatoralas paiknevate dinukleotiidi korduste rikka piirkonna alleelse varieeruvuse tuvastamise protokollu väljatöötamine*.
- Ardett, M. B., Ausett, F., Lison, A., Raser, F., Eri, G., Ineau, M., Orge, J., Arrillo, C., & Arner, W. v. (2001). Paternal and Maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia. *Https://Doi.Org/10.1056/NEJM200103223441201*, 344(12), 867–872. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103223441201>
- Bellamy, L., Casas, J. P., Hingorani, A. D., & Williams, D. J. (2007). Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ: British Medical Journal*, 335(7627), 974. <https://doi.org/10.1136/BMJ.39335.385301.BE>
- Bernstein, P. S., Martin, J. N., Barton, J. R., Shields, L. E., Druzin, M. L., Scavone, B. M., Frost, J., Morton, C. H., Ruhl, C., Slager, J., Tsigas, E. Z., Jaffer, S., & Menard, M. K. (2017). National Partnership for Maternal Safety. *Obstetrics and Gynecology*, 130(2), 347–357. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002115>
- Block, H. S., & Biller, J. (2014). Neurology of pregnancy. *Handbook of Clinical Neurology*, 121, 1595–1622. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4088-7.00105-X>
- Brown, M. A., Magee, L. A., Kenny, L. C., Karumanchi, S. A., McCarthy, F. P., Saito, S., Hall, D. R., Warren, C. E., Adoyi, G., & Ishaku, S. (2018). The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. In *Pregnancy Hypertension* (Vol. 13, pp. 291–310). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.05.004>
- Burton, G. J., Redman, C. W., Roberts, J. M., & Moffett, A. (2019). Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. In *The BMJ* (Vol. 366). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmj.12381>

- Deysenroth, M. A., Li, Q., Escudero, C., Myatt, L., Chen, J., & Roberts, J. M. (2020). Differences in Placental Imprinted Gene Expression across Preeclamptic and Non-Preeclamptic Pregnancies. *Genes*, *11*(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/GENES11101146>
- Dumbovic, G., Forcales, S. v., & Perucho, M. (2017). Emerging roles of macrosatellite repeats in genome organization and disease development. *Epigenetics*, *12*(7), 515. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1318235>
- English, F. A., Kenny, L. C., & McCarthy, F. P. (2015). Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integrated Blood Pressure Control*, *8*, 7. <https://doi.org/10.2147/IBPC.S50641>
- Gray, K. J., Kovacheva, V. P., Mirzakhani, H., Bjornes, A. C., Almoguera, B., DeWan, A. T., Triche, E. W., Saftlas, A. F., Hoh, J., Bodian, D. L., Klein, E., Huddleston, K. C., Ingles, S. A., Lockwood, C. J., Hakonarson, H., McElrath, T. F., Murray, J. C., Wilson, M. L., Norwitz, E. R., ... Saxena, R. (2018). GENE-CENTRIC ANALYSIS OF PREECLAMPSIA IDENTIFIES MATERNAL ASSOCIATION AT PLEKHG1. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *72*(2), 408. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10688>
- Gray, K. J., Saxena, R., & Karumanchi, S. A. (2018). Genetic predisposition to preeclampsia is conferred by fetal DNA variants near FLT1, a gene involved in the regulation of angiogenesis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *218*(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2017.11.562>
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, *114*(5–6), 397–407. <https://doi.org/10.1016/J.THROMRES.2004.06.038>
- Helle Karro, Heili Varendi, Kärt Allvee, & Piret Veerus. (n.d.). *Muutused Eesti sünnitusabis aastatel 1992–2021 – kahe perioodi võrdlus raseduse infosüsteemi andmete põhjal.*
- Jena, M. K., Sharma, N. R., Petitt, M., Maulik, D., & Nayak, N. R. (2020). Pathogenesis of Preeclampsia and Therapeutic Approaches Targeting the Placenta. *Biomolecules*, *10*(6), 1–28. <https://doi.org/10.3390/BIOM10060953>
- Jim, B., & Karumanchi, S. A. (2017). Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Seminars in Nephrology*, *37*(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2017.05.011>

- Kim, S. Y., Lim, J. H., Yang, J. H., Kim, M. Y., Han, J. Y., Ahn, H. K., Choi, J. S., Park, S. Y., Kim, M. J., & Ryu, H. M. (2008). Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) gene is not associated with preeclampsia. *BMC Medical Genetics*, *9*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-68/TABLES/3>
- Lemoine, E., & Thadhani, R. (2019). Affordable Preeclampsia Therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, *40*(2), 85–87. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2018.12.007>
- Lynn B. Jorde, J. C. C. M. J. B. (n.d.). *Medical Genetics* (Sixth edition).
- McGinnis, R., Steinthorsdottir, V., Williams, N. O., Thorleifsson, G., Shooter, S., Hjartardottir, S., Bumpstead, S., Stefansdottir, L., Hildyard, L., Sigurdsson, J. K., Kemp, J. P., Silva, G. B., Thomsen, L. C. V., Jääskeläinen, T., Kajantie, E., Chappell, S., Kalsheker, N., Moffett, A., Hiby, S., ... Morgan, L. (2017). Variants in the fetal genome near FLT1 are associated with risk of preeclampsia. *Nature Genetics*, *49*(8), 1255–1260. <https://doi.org/10.1038/ng.3895>
- Mongraw-Chaffin, M. L., Cirillo, P. M., & Cohn, B. A. (2010). PREECLAMPSIA AND CARDIOVASCULAR DISEASE DEATH: PROSPECTIVE EVIDENCE FROM THE CHILD HEALTH AND DEVELOPMENT STUDIES COHORT. *Hypertension*, *56*(1), 166. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150078>
- Ohwaki, A., Nishizawa, H., Kato, A., Kato, T., Miyazaki, J., Yoshizawa, H., Noda, Y., Sakabe, Y., Ichikawa, R., Sekiya, T., Fujii, T., & Kurahashi, H. (2020). Placental Genetic Variants in the Upstream Region of the FLT1 Gene in Pre-eclampsia. *Journal of Reproduction & Infertility*, *21*(4), 240. <https://doi.org/10.18502/JRI.V21I4.4328>
- Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzing, T., & Karumanchi, S. A. (2019). Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nature Reviews. Nephrology*, *15*(5), 275. <https://doi.org/10.1038/S41581-019-0119-6>
- Poon, L. C., Shennan, A., Hyett, J. A., Kapur, A., Hadar, E., Divakar, H., McAuliffe, F., da Silva Costa, F., von Dadelszen, P., McIntyre, H. D., Kihara, A. B., di Renzo, G. C., Romero, R., D'Alton, M., Berghella, V., Nicolaides, K. H., & Hod, M. (2019). The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *145*(S1), 1–33. <https://doi.org/10.1002/IJGO.12802>
- Rana, S., Lemoine, E., Granger, J., & Karumanchi, S. A. (2019). Preeclampsia. *Circulation Research*, *124*(7), 1094–1112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313276>

- Roberge, S., Bujold, E., & Nicolaides, K. H. (2018). Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *218*(3), 287-293.e1. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2017.11.561>
- Sasagawa, T., Nagamatsu, T., Yanagisawa, M., Fujii, T., & Shibuya, M. (2021). Hypoxia-inducible factor-1 β is essential for upregulation of the hypoxia-induced FLT1 gene in placental trophoblasts. *Molecular Human Reproduction*, *27*(12). <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAAB065>
- Shahul, S., Tung, A., Minhaj, M., Nizamuddin, J., Wenger, J., Mahmood, E., Mueller, A., Shaefi, S., Scavone, B., Kociol, R. D., Talmor, D., & Rana, S. (2015). Racial Disparities in Comorbidities, Complications, and Maternal and Fetal Outcomes in Women with Preeclampsia/Eclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, *34*(4), 506. <https://doi.org/10.3109/10641955.2015.1090581>
- Shbair, M., Adnan, A., Hao, P., & Liu, Y. (2021). Assessing the viability of carious lesions in human identification using STR typing. *Science Progress*, *104*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1177/00368504211008054>
- Shen, L., Martinez-Portilla, R. J., Rolnik, D. L., & Poon, L. C. (2021). ASPRE trial: risk factors for development of preterm pre-eclampsia despite aspirin prophylaxis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *58*(4), 546–552. <https://doi.org/10.1002/UOG.23668>
- Skjærven, R., Vatten, L. J., Wilcox, A. J., Rønning, T., Irgens, L. M., & Lie, R. T. (2005). Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ: British Medical Journal*, *331*(7521), 877. <https://doi.org/10.1136/BMJ.38555.462685.8F>
- Söber, S., Reiman, M., Kikas, T., Rull, K., Inno, R., Vaas, P., Teesalu, P., Marti, J. M. L., Mattila, P., & Laan, M. (2015). Extensive shift in placental transcriptome profile in preeclampsia and placental origin of adverse pregnancy outcomes. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/SREP13336>
- Sun, J. H., Zhou, L., Emerson, D. J., Phyo, S. A., Titus, K. R., Gong, W., Gilgenast, T. G., Beagan, J. A., Davidson, B. L., Tassone, F., & Phillips-Cremins, J. E. (2018). Disease-associated short tandem repeats co-localize with chromatin domain boundaries. *Cell*, *175*(1), 224. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.08.005>

- ThermoFisher Scientific. (2012). *DNA FRAGMENT ANALYSIS*. <https://www.thermofisher.com/ee/en/home/global/forms/fragment-analysis-guide-registration-form/fragment-analysis-guide-thank-you.html>
- Tomimatsu, T., Mimura, K., Matsuzaki, S., Endo, M., Kumasawa, K., & Kimura, T. (2019). Preeclampsia: Maternal Systemic Vascular Disorder Caused by Generalized Endothelial Dysfunction Due to Placental Antiangiogenic Factors. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 4246, 20(17), 4246. <https://doi.org/10.3390/IJMS20174246>
- Turecki, G., Grof, P., Cavazzoni, P., Duffy, A., Grof, E., Ahrens, B., Berghöfer, A., Mülleroerlinghausen, B., Dvorčková, M., Libigerová, E., Vojtechovsky, M., Zvolsky, P., Joobor, R., Nilsson, A., Prochazka, H., Licht, R. W., Rasmussen, N. A., Schou, M., Vestergaard, P., ... Alda, M. (1998). Evidence for a role of phospholipase C- γ 1 in the pathogenesis of bipolar disorder. *Molecular Psychiatry* 1998 3:6, 3(6), 534–538. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000447>
- Vikse, B. E., Irgens, L. M., Leivestad, T., Skjærven, R., & Iversen, B. M. (2008). Preeclampsia and the Risk of End-Stage Renal Disease. *New England Journal of Medicine*, 359(8), 800–809. https://doi.org/10.1056/NEJMOA0706790/SUPPL_FILE/NEJM_VIKSE_800SA1.PDF
- Wang, C., Zhou, X., Liu, H., & Huang, S. (2020). Three polymorphisms of renin-angiotensin system and preeclampsia risk. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(12), 3121. <https://doi.org/10.1007/S10815-020-01971-8>
- Yong, H. E. J., Murthi, P., Brennecke, S. P., & Moses, E. K. (2018). Genetic approaches in preeclampsia. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1710, pp. 53–72). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_5
- Yoshizawa, H., Nishizawa, H., Inagaki, H., Hitachi, K., Ohwaki, A., Sakabe, Y., Ito, M., Tsuchida, K., Sekiya, T., Fujii, T., & Kurahashi, H. (2022). Characterization of the MG828507 lncRNA Located Upstream of the FLT1 Gene as an Etiology for Pre-Eclampsia. *Journal of Clinical Medicine*, 11(15), 4603. <https://doi.org/10.3390/JCM11154603/S1>
- Zhang, G., Zhao, J., Yi, J., Luan, Y., & Wang, Q. (2016). Association Between Gene Polymorphisms on Chromosome 1 and Susceptibility to Pre-Eclampsia: An Updated Meta-Analysis. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 2202. <https://doi.org/10.12659/MSM.896552>

LIHTLITSENTS

Mina, Karita Helde

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „FLT1 geeni dinukleotiidkorduste rikka regulaatorala haplotüüpide esinemine preeklamptilistes platsentades“, mille juhendajad on PhD Triin Kikas ja prof Ants Kurg, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Karita Helde

29.05.2023