

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

Platsenta alternatiivne splaiissing normaalses ja preeklamptilises raseduses

Bakalaureusetöö
Geenitehnoloogia (12 EAP)
Käbi-Riin Ojassoo

Juhendajad:
MSc Triin Kikas
MSc Mario Reiman
MSc Mihkel Vaher

TARTU 2019

INFOLEHT

Platsenta alternatiivne splaissing normaalses ja preeklamptilises raseduses

Alternatiivne splaissing on protsess, kus ühelt geenilt kodeeritakse erinevaid transkripte, säilitades või eemaldades mRNA-st valikuliselt eksoneid või introneid, kas täielikult või osaliselt. Praeguseini on alternatiivset splaissingut platsentas vähe uuritud, aga arusaam sellest on tähtis, sest vead splaissimises võivad põhjustada haigusi, näiteks preeklampsiat või gestatsioonidiabeeti. Käesolevas töös uuriti platsentasid, mis tulenesid üksikrasedustest, milles esines preeklampsiat ja ilma komplikatsioonideta rasedustest. Töö eesmärkideks oli tuvastada platsentas erinevate transkriptide kasutust *ADAM12*, *AZINI* ja *FNI* geenides ja replitseerida alternatiivse splaissimise mustri muutuseid preeklampsias.

Märksõnad: alternatiivne splaissing, preeklampsia

CERCS: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Alternative splicing in normal and preeclamptic pregnancies

Alternative splicing is a process which enables the coding of multiple differing transcripts from a single gene by retaining or removing exons and introns selectively from the mRNA - either completely or partially. Alternative splicing in the placenta is not a well-researched field at the current point in time. Even the slightest defect in the process may cause negative effects, such as preeclampsia and gestational diabetes, due to which the understanding of the underlying mechanism is important. In this bachelor's thesis we researched placentas that came from singleton pregnancies with preeclampsia and from pregnancies without any complications. The aim of our experiments was to detect the use of different transcripts in the placenta in *ADAM12*, *AZINI* and *FNI* genes and, furthermore, to replicate changes that have taken place in the alternative splicing patterns of preeclampsia cases.

Keywords: alternative splicing, preeclampsia

CERCS: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Alternatiivne splaissing	8
1.1.1. Alternatiivse splaissingu toimemehhanismid	10
1.1.2. Splaiss-saidi valiku probleemid	13
1.1.3. Ebatüüpilised eksonid	14
1.1.4. Alternatiivne splaissing haigustes	15
1.2. Platsenta	16
1.2.1. Alternatiivne splaissimine rasedustüsistuste korral	16
1.2.2. Splaissimine platsentas	17
1.2.3. Preeklampsia	19
1.3. Antud töös käsitletud geenide bioloogiline taust	19
1.3.1. <i>ADAM12</i>	19
1.3.2. <i>AZIN1</i>	20
1.3.3. <i>FNI</i>	21
1.4. RNA splaissvariantide kvantiseerimine LeafCutter tarkvara abil	21
2. EKSPERIMENTAALOSA	23
2.1. Töö eesmärgid	23
2.2. Materjal ja meetodika	23
2.2.1. Uuringu disain	23
2.2.2. Valim	24
2.2.3. RNA eraldus	26
2.2.4. RNA puhastus	27
2.2.5. DNaasi töötlus	28
2.2.6. cDNA SÜNTEES	28
2.2.7. Praimerite disain	29
2.2.8. PCR	30
2.2.9. Fragmentanalüüs ning andmete statistiline analüüs	33
2.3. Tulemused	34

2.3.1. PCR-i optimeerimine ja praimerite kontroll	34
2.3.2. Fragmentanalüüs	36
2.3.2.1. <i>ADAM12</i> tulemused	36
2.3.2.2. <i>FNI</i> tulemused	38
2.3.2.3. <i>AZINI</i> tulemused	41
2.4. Arutelu	41
2.4.1. Fragmentanalüüs alternatiivse splaissingu tuvastamiseks	41
2.4.2. Gruppidevaheliste erinevuste tuvastamine fragmentanalüüsil	42
2.4.3. Andmebaasi vastavus tegelikkusele	42
KOKKUVÕTE	44
SUMMARY	45
KASUTATUD ALLIKAD	47
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	52
LISAD	53
Lisa 1	53
Lisa 2	54
Lisa 3	54
LIHTLITSENTS	55

KASUTATUD LÜHENDID

ADAM12 – ADAM metallopeptidase domain 12

AGO2 – argonaute RISC catalytic component 2

AZIN1 – antizyme inhibitor 1

bp – base pair, aluspaari

CHD7 – chromodomain helicase DNA binding protein 7

CSH1 – chorionic somatomammotropin hormone 1

CSH2 – chorionic somatomammotropin hormone 2

CSHL1 – chorionic somatomammotropin hormone like 1

CYTH3 – cytohesin 3

FAM172A – family with sequence similarity 172 member A

FNI – fibronectin 1

FPKM – fragments per kilobase million

GD – gestatsioonidiabeet

GH2 – growth hormone 2

hGH/CSH – human Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin

HLA – human leukocyte antigen

HLA-A – major histocompatibility complex, class I, A

HLA-B – major histocompatibility complex, class I, B

HLA-C – major histocompatibility complex, class I, C

HLA-E – major histocompatibility complex, class I, E

HLA-F – major histocompatibility complex, class I, F

HLA-G – major histocompatibility complex, class I, G

HP – harupunkt

HTT – huntingtin

IUGR – intrauterine growth restriction, intrauteriinne kasvupeetus

LDLR – low density lipoprotein receptor

LGA – large for gestational age, gestatsiooniaja kohta suur vastsündinu

NMD – nonsense mediated decay, nonsenss-vahendatud lagundamine

NORM – kontrollgrupp

ODC – ornithine decarboxylase, ornitiini dekarboksülaas

ORF – open reading frame, avatud lugemisraam

PAPPA2 – pappalysin 2

PE – preeklampsia

PGH – *placental growth hormone*

PL – *placental lactogen*

PSG1 – *pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1*

PSG11 – *pregnancy specific beta-1-glycoprotein 11*

RefSeq – *reference sequence*

REPROMETA – REPROgrammed fetal and/or maternal METAbolism

RNA-seq – RNA sekveneerimine

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

SNCA – *synuclein alpha*

snRNP – *small nuclear ribonucleoproteins*

SNV – *single nucleotide variant*, üksiknukleotiidi variant

SRRM4 – *serine/arginine repetitive matrix 4*

ss – splaiss-sait

U2AF – *U2 snRNP auxiliary factor*

SISSEJUHATUS

Alternatiivne splaissing on väga levinud mehhanism, millel on nii bioloogiline, geneetiline kui ka evolutsiooniline funktsioon. Tänu alternatiivsele splaissingule saab ühelt geenilt mitu mRNA transkripti transkribeerida, millelt on võimalik erinevaid valgu isovorme kodeerida. Nii varustatakse organism kõikide vajaminevate valkudega. Kui aga splaissingu protsess on defektne, võib see põhjustada palju erinevaid haigusi, näiteks Alzheimeri tõve (Gallego-Paez *et al.*, 2017), tsüstilist fibroosi (Chabot and Shkreta, 2016) ja CHARGE sündroomi (Bélanger *et al.*, 2018). Seetõttu on alternatiivne splaissing tugevalt reguleeritud protsess.

Platsenta on eriline organ, mis luuakse iga raseduse alguses, ja seda on praeguseni vähe uuritud. Sellest tulenevalt ei ole lõplikult teada, millised geenid on platsentas ekspresseeritud ja millised alternatiivselt splaissitud transkriptid seal esinevad. Arusaam terviklikust pildist on aga väga tähtis, sest kõrvalekaldumised normist on tihti seotud patoloogiatega nagu preeklampsia ja gestatsioonidiabeet (Männik *et al.*, 2012; Söber *et al.*, 2015). Uurides neid erinevusi normist saame rohkem informatsiooni haiguse riskitegurite, patoloogia ja väljakujunemise kohta.

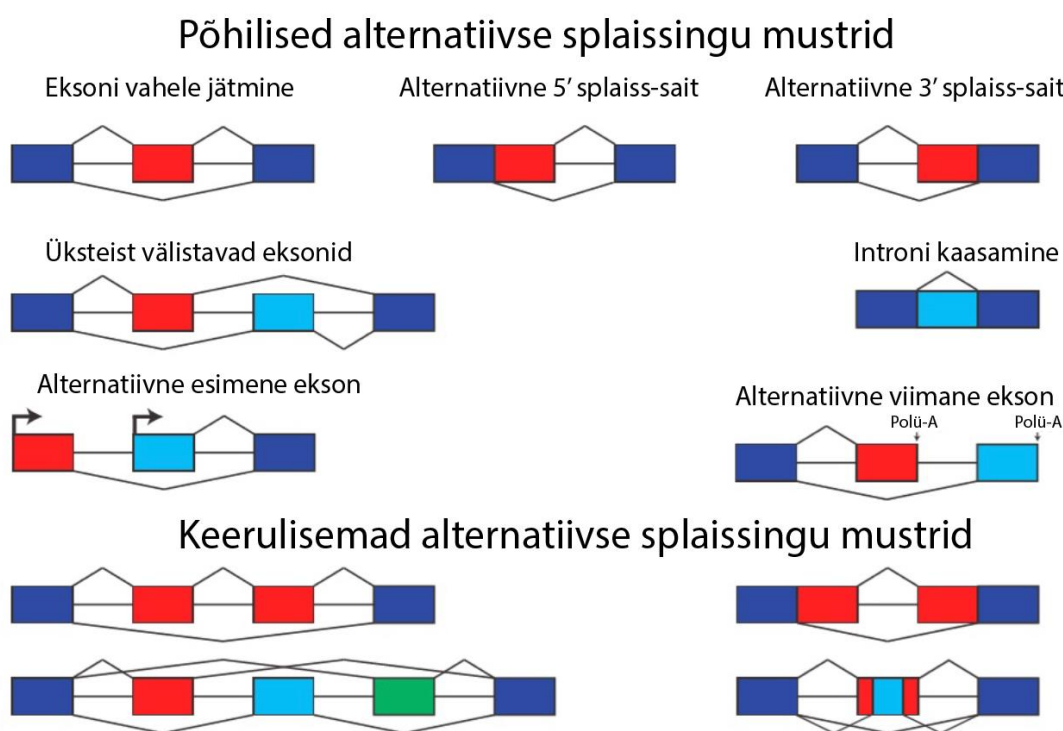
Antud töö peamiseks eesmärgiks on tuvastada platsentas erinevate transkriptide kasutust *ADAM12*, *AZINI* ja *FNI* geenides. Lisaeesmärgiks oli replitseerida varasemalt meie laboris leitud platsenta alternatiivse splaissingu erinevusi preeklampsiaga ja komplikatsioonideta raseduste vahel.

Bakalaureusetöö on koostatud Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis, inimese geneetika uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Alternatiivne splaissing

Eukarüootide geenid koosnevad kodeerivatest ja mittekodeerivatest aladest (eksonid ja intronid). Organismi jaoks vajalike valkude korrektne süntees saab toimuda ainult õigete eksonite omavahelisel ühendamisel. Alternatiivne splaissing on protsess, kus ühelt geenilt kodeeritakse erinevaid transkripte, säilitades või eemaldades mRNA-st valikuliselt eksoneid või introneid, kas täielikult või osaliselt (Joonis 1) (Sibley *et al.*, 2016). Tänu alternatiivsele splaissingule on võimalik kokku panna palju rohkem erinevaid transkripte, mis suurendab omakorda geneetilist varieeruvust. See tähendab, et ühest geenist on võimalik kodeerida erinevaid valgu isovorme (Wang ja Burge, 2008).



Joonis 1. Alternatiivse splaissingu mustrid. Tumesinised kastid on konstitutiivselt splaissitud eksonid ja punased, helesinised ning rohelised kastid on erinevad alternatiivselt splaissitud eksonid. (Kohandatud joonis Park *et al.*, 2018)

Alternatiivne splaissing on küllaltki levinud, näiteks esineb seda loomades, taimedes ja seentes, ehk kõikides eukariootides. Mitmest eksonist koosnev geen omab suure tõenäosusega vähemalt ühte splaissingu isovormi. Näiteks inimese mitmest eksonist koosneva geeni puhul on uue alternatiivselt splaissitud isovormi tekke tõenäosus 95% (Bush *et al.*, 2017). Tõenäosus on nii suur, sest keerukamatel organismidel on suurem vajadus erinevatele valkudele, mis suudaks kõiki eluks vajalikke protsesse läbi viia. Alternatiivne splaissing on seega mehhanism, mis võimaldab meile olemasolevat valkude mitmekesisust (Gallego-Paez *et al.*, 2017).

Algselt arvati, et organismi keerukuse ja organismis leiduvate rakutüüpidel on tugev seos ehk mida keerukam organism, seda rohkem rakutüüpe ja seda suurem genoom (Hahn ja Wray, 2002). Kui aga inimese genoom sai sekveneeritud, selgus, et genoom on oodatust palju väiksem (Bush *et al.*, 2017). Põhjuseks on alternatiivne splaissing, sest see protsess võimaldab proteoomi suurust ja transkriptoomi keerukust suurendada (Schad *et al.*, 2011). Mehhanism võimaldab omada väiksemat genoomi, mis on energiasäästlikum, sest iga valgu jaoks ei ole eraldi geeni vaja, vaid ühe geeni pealt saab produtseerida mitmeid erinevaid transkripte, mis omakorda kodeerivad vajaminevaid valke.

Võrreldes teiste organitega leidub alternatiivset splaissimist kõige rohkem ajus ja munandites. Inimese ajus on üle triljoni neuroni, mis on omavahel keerdunud ja millel on spetsiifilised ühendused (Gallego-Paez *et al.*, 2017). Imetajate närvisüsteem on seega evolutsioneerunud nii, et see on võimeline alternatiivse splaissingu abil tootma väga palju erinevaid valke, et süsteemi töökorras hoida (Lipscombe, 2005). Lisaks sellele reguleeritakse läbi alternatiivse splaissingu teatud valkude aktiivsust, mis on vajalik erinevate rakutüüpide välja kujunemiseks. Samuti on alternatiivne splaissing seotud morfogeneesi ja keeruliste neuraalsete võrgustike moodustamisega, sest erinevad valgu isovormid mõjutavad sünapside aktiivsust (Su *et al.*, 2018). Seetõttu peab olema alternatiivne splaissimine ajus tugevalt reguleeritud, kuna väikseimgi muudatus splaissimises võib lõppeda negatiivsete tagajärgedega (Gallego-Paez *et al.*, 2017).

Alternatiivsed splaissimise mustrid, mis on kasutusel munandites, ei ole lähedases suguluses olevate liikide vahel konserveerunud (Gallego-Paez *et al.*, 2017). Seega võib alternatiivne splaissing munandites nii levinud olla, sest puuduvad kindlad mustrid, mistõttu tekib splaissimise käigus palju vigu (Elliott ja Grellscheid, 2006). Tänu sellele tekib ka munandites palju müra, sest alternatiivse splaissimise käigus tekib palju vigaseid transkripte, mis sisaldavad

liiga varajast stoppkoodonit. Sellised transkriptid ei tooda valke ja nad suunatakse lagundamisele. Samuti võib müra tekitada kõrgel tasemel olev rakkude proliferatsioon, vähenenud kvaliteedikontroll ja splaissimise regulaatorite ekspressiooni kõikumine (Gallego-Paez *et al.*, 2017). Lisaks sellele võib vajadus pidevale regulatsioonile mehe sugurakkude arengu ja diferentseerumise osas põhjustada alternatiivse splaissingu laia levikut munandites (Elliott ja Grellscheid, 2006).

Splaiissimine suurendab rakuliste mehhanismide ja bioloogiliste funktsioonide mitmekesisust (Sibley *et al.*, 2016). Paljud bioloogilised protsessid on seotud alternatiivse splaissimisega – taime virulentsus, õitsemisaeg või ka näiteks termogenees ja peenise erektsioon hiirtel (Bush *et al.*, 2017). Seega leidub protsessi väga erinevates piirkondades ja tänu sellele on võimalik bioloogiliste funktsioonide ja mehhanismide mitmekesisus.

Arvatavasti on alternatiivsel splaissingul tähtis osa ka evolutsioonis. Üks mutatsioon võib tekitada mitu uut valgu isovormi, mis suurendab mitmekesisust. Tänu sellele on võimalikud uued fenotüübid, millest mõni võib osutuda väga vastupidavaks. Mutatsioonid võivad reguleerida splaiissimist, kui üksiknukleotiidi variant (SNV) loob uue lõikekoha. Sellise uue saidi teke on küll vähetõenäoline, aga kui see on tekkinud, siis enamasti jääb muutus alles (Bush *et al.*, 2017).

1.1.1. Alternatiivse splaissingu toimemehhanismid

Splaiissimine toimub tihti piirkonniti erinevalt ehk organi-, koe- või rakuspetsiifiliselt. Mis osa eemaldatakse ja milline alles jääb, selgub tavaliselt sel ajal, kui pre-mRNA-d veel transkribeeritakse. Protsess ei mõjuta alati valgulist tasandit, sest splaissingu lõpptulemuseks ei pea olema alati valku kodeeriv RNA (Chabot ja Shkreta, 2016). Näiteks tekib ka transkripte, mis sisaldavad liiga varajase stoppkoodoniga eksonit ja sellised transkriptid ei tooda valke. Toimub aga ekspressiooni allaregulatsioon, sest osa pre-mRNA-dest suunatakse seetõttu nonsenss-vahendatud lagundamisele (NMD) (ingl *nonsense mediated decay*) (Bush *et al.*, 2017). Siin on tegemist seega regulatsiooniga pre-mRNA tasemel.

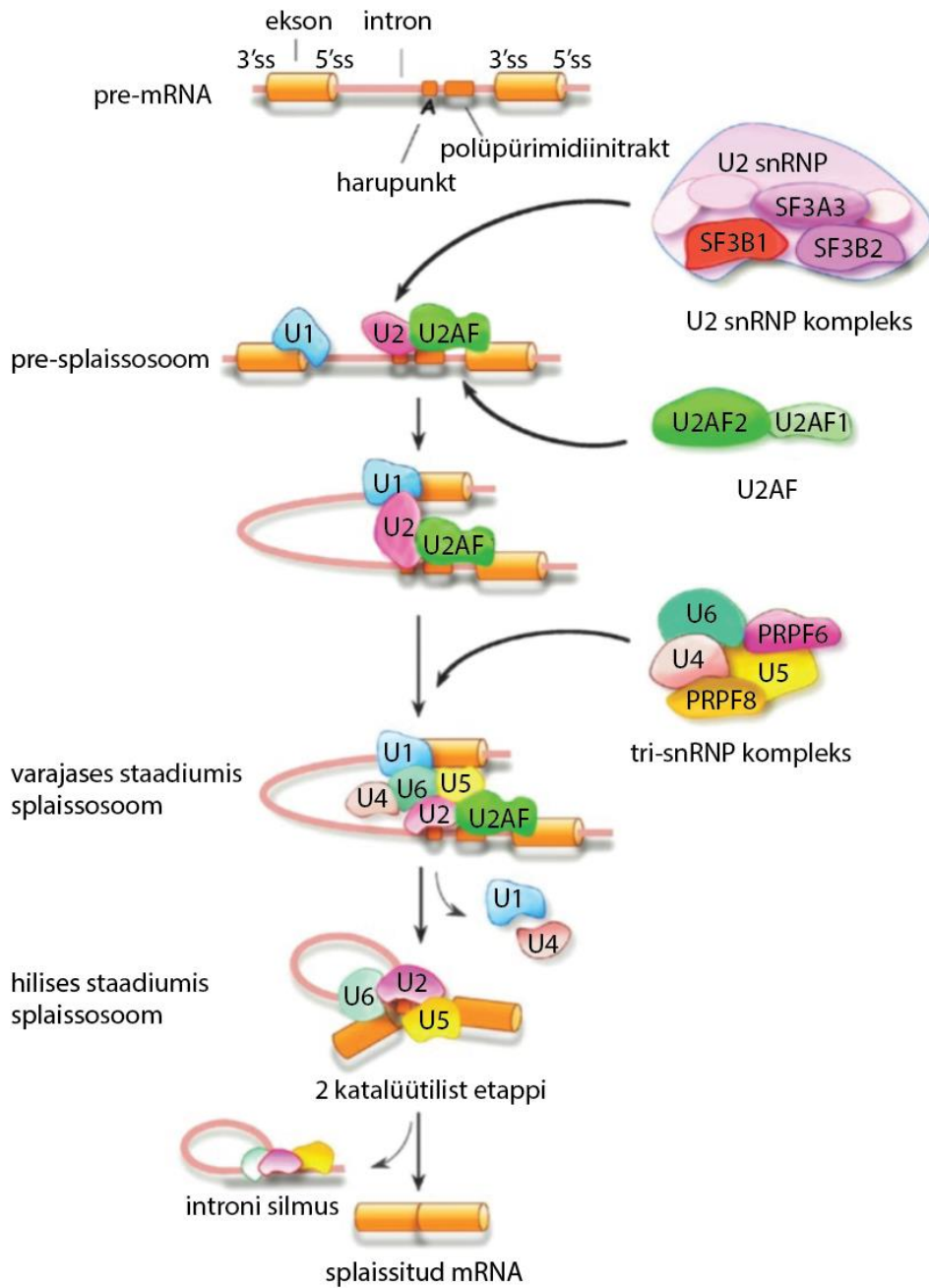
Splaiissosoom on valgukompleks, mis koosneb vähemalt viiest snRNP (*small nuclear*

ribonucleoproteins) subühikust: U1, U2, U4, U5 ja U6 snRNP (De Calais *et al.*, 2017). snRNP-d koosnevad vähemalt ühest snRNA-st ja valgu kogumist, milles on tavaliselt seitse väikest valku (SmB/B', SmD3, SmD2, SmD1, SmE, SmF, ja SmG) ning kogumile lisanduvad veel erinevad spetsiifilised valgud (Will ja Lührmann, 2011). Need interakteeruvad kindlate järjestustega eksonite ja intronite piirides, et luua modifitseeritud mRNA (De Calais *et al.*, 2017). Lõplik mRNA saadakse intronite välja lõikamisega ja eksonite ühendamisega.

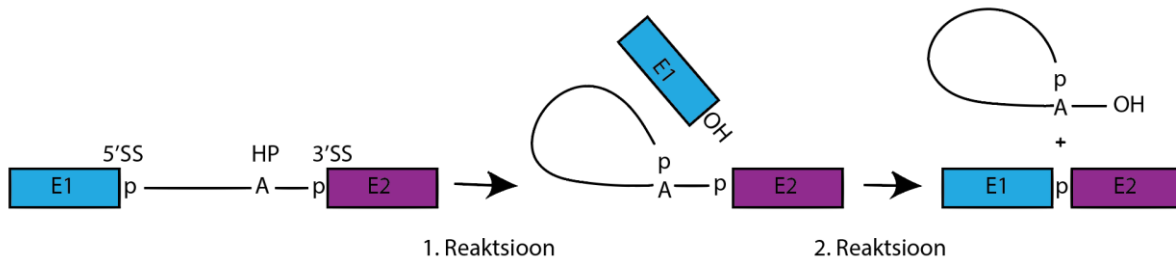
Protsess algab 5' splaiss-saidi, 3' splaiss-saidi, harusaidi (*branch site*), polüpürimidiinrakti ja terminaal-AG tuvastamisega. U1 snRNP tuvastab 5' splaiss-saidi, 3' splaiss-saidi U2AF ning harusaidi tuvastab U2 snRNP (Chabot ja Shkreta, 2016). Introni 5' lõpus asetseb 5' splaiss-sait ja see sisaldab universaalselt konserveerunud GU dinukleotiidi, 3' splaiss-sait asub 3' introni otsas (De Calais *et al.*, 2017). Koos U4/U6/U5 tri-snRNP abiga kaasatakse umbes sada valku, et muuta interaktsioone väikeste nukleaarsete RNA-de ja pre-mRNA vahel. See on vajalik selleks, et saaks introneid välja heita ja eksoneid ligeerida (Joonis 2) (Chabot ja Shkreta, 2016).

Cis-elemendid on väga vajalikud splaissimisel, sest nad suurendavad splaissimise täpsust. Nad on võimendajad ja vaigistajad (Chen ja Manley, 2009) ning *trans*-elemendid reguleerivad splaissimist (Fu ja Ares, 2014). Alternatiivne splaiissing on väga tugevalt reguleeritud protsess, mis sisaldab *trans*-elementide splaissimisfaktoreid ja *cis*-elementide reguleerivaid järjestusi ning mõlemad on väga tundlikud päritavatele ja somaatilistele mutatsioonidele (Bush *et al.*, 2017).

Võimendajad ja vaigistajad mõjutavad kui efektiivselt splaissimine möödub, seondues regulaatorvalkudele. Nad kas aitavad või represseerivad splaiissosoomi komponentidel kindlatel splaiss-saitidel assambleeruda. Kui splaissimine ei ole represseeritud, siis eemaldatakse pre-mRNA-st intronid kahe järjestikuse reaktsiooniga. Esimeseks reaktsiooniks on nukleofiilne rünnak 5' splaiss-saidile, mida vahendab introni harupunkti adenosini 2'OH rühm. Selle splaiss-saidi juurde tekib lõige ja introni 5' otsa harupunkti adenosin ligeeritakse, mille tulemusena tekib ling. Teiseks reaktsiooniks on 3' splaiss-saidi ründamine 5' eksoni 3'OH rühma poolt, mille tulemuseks on eksonite 5' otsa ja 3'otsa ligeerimine (Joonis 3). Selle reaktsiooni käigus moodustub valmis mRNA, mille seest on intron välja lõigatud (Will ja Lührmann, 2011).



Joonis 2. Splaissosoomi kompleks ja splaiising. Siin on näidatud skemaatiliselt, millest splaissosoom koosneb ja kus asuvad 5' splaiss-sait (ss), 3'ss, harupunkt ja polüpürimidiinitrakt. Eksonid on märgitud silindritena ja intronid joontega. Samuti on ära näidatud U2AF, U2 snRNP, tri-snRNP ja osa splaissosoomi komponentidest. (Kohandatud joonis Chabot ja Shkreta, 2016)



Joonis 3. Introni eemaldamine ja eksonite ligeerimine. Kastid on eksonid (E1 ja E2) ja intronid on jooned. Harupunkti (HP) adenosiini on märgitud tähega A ning 5' ja 3' splaiss-saitide (ss) lõpus olevad fosfaatrühmad on märgitud tähega p. (Kohandatud joonis Will ja Lührmann, 2011)

1.1.2. Splaiss-saidi valiku probleemid

Splaiissimine koosneb mitmest järjestikust reaktsioonist. Protsessi algatamiseks on vajalik leida autentsed 5' ja 3' splaiss-saidid, mis tuntakse ära lühikeste konserveerunud järjestuste abil 5' splaiss-saidi juures ja 3' splaiss-saidi juures oleva harupunkti järgi, millele järgneb enamasti ka polüpürimiiditrakt (Will ja Lührmann, 2011). Splaiss-saidile seondumine peab olema täpne, kuid see võib vahel osutada keeruliseks. Nimelt kui splaiissimise mehhanism eksib ühe nukleotiidiga, võib tulemuseks olla raaminihe ja tekkiv transkript läheb lagundamisele NMD-ga (Scotti ja Swanson, 2016).

Õige splaiss-saidi leidmist raskendab ka imetajate geenide ülesehitus, kus on palju alternatiivseid splaiissingu saite, mille seast valida. Protsessi teeb keerulisemaks ka asjaolu, et inimese eksonid on tihti väikesed, umbes 80% eksonitest inimese genoomis on alla 200 aluspaari pikad ning nende ümbruses on palju introne. Samuti on splaiissimine kotranskriptsiooniline protsess, mis sõltub RNA polümeraas II poolt läbiviidava elongatsiooni kiirusest. Järelikult peavad paljud reguleerivad valgukompleksi osad seonduma korrektselt, et tagada õige splaiss-saidi valik. Kui teatud reguleeriv osa ei seondu või seondub valesti, siis ei ole splaiissimise mehhanism võimeline sihtmärk-järjestusele seonduma ja splaiissimist ei saa läbi viia (Scotti ja Swanson, 2016).

1.1.3. Ebatüüpilised eksonid

Arvatakse, *et alu* elementidel, mis on primaatide spetsiifilised transponeeruvad elemendid, on olnud tähtis osa inimese genoomi ja geeniregulatsiooni võrgustiku evolutsioonis. Inimese genoomis on kõikidest transponeeruvatest elementidest kõige enim levinud just Alu elemendid, kattes üle 10% inimese DNA-st (Häsler ja Strub, 2006). Need elemendid sisaldavad palju saite, mis on splaiss-saidi signaali osas sarnased doonor- ja aktseptor-konsensusele. Seetõttu on Alu elementide insertioon soodustatud geenide intronilistesse piirkondadesse, mis võib põhjustada mutatsioone. Mutatsiooni tulemuseks võib olla uus ekson, mis kinnistub genoomi. Osad Alu eksonid on väga koespetsiifilised ja kõrge splaissimise aktiivsusega, kuigi Alu eksonite splaissimise aktiivsus on üldiselt madal. Alu eksonid asetsevad eelistatult mRNA 5' mitte-transleeritud regioonis ja arvatakse, et neil on tähtis roll seoses mRNA translatsiooni efektiivsuse reguleerimisega. Alu eksonid, mis sisestatakse valku kodeerivatesse geenidesse ja kodeerivatesse regioonidesse, sisaldavad tihti liiga varajast stoppkoodoni. See võib olla välja kujunenud mehhanism, mille abil hoitakse mRNA tase tasakaalus. Praegusel ajal ollakse arvamusel, *et alu* elementidel pole olnud piisavalt pikka aega evolutsioneerumiseks, mistõttu Alu eksonid ei produtseeri stabiilseid valke. See-eest on Alu eksonitel regulatoorne funktsioon, seal hulgas näiteks translatsiooni ja degradatsiooni reguleerimine (Lin *et al.*, 2016).

Krüptilised eksonid on praegustes andmebaasides annoteerimata eksonid. Nad ilmnevad tihti peale represseeriva RNA-seonduva valgu eemaldamist või peale mutatsiooni, mis suurendab nende splaissimise tõhusust. Sellised peidetud eksonid moodustuvad tihti transponeeruvatest elementidest. Krüptilised eksonid võivad tekitada moodustavas transkriptis liiga varajase stoppkoodoni, mis võib suunata transkripti NMD-le. Esinevad ka kvaliteedi kontrollrajad, mis vähendavad krüptilisi eksoneid sisaldavate transkriptide ekspressiooni ja sellest tulenevaid vigu (Sibley *et al.*, 2016).

Eksoneid, mis on lühemad kui 30 nukleotiidi nimetatakse mikroeksoniteks. Neid piiravad introonsed motiivid, mis seonduvad RNA-seonduvatele valkudega ja on vajalikud mikroeksoni kaasamiseks splaissimisel. Sellised eksonid on tugevalt konserveerunud ning nad koosnevad üldiselt kolmestest kordusest, milles on avatud lugemisraam ehk ORF (*open reading frame*). Mikroeksonitel on tähtis funktsioon ajus, kus see suurendab valkude mitmekesisust. Seetõttu põhjustab splaissimisel laialdane mikroeksonite vahele jätmise neuraalseid arenguhäireid (Sibley *et al.*, 2016).

1.1.4. Alternatiivne splaissing haigustes

Varasemalt on näidatud, et vigase alternatiivse splaissimise korral ajus on sageli tagajärjeks neuraalsed haigused. Näiteks, kui *SRRM4* geen on alla reguleeritud splaissimise tagajärjel, siis põhjustab see neuraalsete mikroeksonite defektset reguleerimist, mis on omane autismile (Irimia *et al.*, 2014). Ka Alzheimeri tõve ja epilepsiat seostatakse muutustega ioonkanalite splaissimise mustrites (Heinzen *et al.*, 2007). Lisaks on leitud, et muutused *SNCA* geeni isovormide suhtes on Parkinsoni tõve riskifaktoriks (La Cognata *et al.*, 2015).

Punktmutatsioonid, mis lõhuvad või nõrgestavad splaiss-saite ja aktiveerivad krüptilisi splaiss-saite, võivad inimestel põhjustada üle 200 haiguse. Nende hulgas on näiteks tsüstiline fibroos, mõned rinnavähi vormid ning progeeria. Nii produtseeritakse mRNA, mis kodeerib defektseid valke või valke, mis suunatakse NMD-le (Chabot ja Shkreta, 2016). Samuti võib vigane splaissimine viia selleni, et transkriptsioonis tekib vähem pre-mRNA-sid (Davidson *et al.*, 2012).

On leitud haigusi, mille puhul kaasub vigane mRNA splaissing, näiteks CHARGE sündroom. Praeguseks on teada, et peamine sündroomi põhjustaja on *CHD7* geenis olev heterosügootne mutatsioon, kuigi 30% patsientidest puudub vastav mutatsioon. Kõigil patsientidel on aga muutunud alternatiivse splaissingu muster. CHARGE sündroomi on uuritud ka *CHD7* mutatsiooniga hiiremudelil. Nii mutatsiooni suhtes heterosügootsetel kui homosügootsetel hiirtel on neuronites vigane splaissimine (vastavalt oli mõjutatud 227 ja 252 erinevat transkripti). Peamiseks defektiks oli eksoni vahele jätmine või introni kaasamine, kuid leidis ka harvemini esinenud variante, näiteks alternatiivse 3' splaiss-saidi kasutamine või alternatiivse 5' splaiss-saidi kasutamine (Bélanger *et al.*, 2018). Uueks kandidaatgeeniks on CHARGE sündroomi jaoks väljapakutud *FAM172A*, mis kodeerib AGO2-ga seonduvat FAM172A valku. Seondues AGO2-ga moodustub FAM172A-AGO2 kompleks, mis vajab stabiliseerimiseks DNA-d ja RNA-d. Selle kaudu mõjutab kompleks alternatiivse splaissingu regulatsiooni, mis põhjustab sündroomile omaseid splaissimisvigu (Bérubé-Simard ja Pilon, 2019).

Splaissimine põhjustab patoloogiat ka näiteks Huntingtoni tõve puhul. Nimelt on *HTT* transkripti esimeses eksonis kolmekordsed kordused, mis inhibeerivad järgneva introni splaissimist, seda sagedamini, mida pikem on CAG korduste arv. See omakorda aktiveerib

intronis oleva krüptilise poliadenüülimise saidi, mille transleerimisel tekkivad lühikesed mürgised peptiidid (Romo *et al.*, 2018). Need peptiidid kutsuvad omakorda esile sümptomeid, mis on omased Huntingtoni tõvele.

Leidub ka olukordi, kus alternatiivse splaissimise mõju ei ole alati negatiivne. Näiteks *LDLR* geenil on tekkinud selline alternatiivne variant, kus uuel saidil on inimese tervisele positiivne efekt. See variant vähendab madala tihedusega lipoproteiine ehk nn halba kolesterooli ja vähendab riski haigestuda südame-veresoonkonna haigustesse (Gretarsdottir *et al.*, 2015).

1.2. Platsenta

Platsenta on organ, mis luuakse iga raseduse alguses sügoodist ja sellel elundil on sama geneetiline taust nagu lootel (Burton ja Fowden, 2015). Raseduse ajal on platsenta loote jaoks kopsude, soolestiku, neerude ja maksa eest. Platsental on kaks osa, et see saaks oma funktsioone hästi täita – emapoolne ja lootepoolne osa (Burton ja Jauniaux, 2015). Paljude imetajate, näiteks lammaste (Spencer, 2014) platsenta on võimeline ise enda kasvu stimuleerima, saates signaale endomeetriumi näärmetele ja suurendades vajalike valkude sekreteerimist. Inimese puhul ei ole seda protsessi aga veel kinnitatud (Burton ja Jauniaux, 2015).

Platsenta on multifunktsionaalne ja selle organi põhilisteks funktsioonideks on varustada loodet hapniku, toitainete ja verega ning väljutada jääained. Platsental on endokriinne funktsioon ehk see sünteesib ja sekreteerib palju steroid- ja peptiidhormoone, mis aitavad ema organismi moduleerida ja lapsel kasvada. Tegemist on ka barjääriga ema ja loote vahel, nii saab lootel välja areneda isiklik neuroendokriinne süsteem ja gonaadid, puutumata kokku ema sugu- ja stressihormoonidega. Samuti kaitseb platsenta loodet parasiitide, viiruste ja kehale võõraste ainete eest (Burton ja Fowden, 2015).

1.2.1. Alternatiivne splaissimine rasedustüsistuste korral

HLA-G on inimese leukotsüüdi antigeen *HLA* klass Ib kuuluv valk, mis on ekspresseeritud

platsentas ja millel on unikaalsed alternatiivse splaissingu mustrid. *HLA-G-1* on kokku seitse alternatiivse splaissimise varianti, millest neli on membraanseoselised ja kolm on lahustuvad isovormid. *HLA-G* on ligand immuunretseptoritele ja on seotud erinevate interaktsioonidega, nagu näiteks looduslike tapja-T-rakkude proliferatsiooni ja tsütotoksiliste funktsioonide inhibeerimisega ja antigeene esitlevate rakkude diferentseerimise inhibeerimisega (Dahl *et al.*, 2014).

Kõik immunoregulaatorsed funktsioonid peavad õigesti initsieeritud olema, et ema organism loodet ära ei tõukaks. Arvati, et trofoblasti rakkudel puudub klassikalise polümorfse *HLA-A* ja *HLA-B* ekspressioon ning et ema immuunsüsteem vahetub ühelt tsütokiini profiililt teisele, tänu millele ära tõukamist ei toimu. Jääb aga looduslike tapjarakkude probleem, sest nende sihtmärgiks on rakud, mis ei ekspresseeri *HLA*-d. Selgus, et rakud ekspresseerivad mittepolümorfseid *HLA* klass Ib molekulid – *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* ja väikesel määral ka *HLA-C-d*. Nii ei vahenda looduslikud tapjarakud lüüsi ja ema organism ei tõuka loodet ära (Dahl *et al.*, 2014).

Kui immunoregulatsioon ei funktsioneeris esimese trimestri jooksul õigesti, siis võib see viia ebaõnnestunud trofoblasti invasioonini või vigase spiraalarteri remodelleerimiseni, mis omakorda võib halba verevarustust ja hüpoksiat põhjustada. Seetõttu võib preeklampsia olla ka mittefunktsionaalsest immunoregulatsioonist põhjustatud. Samuti on paljud uuringud näidanud, et preeklampsia ja spontaanne abort on seotud ebanormaalse *HLA-G* valgu ekspressiooniga. Preeklampsiaga naistel oli platsentas *HLA-G* ekspressioon vähenenud ning neil leidis rohkem lahustuvat *HLA-G5* isovormi võrreldes tervete rasedustega. Lisaks sellele arvatakse, et teise trimestri jooksul on *sHLA-G1* isovormil tähtis roll seoses ema immuunrakkude interaktsioonidega, mis indutseerivad tolerantsust loote suhtes. Uurides raske preeklampsiaga rasedusi selgus, et *sHLA-G1* isovormi ekspressioon on madalam võrreldes tervete rasedusega (Dahl *et al.*, 2014).

1.2.2. Splaissimine platsentas

Platsenta on organ, mille splaissimise mustreid on senini vähe uuritud. Sellest tulenevalt on ka vähe artikleid avaldatud, kus oleks seletatud, millised on splaissimise mustrid platsentas.

Üldiselt kui on splaissimist uuritud, siis on seda tehtud seoses mõne kindla haigusega ja vaadatud ainult spetsiifilist geeni. Seega tuleks tulevikus uurida, millised splaissimise mustrid platsentas üleüldiselt esindatud on.

Tervete raseduste puhul esineva platsenta geeniekspressioonis pärinevad 91% transkriptidest mitmeeksonilistest geenidest. Uurides splaissimise ühenduskohti selgus, et suure ülekaaluga oli kõige levinum variant GT/AG. Täpsemalt kasutati seda varianti kõigi proovide puhul üle 99% juhtudest. Teine levinuim variant oli CC/AG, mida kasutati enamasti üle 0,6% juhtudest. Kõige vähem levinud variant oli AT/AC (Majewska *et al.*, 2017).

Kasvuhormoonidel on tähtis roll seoses loote kasvu ja arenguga, aga nad aitavad ka ema organismil kohaneda rasedusega. Platsenta kasvuhormoon (PGH) on kodeeritud *GH2-1* transkripti ja platsenta laktogeen (PL) *CSH1-1* ja *CSH2-1* transkriptide poolt. Hormoonid on peamiselt sekreteeritud ema vereringesse ja nad seonduvad erinevate kudede retseptoritele, kus neil on palju funktsioone. Raseduse jooksul suureneb nende hormoonide tase silmnähtavalt ning madal hormoonide tase on seotud patoloogiatega nagu näiteks emakasisese kasvupeetusega (IUGR) ja preeklampsiaga. Nende geenide puhul esineb palju alternatiivseid vorme, mis on ka funktsionaalsed (Männik *et al.*, 2012).

Põhilisteks splaissimise mustriteks on transkriptid, mis on moodustunud viie kanoonilise eksoni ühendamisel- *GH1-1*, *GH2-1*, *CSH1-1* ja *CSH2-1* (MacLeod *et al.*, 1992). Leidub ka teisi mustreid, näiteks on *GH2* geenil kolm alternatiivselt splaissitud isovorm: *GH2-2* transkript sisaldab neljandat introni, *GH2-3* kasutab neljandas eksonid asuvat alternatiivset doonor splaiss-saiti ja *GH2-4* kasutab kolmandas eksonis leiduvat alternatiivset splaiss-saiti. Väike hulk *CSH* transkriptidest, enamasti *CSH1* geeni derivaadid, kaasavad splaissimisel ka neljanda introni. *CSHL1* alternatiivselt splaissitud produktid erinevad aga teistest geenidest, sest nad on kaotanud teises intronis oleva traditsioonilise doonor splaiss-saidi. Seetõttu on enamikel mRNA-del signaalpeptiid puudu ja nad ei ole võimelised sekreteeritavat valku tootma (Männik *et al.*, 2012).

1.2.3. Preeklampsia

Preeklampsia on raseduse komplikatsioon, mis mõjutab 5-8% kõikidest rasedustest. Haigus põhjustab emal kõrget vererõhku ja võib mõjutada teisi organeid nagu näiteks neere ja maksa. Leidub nii varajane kui ka hiline vorm, olenevalt kas sümptomid esinevad enne või pärast 34. gestatsiooninädalat. Varajast preeklampsiat võib põhjustada ebanormaalselt vähene platsenta invasioon, mis põhjustab omakorda hüpoksiat ja reperfusioonkahjustusi ning need põhjustavad oksüdatiivset stressi. Hilist vormi põhjustab see-eest eeldatavasti emal olev endoteeli- või vaskulaarhaigus. Veel ei ole aga täpselt teada, mis preeklampsiat põhjustab (Palmer *et al.*, 2017). Preeklampsia ei pruugi ainult ema mõjutada, vaid haigus võib ka loote kasvule mõju avaldada. See tähendab, et on preeklampsiaga rasedusi, millega kaasneb gestatsiooniaja kohta väike vastsündinu (Mol *et al.*, 2016).

1.3. Antud töös käsitletud geenide bioloogiline taust

1.3.1. *ADAM12*

ADAM12 (*ADAM metallopeptidase domain 12*) on glükoproteiin, mis on seotud rakkudevahelise signaliseerimisega ja raku pinnaretseptorite protelüütilise aktiivsusega. Valk on platsenta päritolu ja selle kogus suureneb alates kaheksandast gestatsiooninädalast kuni sünnituseni (Eastabrook *et al.*, 2018). Geen on ekspresseeritud mRNA tasandil enamjaolt platsentas, aga leidub ka väiksemal määral näiteks emakas, emakakaelas ja mujal. Valgu tasandil on geen ekspresseeritud ainult platsentas (<https://www.proteinatlas.org/>).

ADAM12-1 on 7 transkripti (Joonis 5), millest kõige pikem transkript on 7938 aluspaariga *ADAM12-202* (intronid on kaasamata) ja see sisaldab 23 eksonit. Neli transkripti ei ole valku kodeerivad ning kolmest kodeerivast transkriptist on üks splaissimise variant pikk ja kaks on lühikesed kärbitud vormid (<https://www.ensembl.org/index.html>, versioon 96). Lühikesed isovormid on sekreteeritavad, aga pikk jääb membraanseoseliseks (<https://www.proteinatlas.org/>). Samuti on *ADAM12* pakutud preeklampsia biomarkeriks, sest preeklampsia puhul on naistel *ADAM12* tase tunduvalt madalam (Eastabrook *et al.*, 2018).

ADAM12 on ekspresseeritud mRNA tasemel mõningates vähivormides, nagu näiteks pea ja kaela vähi, kopsuvähi ja rinnavähi puhul (<https://www.proteinatlas.org/>). Samuti on ka *ADAM12-1* seoseid teiste haigustega. Näiteks on leitud seoseid skisofreeniaga, Downi sündroomiga, preeklampsiaga, maksatsirroosiga, astmaga jt (<http://disgenet.org/>).

1.3.2. *AZIN1*

Orniitini dekarboksülaas (ODC) on ensüüm, mille aktiivsus on imetajates tugevalt reguleeritud ja ensüüm on vajalik polüamiinide biosünteesiks. *AZIN1* on ODC homoloog, millel puudub ensümaatiline aktiivsus ja valk viib läbi ODC posttranslatsioonilist kontrolli, reguleerides ODC aktiivsust. *AZIN1* inhibeerib ODC aktiivsust seondudes ODC monomeeriga, mistõttu ODC ei saa homodimeeri moodustada ja ensüüm lagundatakse. Läbi ODC inhibeerimise kontrollib *AZIN1* polüamiinide homöostaasi, aga *AZIN1* on võimeline homöostaasi mõjutama ka inhibeerides polüamiinide transpordisüsteeme plasmamembraanis. *AZIN1* on võimeline vajadusel omastama ekstratsellulaarseid polüamiine ja mõjutama rakkude jagunemist ning diferentseerumist (Ramos-Molina *et al.*, 2018).

AZIN1 (*antizyme inhibitor 1*) geenil on 10 transkripti (Joonis 5), mille pikim transkript on *AZIN1-201* pikkusega 4196 aluspaari, 12 eksonit. Kõikidest transkriptidest pooled ei ole valku kodeerivad (<https://www.ensembl.org/index.html>, versioon 96). RNA ja valgu tasandil on *AZIN1* ekspresseeritud laias spektris. *AZIN1* mRNA on kõige kõrgemalt ekspresseeritud ajukoores, platsentas, kilpnäärmes ja munajuhas ning valgu tasandil on kõrgelt ekspresseeritud neerupealistes, maksas, pankreases, soolestikus ja platsentas (<https://www.proteinatlas.org/>).

AZIN1 on paljudes erinevates vähivormides ekspresseeritud. Enim on geen valgu tasandil ekspresseeritud maksavähi ja munasarjavähi puhul. Teised vähivormid, kus *AZIN1* geeni ekspressiooni on täheldatud, on näiteks maovähk, pärasoolevähk, rinnavähk, kilpnäärmevähk, pankrease vähk jt (<https://www.proteinatlas.org/>). Samuti on leitud ka, et *AZIN1* võib olla seotud hepatiit C, meeste viljatustega ja Bardet-Biedl sündroomiga (<http://disgenet.org/>).

1.3.3. *FNI*

FNI (*fibronectin 1*) ehk fibronektiin 1-1 on 27 transkripti (Joonis 5) ja pikimaks transkriptiks on *FNI-203*. Transkripti pikkuseks on 2477 aluspaari ja sisaldab 46 eksonit (<https://www.ensembl.org/index.html>, versioon 96). Tegemist on geeniga, mis kodeerib glükoproteiini, millel on kaks lahustuvat vormi. Dimeerne vorm paikneb plasmas ja multimeerne vorm raku pinnal ning ekstratsellulaarsest maatriksis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *FNI* on laialdaselt ekspresseeritud erinevates rakutüüpides ja on seotud rakkude adhesiooni ja migratsiooni protsessidega, sealhulgas ka näiteks embrüogeneesi ja verehüübimisega. Samuti on leitud, et *FNI* on seotud ekstratsellulaarses maatriksis toimuvate muutustega, mis leiavad aset füsioloogiliste ja patoloogiliste protsesside ajal. *FNI* on vähkkasvajate puhul tugevalt ekspresseeritud, mistõttu arvatakse, et geen põhjustab ka rakkude proliferatsiooni (Cai *et al.*, 2018).

FNI ekspresseeritakse enim mRNA tasemel platsentas, vähem kopsus, silelihastes, maksas ja seemnepõiekestes ning on ka teisi kudesid, kus *FNI*-te väga vähesel määral ekspresseeritakse. Valgu tasandil on *FNI* kõrgelt ekspresseeritud neerudes, keskmise tasemega platsentas ja mitmes teises koes sealhulgas väikeajus, neerupealistes ja südamelihastes (<https://www.proteinatlas.org/>). *FNI* mRNA on ekspresseeritud kõikides uuritavates vähivormides Protein Atlase andmebaasis. FN1 valk on tugevalt ekspresseeritud kilpnäärmevähi, maksavähi, pankrease vähi, uroteeli vähi, pärasoolevähi ja melanoomi puhul (<https://www.proteinatlas.org/>). Duchenne lihasedüstroofia, diabeet, Downi sündroom, ekseem, hüperglükeemia, meningiit ja skisofreenia on vaid mõned näited, millel on samuti leitud seos *FNI*-ga (<http://disgenet.org/>).

1.4. RNA splaissvariantide kvantiseerimine LeafCutter tarkvara abil

LeafCutter kvantiseerib RNA splaissimises saadud erinevaid variante RNA-seq andmete põhjal. Programm moodustab eelnevalt referentsgenoomile joondatud RNA sekveneerimisandmete põhjal splaiss-sündmuste klastrid. Tänu sellele ei erista programm erinevaid transkripte, vaid ainult kindlat piirkonda, kus see loeb igat splaissimise sündmust. LeafCutter programmiga on võimalik tuvastada näiteks vahele jäetud eksoneid, 5' ja 3'

alternatiivse splaiss-saidi kasutust (Li *et al.*, 2018).

Programm võimaldab võrrelda erinevaid gruppe omavahel, näiteks antud töös olid kasutusel grupid preeklampsia (PE) ja kontrollgrupp (NORM). Moodustatud klastrite siseselt võrdleb analüüs kõiki kattuvaid introne ja näitab alternatiivseid introni väljalõikamise sündmusi. Haruldased sündmused filtreeritakse välja, sest need tekitavad müra. Kui analüüs on läbi viidud, annab programm joonise, kus on ära näidatud 5%-lise FDR väärtusega erinevalt splaissitud sündmused (Li *et al.*, 2018).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on :

- a) Tuvastada platsentas alternatiivsete transkriptide hulga proportsioone valitud geenides (*ADAM12*, *AZINI*, *FNI*) fragmentanalüüsi meetodil.
- b) Replitseerida varasemalt meie laboris tuvastatud alternatiivse splaissingu mustri erinevusi preeklamptiliste ja normaalsete platsentade vahel.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Uuringu disain

Käesoleva töö (Joonis 4) aluseks on varasemalt meie laboris Mario Reimani poolt läbi viidud uuring, kus leiti, et preeklampsia korral on diferentsiaalse ekspressiooniga järgnevate geenide alternatiivsed transkriptid: *CYTH3*, *FNI*, *AZINI*, *ADAM12*, *PSG1*, *PSG11* ja *PAPPA2* (avaldamata andmed, Lisa 1). Nende seast otsustati edasi minna kolme geeniga (*ADAM12*, *AZINI*, *FNI*), millel oli kõige suurem transkripti kasutuse muutus ning võimalikult madal P-väärtus. Kasutades varasemalt teadaolevaid transkriptide FPKM (*fragments per kilobase million*) väärtusi jäeti edasisest uuringust välja transkriptid, millel oli platsenta koes liiga madal ekspressioon (<3%).

ALTERNATIIVSE SPLAISSINGU MUSTRITE MÄÄRAMINE

- Leafcutter programm (<http://davidaknowles.github.io/leafcutter/>)
N=16 (PE vs NORM)
- Teostatud M. Reimani poolt

PRAIMERITE DISAIN

- Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) ja Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)
- Teostatud T. Kikase (*AZINI*, *FNI*, *ADAM12*) ja K-R. Ojassoo (*ADAM12*) poolt

RNA-DE TÖÖTLUS (n=32)

- RNA eraldus TRIzol-i meetodil
- RNA puhastus naatriumatsetaadi meetodil
- DNAasi töötlus Invitrogen *TURBO DNA-free Kit*-i protokoll järgi
- cDNA süntees Invitrogen'i *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix for qRT PCR* protokoll järgi
- Teostatud K-R. Ojassoo poolt

FRAGMENTANALÜÜS (n=8)

- PCR *ADAM12* ja *FNI* geenide jaoks
- Fragmentanalüüsi piikide analüüs Peak Scanner-i (<https://www.thermofisher.com/ee/en/home.html>) abil
- Gruppidevaheline statistiline analüüs (t-test)
- Teostatud K-R. Ojassoo poolt

Joonis 4. Skeem tööetappidest. Rohelisega on märgitud teiste poolt läbiviidud etapid ja sinisega on näidatud etapid, kus mina osalesin.

2.2.2. Valim

Käesolevas uuringus kasutati indiviide REPROMETA uuringust. Projekti käigus koguti Tartu Ülikooli Naistekliinikus platsentasid üksikrasedustelt, kus gestatsiooniaeg oli 36-42 nädalat. Uuring viidi läbi 2006-2011 aastatel professor Maris Laane juhendamisel ja Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee andis loa uuringu läbi viimiseks (Eesti; load 146/18,27.02.2006;150/33,18.06.2006;158/80,26.03.2007) (Männik *et al.*, 2010). Töö raames koguti 350 proovi, samuti koguti informatsiooni nii ema, isa kui vastsündinu kohta. Ema puhul

koguti informatsiooni näiteks haiguste, vanuse ja eluviiside kohta nagu suitsetamine ning isa puhul haiguste, vanuse, pikkuse ja kaalu kohta. Vastsündinu puhul koguti andmeid näiteks soo, sünnikaalu ja gestatsiooniaja kohta. REPROMETA uuringu käigus kogutud proove on ka varasemalt kasutatud ning täpsemalt kirjeldatud näiteks Männik *et al.*, 2010, Sõber *et al.*, 2015 ja Juhanson *et al.*, 2016 töödes.

REPROMETA uuringust jäeti välja inivid, kui lootel esinesid sünni- või kromosoomianomaaliad. Välistati perekonnad, kus oli teada juhtumeid päritavatest haigustest. Samuti välistati patsiendid, kellel oli eelnevate raseduste ajal esinenud gestatsioonidiabeet, hüpertensioon või krooniline neeruhaigus

REPROMETA valim sisaldas viite alamgruppi: kontrollgrupp (NORM), preeklampsia (PE), gestatsioonidiabeet (GD), gestatsiooniaja kohta väikesed- (SGA) ja suured vastsündinud (LGA). Kontrollgruppi kuulusid rasedused ilma tüsistusteta, mis lõppesid lapse sünniga, kus lapsel oli normaalne sünnikaal gestatsiooniaja kohta. Kaaluprotsentiilid on arvatud Eesti sünniregistris oleva informatsiooni alusel kohaldatuna gestatsiooniajale ning soole (Sildver *et al.*, 2015) ja normaalne sünnikaal jääb kasvukõveral 10. ja 90. protsentiili vahele. Lapsed, kes peale sünni olid liiga suured oma gestatsiooniaja kohta (>90. protsentiili kasvukõveral) jaotati gruppi LGA ja lapsed, kes olid liiga väikesed (<10. protsentiili kasvukõveral) jaotati gruppi SGA.

Emadel, kellel esines raseduse ajal raske preeklampsia jaotati vastavasse gruppi. Igal patsiendil PE grupis esines hüpertensioon (süstoolne vererõhk ≥ 160 mmHg ja/või diastoolne vererõhk ≥ 110 mmHg) ja lisandus veel vähemalt üks lisasümptom. Sümptomiteks olid trombotsütopeenia, maksakahjustus, neerupuudulikkuse teke, proteiinuuria >5 g 24 tunni jooksul või tekkinud aju- või nägemishäired. Kõikidel preeklampsia juhtumitel oli esimeseks sümptomiks peale 34 gestatsiooninädalat tekkinud hüpertensioon või proteiinuuria.

Antud töö põhines RNA-seq andmetega pilootvalimil, mis sisaldas 16 platsentat (NORM, n=8; PE, n=8) REPROMETA valimist. Gruppides oli sarnane gestatsiooniline vanus ja sündinud tüdrukute ning poiste osakaal (Tabel 1). Samuti oli kõikides gruppides nii keisrilõikega kui ka vaginaalseid sündi (Sõber *et al.*, 2015).

Antud töös kasutati replikatsioonivalimis REPROMETA uuringust pärinevat 4 preeklampsia ja 4 kontrollgrupi proovi, mis ei kattu pilootvalimiga. Nii PE kui ka NORM grupis oli kaks poissi ja kaks tüdrukut.

Tabel 1. Kliiniline informatsioon proovide ja vastsündinute kohta.

		RNA sekveneerimine		Fragmentanalüüs	
Kliiniline parameeter	Ühik	NORM	PE	NORM	PE
Proovide arv	n	8	8	4	4
Vanus	päev	279 (260-291)	266 (260-271)	282 (268-291)	275 (264-287)
Kaal	gramm	3703 (3102-4220)	22794 (2170-3570)	3675 (3520-3894)	3335 (2750-4250)
Sugu	poiss/tüdruk	5/3	4/4	2/2	2/2

Andmed on esitatud mediaani järgi (miinimum-maksimum), NORM – kontrollgrupp, PE – preeklampsiaga grupp.

2.2.3. RNA eraldus

Platsenta koeproovist lõigati tükk, mis on 30-50 mg raske. Proovile lisati kiiresti 1,1 ml TRIzol-i (ThermoFisher) ja proov tükeldati seejärel skalpelli abil ära. Kui tükid olid piisavalt väikesed, koguti Petri tassi sisu pipeti abil 1,5 ml suurusesse tuubi. Segu suspendeeriti 1ml süstlaga, mille otsas on 22-23 suurusega nõel. Kui segus enam suuri tükke polnud, lasti segu veel 10-20 korda süstlast läbi. Järgmisena lisati segule 200 µl kloroformi ja seejärel loksutati ägedalt toatemperatuuril segu 3 minutit, millele lisandusid kolm vahepealset pausi, kus tuub pidi umbes 10-20 sekundit seisma. Järgnes 15 minutit tsentrifugimine 4 °C ja 12000 g juures. Peale tsentrifugimist eraldati vesifaas, mis pipeteeriti uude tuubi, ilma et hall-valge vahefaas kaasa tuleks. Vesifaasile lisati võrdses koguses isopropanooli (500 µl) ja tuubi segati raputades, millele järgnes vorteks maksimumvõimsusel. Segul lasti 10 minutit seista, aeg-ajalt vorteksil segades umbes iga kahe minuti tagant mõned sekundid. Peale seismist tsentrifugiti segu toatemperatuuril 16000 g juures 20-25 minutit. Järgmisena eemaldati tõmbekapis supernatant ja lisati 1 ml värskelt valmistatud külma 75% etanooli. Järgnevalt tsentrifugiti proovid 4 °C ja

7500 g juures viis minutit. Tekkinud supernatandi pidi väga hoolikalt eemaldama, et sade oleks võimalikult kuiv jäeti proov kuivama kuni valge RNA muutus läbipaistvalt hallikaks. Proov lahustati 50-120 µl RNAasi-vabas vees, mille järel segati proovi nipsutades ja pandi vorteksisse maksimumpööretele kuni RNA tükk on lahustunud. Lõpetuseks tuli piisad tuubi põhja tsentrifuugida ja kuumutada proove 10 minutit 57 °C juures, millele järgnes vorteks ja kiire tsentrifuugimine, et tilgad uuesti tuubi põhja saada. Proov läks seejärel jääle ja kvaliteedikontrolli jaoks eemaldati 3 µl. Kvaliteedikontroll viidi läbi NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (ThermoFisher). Lõpuks läksid kõik proovid -80 °C juurde hoiustamisele. Proove tuleb hoida terve protokolliga vältel jääle, kui pole teisiti öeldud.

Kui proovid olid hoiustatud etanoolis, siis viidi eraldus lõpuni teisiti. Proovid võeti külmast välja ja sulatati üles metallbloki peal. Kui proovid olid üles sulanud tsentrifuugiti proovid 4 °C ja 7500 g juures viis minutit. Seejärel eemaldati supernatant ja lasti proovidel kuivada. Kuivadele proovidele lisati 1ml 70% etanooli ja proovid tsentrifuugiti uuesti viis minutit 4 °C ja 7500 g juures. Väga hoolikalt eemaldati supernatant ja seejärel lasti proovidel uuesti kuivada. Proovid olid kuivad, kui RNA oli valgest läbipaistvaks muutunud. Järgmisena lisati proovidele 100 µl RNAasi-vaba vett ja proove segati vorteksil maksimumpööretel kuni RNA on lahustunud. Piisad tsentrifuugiti tuubi põhja ja proovid läksid 10 minutiks 57 °C juurde seisma. Järgnes vorteks, kiire tilkade alla tsentrifuugimine ja proovid läksid lõpetuseks jääle. Kvaliteedikontrolli jaoks eemaldati 3 µl ja ülejäänud läks -80 °C juurde hoiustamisele.

Selle töö raames eraldasid mina RNA kaheksast koeproovist, ülejäänud vajaminevatest proovidest oli RNA eelnevalt teiste uuringutega seoses eraldatud.

2.2.4. RNA puhastus

RNA puhastuseks lisati RNA eraldusest saadud proovidele 10 µl (10% RNA ruumalast) NaAc-d ja 250 µl 96%-list külma etanooli. Proove segati 10 sekundit vorteksil ja viidi järgnevalt -20 °C juurde üleöö seisma. Järgmisel päeval segati proove alustuseks tsentrifuugis 30 minutit maksimumpööretel 4 °C juures. Järgmisena eemaldati supernatant ja proovidele lisati 500 µl külma 75%-list etanooli ning proovid pandi 5 minutiks tsentrifuugi 7500 g juurde. Seda etappi korrati kolm korda ja peale viimast pesu lasti proovidel toatemperatuuril kuivada. Lõpetuseks

lisati 100 µl RNAasi-vaba vett, proove segati nipsutades ja nad asetati mõneks sekundiks vorteksile. Järgnes tilkade kiire alla tsentrifuugimine ja proovid viidi -80 °C juurde hoiustamisele. Mina viisin RNA puhastuse läbi 32 proovi puhul.

2.2.5. DNAasi töötlus

Dnaasi töötlus viidi läbi kasutades Invitrogen *TURBO DNA-free Kit*-i (ThermoFisher). Alguses tuli RNA lahjendada 5 µg 25 µl kohta. Seejärel lisati 2,5 µl 10× *TURBO DNase Buffer*-it ja segati õrnalt suspendeerides. Järgmisena lisati 0,5 µl *TURBO DNase Enzyme*-i ja samuti segati kergelt suspendeerides. Järgnes 20 minutiline inkubeerimine 37 °C juures. Peale seda lisati 5,6 µl *DNase Inactivation Reagent*-i, mida segati vorteksil enne lisamist. Järgnes inkubeerimine toetemperatuuril 5 minutit, mille ajal tuli tuubi 2-3 korda nipsutades segada. 5 minuti möödudes pandi tuubid tsentrifuugi 1,5 minutiks ja 10000 g juurde. Supernatant pandi uude tuubi, ilma et sade kaasa oleks tulnud. Uues tuubis oli seega 20 µl Dnaasi vaba RNA-d. Mina tegin DNAasi töötlust 6 proovile.

2.2.6. cDNA SÜNTEES

cDNA süntees viidi läbi kasutades Invitrogen'i *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix for qRT PCR* (ThermoFisher) komplekti ning tootjapoolset protokollit. Enne reagentide kokku segamist tuli välja arvutada lisatava RNA kogus ja sellest lähtuvalt ka vee kogus. Ainete kokku segamist alustati veest ja seejärel lisati 10 µl *RT reaction Mix*-i. Järgmisena lisati RNA ja viimasena lisati 2 µl *RT Enzyme Mix*-i. Iga uue komponendi lisamisel segati valmivat segu suspendeerides. Peale viimase komponendi lisamist segati segu kergelt toksides näpuga vastu tuubipõhja ning sellele järgnes tilkade kiire tsentrifuugimine tuubi põhja. Seejärel läksid proovid PCR-masinasse, programmi lõppedes jahutas masin end 4 °C peale ja proovid asetati seejärel jääle. Järgmisena lisati 1 µl RNase H-d igasse proovi, millele järgnes vortex ja kiire tilkade tsentrifuugimine tuubi põhja. Proovid läksid järgmisena termoblokki, kus nad seisisid 20 minutit 37 °C juures ning peale seda oli süntees läbiviidud ja proovid läksid -20 °C juurde hoiustamisele. Mina tegin cDNA sünteesi 32 proovile.

PCR-masina cDNA sünteesi programm:

Praimerite seondumine	25 °C 10 min
DNA polümerisatsioon	50 °C 30 min
Ensüümi desaktiveerimine	85 °C 5 min
Hoiustamine	-20 °C

2.2.7. Praimerite disain

Praimerite disaini viis läbi Triin Kikas, mina tegin kaasa *ADAM12* praimerite disainis. Disainimisel võeti aluseks ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) andmebaas, sest RNA sekveneerimise andmed, mille alusel LeafCutter analüüs läbi viidi, olid joondatud vastavalt sellele andmebaasile. ENSEMBL-ist eksporditi vajaminevate geenide transkriptide cDNA järjestused. Praimerite disainimiseks kasutati veebiprogrammi Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>), sisendiks vastava transkripti cDNA ning kasutades vaikimisi seadeid. Saadud praimerid (Tabel 2) kontrolliti Primer BLAST-is (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), vältimaks praimeripaari seondumist ülejäänud genoomis. Disainimisel oli eesmärgiks, et praimerid asetseksid eksonites nii, et saaks eristada erinevaid transkripte (Joonis 5).

Triin Kikas koostas PCR-i optimeerimise plaani, mille katsete läbiviimisel mina osalesin. Optimeerimisel oli vaja kõik praimeripaarid ükshaaval läbi proovida ja vaadata milline temperatuur on PCR-il nende jaoks kõige sobilikum. Samuti katsetati MgCl₂, praimerite, polümeraasi ja cDNA koguseid ning *AZINI* geeni puhul katsetati ka, kas Solution S-i lisamine on vajalik. Opimiseerimise käigus saadeti üksikud individid ka fragmentanalüüsi, et kontrollida vajalike produktide olemasolu.

Tabel 2. Praimerjärjestused.

Praimeripaari ID	Parem/reverse praimer	Vasak/forward praimer
AZIN1-1	CGTTGAAGTCGAACTGCTCT	TGGGTATTTCTGCTCAAGGTAAC
AZIN1-2	CGTTGAAGTCGAACTGCTCT	GCCTTCTCTGCCTCTTCTCA
AZIN1-3	CGTTGAAGTCGAACTGCTCT	TGATGTCACCAGGCCACG
AZIN1-4	CGTTGAAGTCGAACTGCTCT	TGGGAAGCAGCAAAGATTGG
AZIN1-5	CGTTGAAGTCGAACTGCTCT	GGGCATGGAGGTTTCACATC
ADAM12-1	TGTCAGTGAGGCAGTAGACG	TCTTTGGGGTTCACGAGTGT
ADAM12-2	TTCGGTGGGTAGGAATCTGG	TCTTTGGGGTTCACGAGTGT
FN1-1	TGACAACTCTGCAACATCTTCC	GCCCCTACTACTGACACA
FN1-2	AGGGTTCTTCATCAGTGCCA	ACCATACCCGCCGAATGTAG
FN1-3	AGGGTTCTTCATCAGTGCCA	ACTATCACCTGTACCCACACG
FN1-4	GAGCTGAACATTGGGTGGTG	GAGCTATTCCCTGCACCTGA

2.2.8. PCR

PCR viidi läbi lõppmahuga 25 µl. Esimesena pandi tuubi vesi, seejärel lisati puhver 10× PCR *reaction Buffer with* (NH₄)SO₂, dNTP-d, MgCl₂, praimerid ja DNA polümeraas. Viimasena lisati segule 0,5 µl cDNA-d (Tabel 3). Iga uue komponendi lisades segati segu suspendeerides. Kui kõik komponendid olid kokku segatud ja strippi asetatud, siis tsentrifuugiti tilgad tuubi põhja. Stripid asetati seejärel PCR-masinasse, mis on programmeeritud vastavalt allpool välja toodud programmidele. Pärast PCR läbiviimist jooksutati proove tulemuse visualiseerimiseks 2%-lisel agarosgeelil, 1 tund 100 V juures.

PCR-masina programmid:

FNI/ADAM12

Algne denaturatsioon	95 °C	15 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 10 tsüklit
Praimerite seondumine	57 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	50 sek	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 20 tsüklit
Praimerite seondumine	48 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	50 sek	
Inkubatsioon	72 °C	10 min	
Säilitamine	4 °C		

AZINI

Algne denaturatsioon	95 °C	15 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 10 tsüklit
Praimerite seondumine	56 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	50 sek	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 25 tsüklit
Praimerite seondumine	47 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	50 sek	
Inkubatsioon	72 °C	10 min	
Säilitamine	4 °C		

Tabel 3. PCR-i kogused ja lõppmahud.

Komponendid	<i>AZINI</i> (kogused µl)	Lõppkontsentratsioon	<i>ADAM12</i> (kogused µl)	Lõppkontsentratsioon	<i>FNI</i> (kogused µl)	Lõppkontsentratsioon
cDNA	0,5		0,5		0,5	
DNA polümeraas	0,4	2 U	0,4	2 U	0,4	2 U
MgCl ₂	2,5	2,5 mM	2,5	2,5 mM	2,5	2,5 mM
dNTP	3,8	0,3 mM	3,8	0,3 mM	3,8	0,3 mM
Puhver: 10× PCR <i>reaction</i> <i>Buffer with (NH₄)SO₂</i>	2,5	1 x	2,5	1 x	2,5	1 x
Solution S 10×	2,5	1 x	-	-	-	-
R-praimerid	0,8 (x1)	0,3 µM*	0,4 (x2)	0,2 µM	0,4 (x3)	0,2 µM
F-praimerid	0,4 (x5)	0,2 µM	0,4 (x1)	0,2 µM	0,4 (x4)	0,2 µM
Vesi	9,1		14,2		12,7	
Kogumaht	25		25		25	

*praimerite lõpp-kontsentratsioon antud ühe praimeriga kohta

2.2.9. Fragmentanalüüs ning andmete statistiline analüüs

Fragmentanalüüs viidi läbi Eesti Biokeskuse Tuumiklaboris. Igast praimeripaarist oli üks praimer märgistatud FAM fluorestsentsmärgisega. Fragmentanalüüsi jaoks sisestatakse kõrge pinge abil PCR-i produktid kapillaaridesse, mis sisaldavad polümeere. DNA on negatiivselt laetud ja seetõttu hakkab see kapillaaris positiivse elektroodi suunas liikuma. Väiksemad fragmendid liiguvad kiiremini kui suured, tänu millele neid saab suuruse järgi eraldada. Fragmendid on fluorestsents märgisega ja annavad seetõttu signaali, kui fragmendid laserkiire alt läbi liiguvad. Spetsiifiline kaamera püüab need signaalid kinni ja informatsioon muudetakse digitaalseteks andmeteks ümber, mida saab hiljem analüüsida. Fragmentanalüüs on täpne süsteem, analüüs suudab eristada fragmente, mis erinevad üksteisest pikkuse poolest vaid ühe nukleotiidiga (<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/fragment-analysis-fundamentals.html>). Antud töös kasutati pikkuse määramiseks pikkusmarkerit LIZ500.

Saadud andmeid analüüsiti Peak Scanner programmis, mis võimaldab piikide kõrgust ja pindala kvantiseerida. Läbi nende on võimalik määrata fragmendi suhtelist kontsentratsiooni, mis on vajalik hilisemateks arvutusteks. Samuti kontrolliti õigete pikkustega fragmentide olemasolu.

ADAM12 geeni puhul uuriti A202 ja A201 transkripti 19-da eksoni kasutamist. Sellest tulenevalt, kas esineb rohkem pikka transkripti, millel on 23 eksonit, või 19 eksoniga lühikese transkripti. Selleks arvutati A201 ja A202 transkriptide suhe, kasutades transkriptidele vastavate fragmentide piikide pindala, valemiks oli $A201/A202$.

FNI geeni puhul loeti huvipakkuvaks transkriptiks F209, seal on kaasatud ekson, mida teistes transkriptides ei esinenud. F209 transkripti võrreldi kolme teise transkripti summaga ehk arvutati kassetteksoni esinemise suhe mitteesinemisega – $F209/(F204+F211+F212)$. Fragmentanalüüs tuvastas kaks erinevat fragmenti, mis kuulusid F204 transkriptile. Mõlemad fragmendid annavad informatsiooni transkripti F204 kogusest ja seetõttu kasutati valemis nende aritmeetilist keskmist. Transkript F211 ja F212 koguse määramiseks kasutati fragmenti 122 bp, mis võimaldas mõlema transkripti koguse korruga määramist.

Andmete analüüsis võrreldi RNA sekveneerimisandmete põhjal arvutatud transkriptide ekspressioonitase FPKM ja fragmentanalüüsist saadud PCR produktide koguseid.

Transkriptide omavahelise suhte statistiline olulisus saadi kasutades t-testi. Tulemuse lugesin statistiliselt oluliseks, kui P-väärtus on väiksem kui $\alpha=0,05$.

2.3. Tulemused

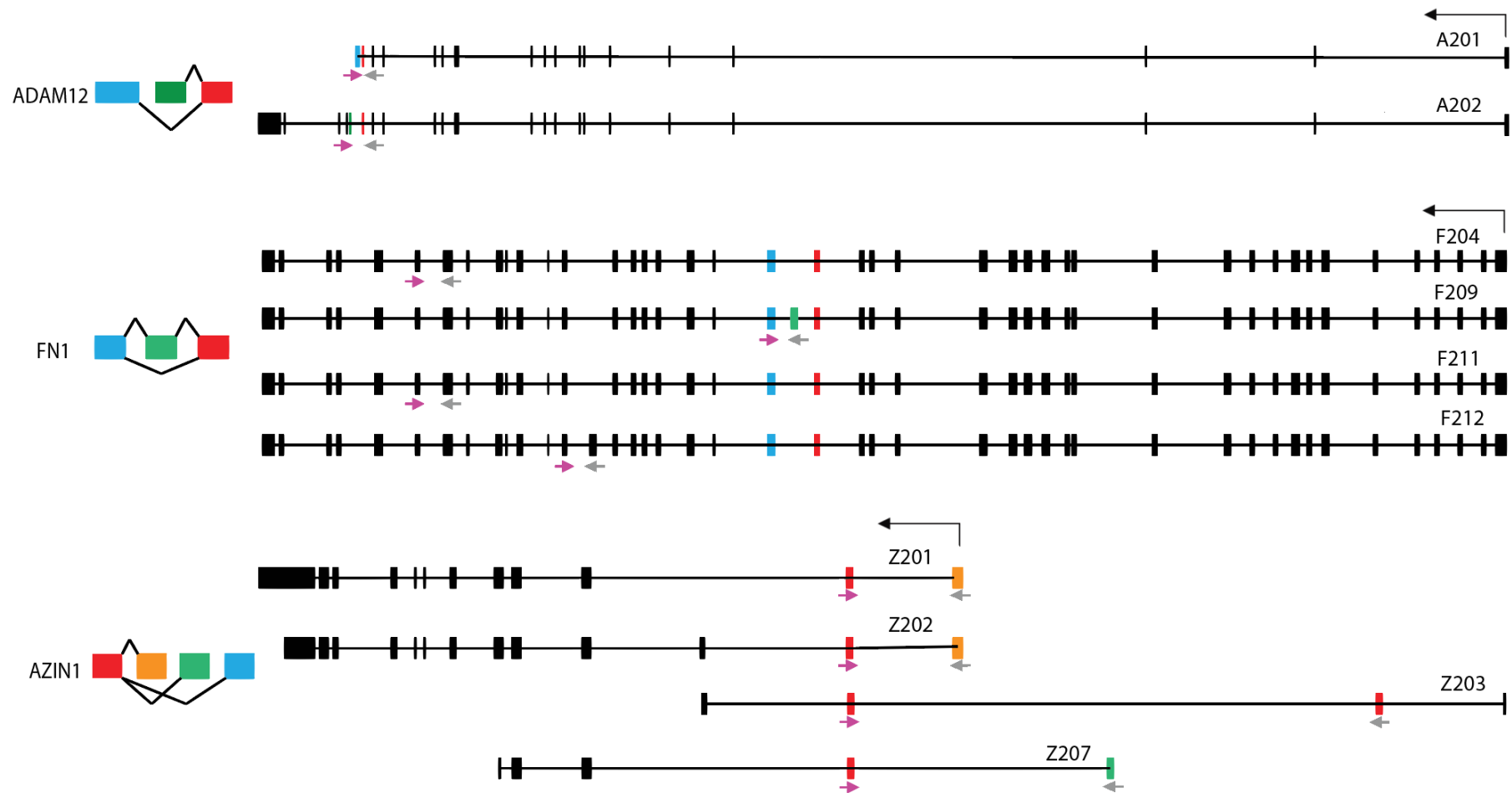
2.3.1. PCR-i optimeerimine ja praimerite kontroll

Algselt viidi läbi PCR-i optimeerimine, selleks katsetati, kas paremad tulemused tulevad 0,5 μ l või 1 μ l cDNA lisamisega. Samuti katsetati, milline kogus magneesiumkloriidi on kõige sobilikum, kas 1,5 μ l, 2,5 μ l või 3,5 μ l. Lisaks testiti ka praimeripaaride töötamist eraldi *singleplex*-ina. Resultaadiks oli, et kõige paremad tulemused tulevad 0,5 μ l cDNA ja 2,5 μ l $MgCl_2$ kasutades. Praimeripaare kasutades tulid kõik oodatud produktid *ADAM12* ja *FNI* geenide puhul üles. *ADAM12* puhul esinesid fragmendid 200 bp ja 300 bp pikkusmarkeri vahel ning umbes 400 bp markeri juures. *FNI* geenil tulid kõik viis oodatava pikkusega fragmendid üles (122 bp, 153 bp, 177 bp, 215 bp ja 225 bp) (Tabel 4).

Tabel 4. Oodatavate fragmentide pikkused.

Geen	Transkriptid*	Produkti suurused (bp)
<i>ADAM12</i>	A201	248
	A202	397
<i>AZIN1</i>	Z201	173 / 383 / 495
	Z202	173 / 383
	Z203	213
	Z207	178
<i>FNI</i>	F204	215 / 153
	F209	177
	F211	122
	F212	122 / 225

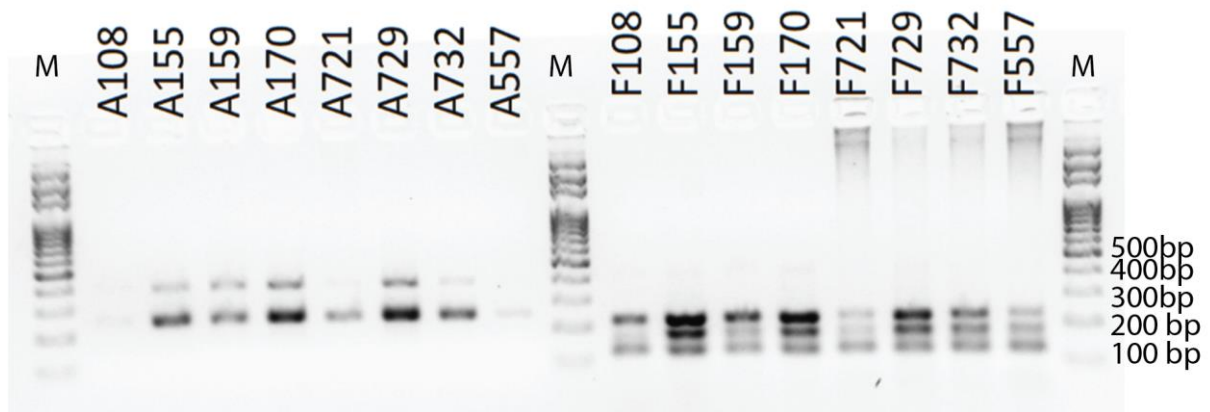
bp – aluspaari, *ENSEMBL (v96) transkriptide ID alusel nimetatud



Joonis 5. Geenide splaissimise mustrid ja transkriptid. Geenijoonised ei ole skaalas. Näidatud on ainult selles töös käsitletud transkriptid, A – *ADAM12*, F – *FN1* ja Z – *AZIN1*. Eksonid on märgitud kastidega ja intronid joontega. Esimene ekson asub kõige paremal ääres, musta noolega on transkripti algus märgitud. Punasega on näidatud ühiselt splaissitud ekson ning sinine, roheline ja oranž on erinevalt splaissitud eksonid, lilla nool – *reverse* praimer, hall nool – *forward* praimer.

2.3.2. Fragmentanalüüs

PCR-i produktide olemasolu kontrolliti 2%-lisel agarosgeelil, kas geenidel esinesid meie poolt ennustatud pikkustega produktid (Joonis 6). Eesti Biokeskuse Tuumiklaborisse fragmentanalüüsi saadeti ainult *ADAM12* ja *FNI* geenide PCR-i produktid, sest *AZINI* geeni puhul ei tulnud kõik PCR-i produkte üles. Fragmentanalüüsi tulemused *ADAM12* ja *FNI* geenis kaheksa indiviidi kohta (4 PE grupist ja 4 NORM grupist) visualiseeriti Peak Scanner-i abil.

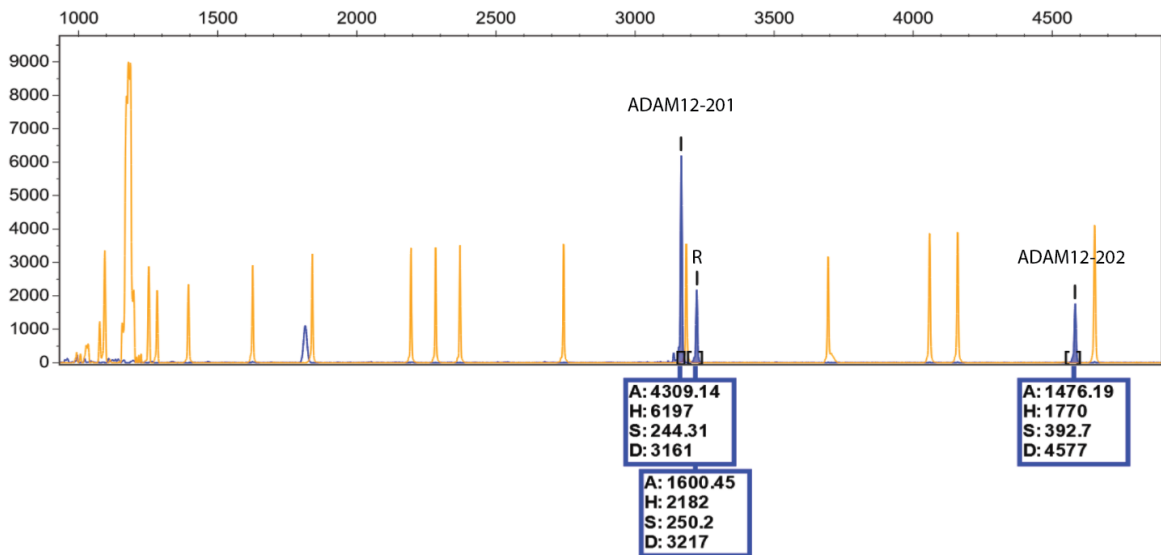


Joonis 6. Geelipilt geenide produktidest. A – *ADAM12*, F – *FNI*, number tähistab proovi, M – 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne) pikkusmarker, bp – aluspaari. *ADAM12* oodatud fragmendid olid pikkustega 248 bp ja 397 bp, *FNI* fragmendid 122 bp, 153 bp, 177 bp, 215 bp ja 225 bp.

2.3.2.1. *ADAM12* tulemused

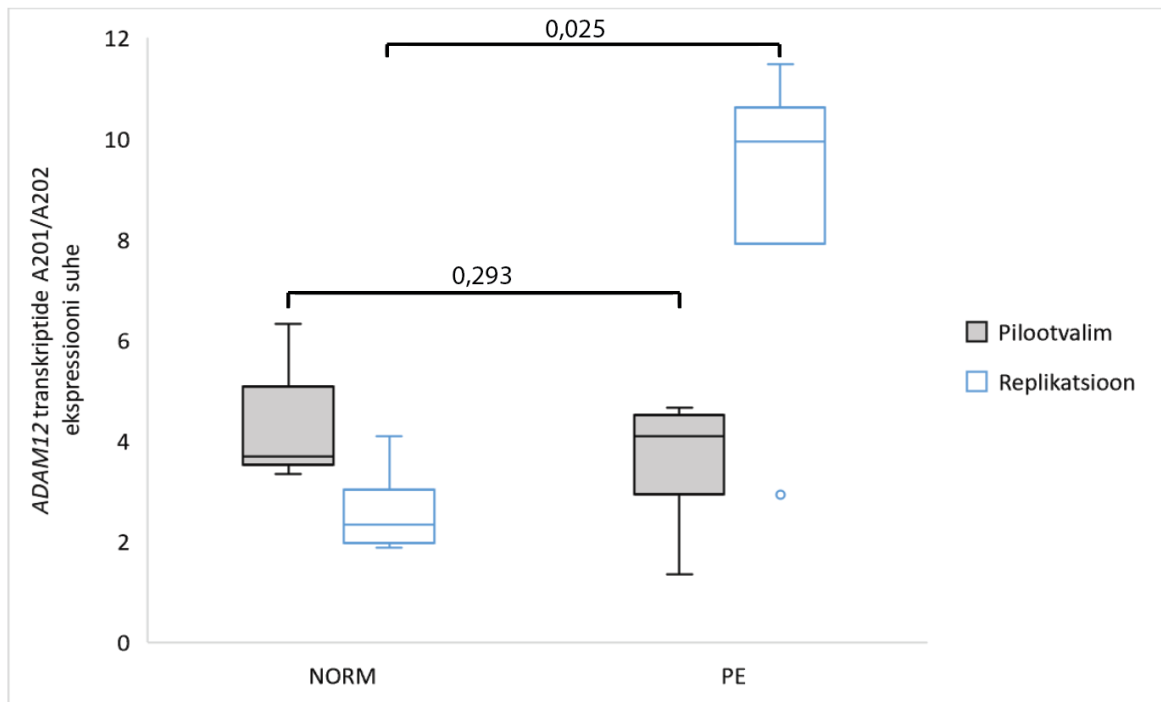
Analüüs näitas, et suures ülekaalus esineb lühemat transkripti, *ADAM12-201*, ja pikemat transkripti, *ADAM12-202*, esineb palju vähem. See on vastavuses LeafCutter analüüsiga ja ka transkriptide kogusega RNA sekveneerimises FPKM määratuga. Näiteks esines proov 729 puhul *ADAM12-202* transkript umbes 4 korda vähem kui *ADAM12-201* transkripti. Fragmentanalüüs tuvastas oodatavatele fragmentidele lisaks veel kaks fragmenti. Üks nendest fragmentidest on A201 transkripti fragmendist vaid 6 bp-d pikem, aga ENSEMBL andmebaasis pole informatsiooni ühegi transkripti kohta, mis võiks sellist fragmenti sisaldada. See-eest uurides NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) andmebaasi, võime oletada, et tegemist on

fragmendiga, mis vastab *ADAM12* transkriptile 4 (RefSeq ID: NM_001288974.1). Analüüs tuvastas ka ühe lühikese (~100 bp) fragmendi, mille päritolu me ei suutnud ühegi andmebaasiga määrata (Joonis 7). Primer BLAST-i informatsiooni järgi ei oleks tohtinud ühtegi sellise pikkusega fragmenti üles tulla.



Joonis 7. *ADAM12* geeni fragmentanalüüs, mis on Peak Scanner-i abil visualiseeritud, proov 729. X-teljel on aeg sekundites, millega kapillaaris proovid jooksid ja y-teljel on märgitud fluorestsentsi tugevus. Piikide peale on märgitud transkriptide nimed, kust nad pärinevad. R – NCBI andmebaasi RefSeq ID NM_001288974.1 (ENSEMBL andmebaasis puuduv transkript), oranž – pikkusmarker, sinine – uuritav fragment, A – piigi pindala, H – piigi kõrgus, S – produkti suurus (aluspaari), D – piigi paiknemine x-teljel.

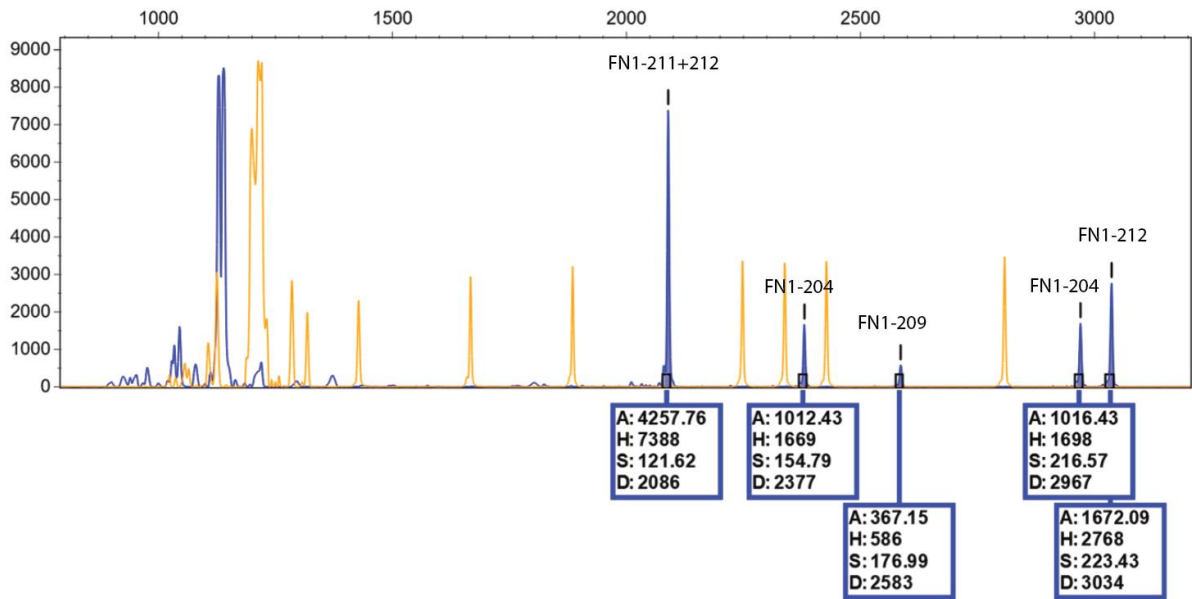
LeafCutter-ist saadud informatsiooni järgi on *ADAM12* geeni puhul lühemat transkripti (A201) NORM grupis keskmiselt 61%, ja pikemat transkripti (A202) 26%. PE grupis aga vastavalt 47% ning 42% (Lisa 2). Fragmentanalüüsi tulemuse järgi on NORM grupis sarnaselt eelnevale analüüsile kärbitud varianti keskmiselt 56% ning pikka transkripti 23%. Samas PE grupis oli aga neid transkripte vastavalt 68% ja 10% (Tabel 5). Sellest tulenevalt näeme kahe meetodi suurt erinevust just PE transkriptide korral. Kui LeafCutter analüüsi põhjal oli PE grupis kahte transkripti peaaegu võrdselt, siis fragmentanalüüsi põhjal on PE grupis lühemat transkripti keskmiselt 8,5 korda rohkem (mediaan suhe 9,9, t-testi P-väärtus=0,025, joonis 8). Seega *ADAM12* geeni puhul esialgse analüüsi tulemus transkriptide kasutuses ei replitseerunud fragmentanalüüsiga.



Joonis 8. RNA-seq ja fragmentanalüüsi tulemuste gruppidevaheline võrdlus, *ADAM12* geen. Võrreldud on *ADAM12-201* ja *ADAM12-202* (Joonis 5) transkriptide esinemise sagedust. X-teljel on grupid näidatud ja y-teljel on *ADAM12* transkriptide A201/A202 omavaheline suhe. Karpe ühendavate horisontaalsete joonte pealsed arvud näitavad t-testi P-väärtust. Karp-vurrud-diagrammi alumine joon näitab miinimumväärtust ja ülemine joon maksimumväärtust, karp näitab andmete 25-75 protsentiili ja mediaan on märgitud kriipsuga, sinine täpp on võõrväärtus.

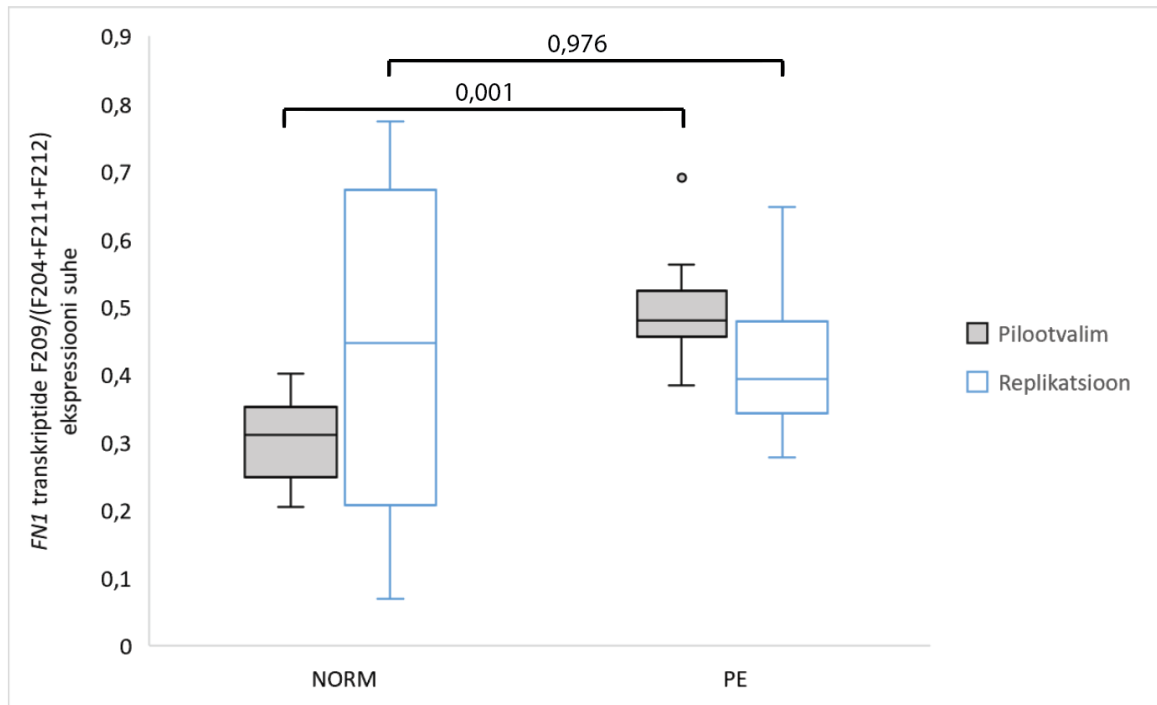
2.3.2.2. *FNI* tulemused

FNI geeni puhul olid fragmentanalüüsi tulemused kohati erinevad, aga kõik oodatud produktid, mis vastasid Primer BLAST-ile tulid üles. Esimeses piigis on fragmendid pikkusega 122 bp-d, see fragment esineb nii F211 kui ka F212 transkriptides, mistõttu see piik on kõige suurem. Üles tulid ka kahe erineva pikkustega fragmendid (154 bp ja 216 bp), mis kuulusid F204 transkriptile (Joonis 9).



Joonis 9. *FNI* geeni fragmentanalüüs, mis on Peak Scanner-i abil visualiseeritud, proov 108. X-teljel on aeg sekundites, millega kapillaaris proovid jooksid ja y-teljel on märgitud fluorestsentsi tugevus. Piikide peale on transkriptide nimed märgitud, oranž – pikkusmarker, sinine – uuritav fragment, A – piigi pindala, H – piigi kõrgus, S – produkti suurus (aluspaari), D – piigi paiknemine x-teljel.

FNI geeni puhul tuvastas LeafCutter, et NORM grupis on kassetteksoni (vastab F209 transkriptile) esinemissagedus 37% ja F204, F211 ja F212 transkriptide splaiss-sündmuse esinemise sagedus 63%. PE grupis oli F209 transkripti esinemine 47% ja teiste transkriptide esinemine 53% (Lisa 3, Tabel 5). Seega esineb F209 transkripti 25. kassettekson PE grupis 10% tihedamini kui NORM grupis. Fragmentanalüüs aga tuvastas, et PE grupis oli kassettekson kasutuses 26% juhtudest ja NORM grupis 27%. Mõlemas grupis (PE ja NORM) on seega F209 transkripti 25-da eksoni esinemine väga sarnane ja statistilist erinevust ei esine (P -väärtus=0,976). Seetõttu on tulemuseks, et *FNI* geeni puhul ei ole F209 transkripti splaissimise mustri esinemissagedus grupiti erinev (Joonis 10).



Joonis 10. RNA-seq ja fragmentanalüüsi tulemuste gruppidevaheline võrdlus, *FNI* geen. Võrreldud on *FNI-209*, *FNI-204*, *FNI-211* ja *FNI-212* transkriptide suhtelist kogust. X-teljel on grupid näidatud ja y-teljel on *FNI* transkriptide $F209/(F204+F211+F212)$ (Joonis 5) omavaheline suhe. Karpe ühendavate horisontaalsete joonte pealsed arvud näitavad t-testi P-väärtust. Karp-vurrud-diagrammi alumine joon näitab miinimumväärtust ja ülemine joon maksimumväärtust, karp näitab andmete 25-75 protsentiili ja mediaan on märgitud kriipsuga, hall täpp on võõrväärtus.

Tabel 5. *ADAM12* ja *FNI* transkriptide kasutuse tulemused platsentas LeafCutter analüüsis võrreldes fragmentanalüüsiga.

Geen	Transkript	LeafCutter		Fragmentanalüüs	
		NORM	PE	NORM	PE
<i>ADAM12</i>	A201	61%	47%	56%	68%
	A202	26%	42%	23%	10%
<i>FNI</i>	F209	37%	47%	26%	27%
	F204/F211/F212	63%	53%	74%	73%

A – *ADAM12*, F – *FNI*

2.3.2.3. AZINI tulemused

AZINI geeni puhul ei suudetud tuvastada PCR-ga kõiki oodatuid produkte. Antud geeni puhul oli ennustatud kasutatud praimeritega 5 produkti (Tabel 4), aga geelipildil esines kaks fragmenti - umbes 200 ja 400 pikkusmarkeri juures. Seoses oodatud produktide mitte-esinemisega ka peale optimeerimist, langetati otsus AZINI geeni PCR-i produkte fragmentanalüüsi mitte saata.

2.4. Arutelu

2.4.1. Fragmentanalüüs alternatiivse splaissingu tuvastamiseks

Fragmentanalüüsi jaoks on vaja eelnevalt PCR läbi viia, aga see võib raskeks osutuda, kui ühe geeni jaoks on vaja disainida palju erinevaid primereid. Erinevate praimerite disainimisel tuleb mitmete asjaoludega arvestada. Näiteks, et kõigil praimeritel oleks sobilik sulamistemperatuur ja et nad seonduksid ainult õigetesse kohtadesse (Lorenz, 2012). PCR-i eelistused võivad ka tulemust mõjutada, näiteks võib mõne praimeripaari seondumine rohkem soodustatud olla kui teise praimeripaari, mistõttu võib mõnda produkti teistest rohkem esineda (Sint *et al.*, 2012). Samuti on PCR-i miinuseks, et protsessi käigus replitseeruvad lühikesed produktid paremini kui pikad, mistõttu ei pruugi saadud produktide suhe õige olla.

Kui aga PCR-i protsess on optimeeritud, siis on fragmentanalüüs mugav, lihtne ja odav meetod. Sooritatakse multiplex PCR ja PCR-i produktidest määratakse kapillaarelektroforeesimasinas fragmentide pikkused ja suhtelised kogused. Samuti suutis fragmentanalüüs tuvastada fragmente isegi siis, kui PCR-i produkte oli geelipildi peal vaevu näha, nagu näiteks joonis 6 proov A108 puhul. Analüüsist saadud informatsioon konverteeritakse ümber digitaalseteks andmeteks, mida Peak Scanner-i abil visualiseeritakse. Sellega saab sarnaste pikkustega fragmente üksteisest kergesti eristada, filtreerida välja müra ja andmeid lihtsalt edasisteks analüüsideks eksportida tabelformaat.

ADAMI2 ja FNI geenidel suutsime tuvastada oodatud fragmendid, aga AZINI puhul ei esinenud soovitud produktid. See võis olla tingitud mitmest eri faktorist, aga tõenäoliselt ebaõnnestus praimerite disainimine. Vähemtõenäolisteks ebaõnnestumise põhjusteks võisid

olla ka valimisse valitud platsenta proovid (osadel indiviididel võisid mõned transkriptid mitte ekspresseeritud olla) ja samuti võisid tulemust mõjutada RNA-seq andmete joondusvead.

2.4.2. Gruppidevaheliste erinevuste tuvastamine fragmentanalüüsil

Kui fragmentanalüüsi kasutada gruppide vaheliste erinevuste tuvastamiseks, võivad nähtavad tulemused olla mõjutatud eelnevalt mainitud PCR-i läbiviimise probleemidest. Näiteks pidi *AZINI* geeni puhul disainima palju erinevaid praimeripaare (n=5), millest osad ei töötanud. Seetõttu ei saanud me geeni produkte üldse fragmentanalüüsi saata.

Kui fragmentanalüüsis esineb mõnda fragmenti suurtes kogustes, siis teatud väärtusest alates ei ole Peak Scanner-is nähtava piigi pindala enam lineaarses sõltuvuses proovi tegeliku kogusega. See tuleneb fluorestsentsist, sest teatud kogusest alates ei suuda masina sensor enam tulevat valguskogust adekvaatselt eristada, mistõttu analüüsi täpsus väheneb ja fragmentide vahelise koguse suhe ei tule enam õige. Sellist probleemi saab vältida proovide lahjendamisega, aga see ei ole alati võimalik. Nimelt kui lahjendada proove liiga palju, siis võivad väga madala ekspressiooniga fragmendid ära kaduda. Seda kõike tuleks eksperimendi disainimisel arvesse võtta. Samuti lahjendatakse ka proove enne kapillaaris jooksutamist erineval määral, mis võib lõpliku tulemust mõjutada. Lisaks sellele ei ole pool-kvantitatiivse meetodiga võimalik leida ühe indiviidi transkripti absoluutset ekspressioonitaset. Fragmentanalüüsi tulemusi saab seega ainult suhtena uurida, sest mõnes proovis võib rohkem materjali olla kui teistes, mistõttu oleks selle proovi piigid suuremad teistega võrreldes.

2.4.3. Andmebaasi vastavus tegelikkusele

Andmebaasid erinevad üksteisest, näiteks ENSEMBL andmebaasis võib rohkem informatsiooni geenide kohta olla kui NCBI andmebaasis ja ka vastupidi. Erinevus võib sellest tuleneda, et mõni andmebaas ei anna geeni kõiki alternatiivseid transkripte või kui näiteks mõni transkript esineb väga harva, jäetakse see informatsioon vahel lisamata. Seega tuleks informatsiooni kogumisel kasutada mitmeid erinevaid andmebaase.

Praimerite disainimisel on väga oluline, et kasutatav informatsioon oleks mitmest andmebaasist pärit, sest see vähendab võimalust, et tulemused ei ühti tegelikkusega. Näiteks esines *ADAM12* geeni fragmentanalüüsis fragmente pikkusega 250 bp, aga meie poolt otsitav fragment on 244 bp pikk. ENSEMBL andmebaasis ei olnud 250 bp pikkuse fragmendi kohta informatsiooni, aga NCBI andmebaasi põhjal saame oletusi teha, millisele transkriptile fragment kuulub.

KOKKUVÕTE

Antud töös anti kirjanduse põhjal ülevaade alternatiivsest splaissingust. Protsess kujutab endast viisi, kuidas ühe geeni pealt mitu erinevat transkripti ekspresseerida, mis võimaldab väikese genoomi pealt palju valgu isovorme kodeerida. Alternatiivsel splaissingul on seega geneetiline funktsioon, kuid ka bioloogiline ja evolutsiooniline funktsioon. Mehhanism on tugevalt reguleeritud, sest väiksemgi viga või muutus võib tagajärgi tuua, milleks on üldiselt haigused.

Samuti käsitleti töös alternatiivset splaissingut platsentas, mida on praeguse ni on vähe uuritud. On palju erinevaid näiteid, kuidas vigane splaissimine platsentas põhjustab erinevaid patoloogiaid nagu näiteks preeklampsiat ja gestatsioonidiabeeti. Selles töös on rohkem tähelepanu pööratud alternatiivsele splaissingule seoses preeklampsiaga.

Katsete esimeseks eesmärgiks oli tuvastada platsentas fragmentanalüüsiga alternatiivsete transkriptide kasutuse hulka *ADAM12*, *AZIN1* ja *FNI* geenides, mille puhul oli varasemalt täheldatud, et preeklampsia esinemise puhul alternatiivsete transkriptide kasutus erines tuisistusest rasedustest. Teiseks eesmärgiks oli replitseerida varasemalt meie laboris tuvastatud alternatiivse splaissingu mustri erinevusi preeklampsiatiliste ja normaalsete platsentade vahel.

ADAM12 geeni puhul saadi tulemuseks, et preeklampsia puhul on geeni transkripti A201 ekspressioon kõrgem võrreldes kontrollgrupiga, mis on oodatust vastupidine tulemus. *FNI* geeni puhul ei olnud erinevust gruppide vahel võimalik täheldada ja *AZIN1*-l ei tulnud kõiki produkte üles, mistõttu ei saadud selle geeni puhul fragmentanalüüsi läbi viia. See tähendab, et kõikide geenide tulemused erinesid oodatust.

Kokkuvõttes järeldasime, et meie poolt välja valitud meetodid ei ole piisavalt tundlikud, et saada vastuseid meie poolt püstitud küsimustele. Fragmentanalüüs on küll lihtne, mugav ja odav uurimisviis, aga antud analüüs on pigem sobilik fragmentide pikkuste, mitte koguste määramiseks.

Alternative splicing in normal and preeclamptic pregnancies

Käbi-Riin Ojassoo

SUMMARY

This bachelor's thesis gives an overview of the mechanism called alternative splicing. This process enables the expressing of a multitude of different transcripts from a single gene. Which, in turn, enables us to code a large variety of protein isoforms from a small genome. As such, we can surmise that the alternative splicing has a genetic function, but this mechanism has a biological and evolutionary aspect as well, which will not be further dissected in this summary. In addition, this process is strongly regulated by biological functions, as even the smallest change or mistake in alternative splicing may have consequences, usually in the form of physical and/or mental ailments.

The author of this thesis also touches upon the topic of alternative splicing in the placenta, which, at the current point in time, is not a particularly thoroughly researched field. There is a lot of evidence that defective splicing events in the placenta often cause different pathologies, for example preeclampsia and gestational diabetes. In this study we focused mainly on the connection between alternative splicing and preeclampsia.

Earlier studies have shown that the levels of alternative transcripts differ in the case of preeclampsia from pregnancies without complications. As such, the first aim of the experiment was to detect the amount of alternative splicing transcripts in the placenta in *ADAM12*, *AZIN1* and *FNI* genes through fragment analysis. The second aim was to replicate the differences in the alternative splicing patterns between preeclamptic and normal placentas, detected in earlier studies conducted in our laboratory.

The results for *ADAM12* were that in the cases of preeclampsia the expression of the A201 transcript is higher than in the control group, which is opposite from what was expected. In the case of the *FNI* gene, we could not detect any differences in the chosen groups. As for the *AZIN1* gene, we could not *get all* expected PCR products. Due to this, it was not possible to conduct the fragment analysis for *AZIN1*. In conclusion, the results for each of the genes differed from the initial predictions.

In short, we infer that the chosen methods employed are not as sensitive as necessary for such experiments. Fragment analysis is an easy, convenient, and cheap research method, but it is more suitable for the determination of fragment lengths than the quantity.

KASUTATUD ALLIKAD

- Bélanger, C., Bérubé-simard, F., Leduc, E., and Bernas, G. (2018). Dysregulation of cotranscriptional alternative splicing underlies CHARGE syndrome. doi:10.1073/pnas.1715378115.
- Bérubé-Simard, F. A., and Pilon, N. (2019). Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes. *Transcription* 10, 21–28. doi:10.1080/21541264.2018.1521213.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Burton, G. J., and Fowden, A. L. (2015). The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370. doi:10.1098/rstb.2014.0066.
- Burton, G. J., and Jauniaux, E. (2015). What is the placenta? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, S6.e1-S6.e4. doi:10.1016/j.ajog.2015.07.050.
- Bush, S. J., Chen, L., Tovar-Corona, J. M., and Urrutia, A. O. (2017). Alternative splicing and the evolution of phenotypic novelty. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 1–7. doi:10.1098/rstb.2015.0474.
- Cai, X., Liu, C., Zhang, T. N., Zhu, Y. W., Dong, X., and Xue, P. (2018). Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion. *J. Cell. Biochem.* 119, 4717–4728. doi:10.1002/jcb.26651.
- Chabot, B., and Shkreta, L. (2016). Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J. Cell Biol.* 212, 13–27. doi:10.1083/jcb.201510032.
- Chen, M., and Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: Insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 741–754. doi:10.1038/nrm2777.
- Dahl, M., Djuricic, S., and Hviid, T. V. F. (2014). The Many Faces of Human Leukocyte Antigen-G: Relevance to the Fate of Pregnancy. *J. Immunol. Res.* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/591489.
- Davidson, L., Kerr, A., and West, S. (2012). Co-transcriptional degradation of aberrant pre-mRNA by Xrn2. *EMBO J.* 31, 2566–2578. doi:10.1038/emboj.2012.101.
- De Calais, F. L., Smith, L. D., Raponi, M., Maciel-Guerra, A. T., Guerra-Junior, G., De Mello, M. P., *et al.* (2017). A study of splicing mutations in disorders of sex development. *Sci.*

- Rep.* 7, 3–10. doi:10.1038/s41598-017-16296-3.
- Deluca, D. S., Levin, J. Z., Sivachenko, A., Fennell, T., Nazaire, M. D., Williams, C., *et al.* (2012). RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinformatics* 28, 1530–1532. doi:10.1093/bioinformatics/bts196.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., *et al.* (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
- Eastabrook, G., Aksoy, T., Bedell, S., Penava, D., and de Vrijer, B. (2018). Preeclampsia biomarkers: An assessment of maternal cardiometabolic health. *Pregnancy Hypertens.* 13, 204–213. doi:10.1016/j.preghy.2018.06.005.
- Elliott, D. J., and Grellscheid, S. N. (2006). Alternative RNA splicing regulation in the testis. *Reproduction* 132, 811–819. doi:10.1530/rep-06-0147.
- Fu, X.-D., and Ares, M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* 15, 689–701. doi:10.1038/nrg3778.
- Gallego-Paez, L. M., Bordone, M. C., Leote, A. C., Saraiva-Agostinho, N., Ascensão-Ferreira, M., and Barbosa-Morais, N. L. (2017). Alternative splicing: the pledge, the turn, and the prestige: The key role of alternative splicing in human biological systems. *Hum. Genet.* 136, 1015–1042. doi:10.1007/s00439-017-1790-y.
- Gretarsdottir, S., Helgason, H., Helgadottir, A., and Sigurdsson, A. (2015). RESEARCH ARTICLE A Splice Region Variant in LDLR Lowers Non- high Density Lipoprotein Cholesterol and Protects against Coronary Artery Disease. 14, 1–20. doi:10.1371/journal.pgen.1005379.
- Hahn, M. W., and Wray, G. A. (2002). The g-value paradox. 75, 73–75.
- Häsler, J., and Strub, K. (2006). Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 34, 5491–5497. doi:10.1093/nar/gkl706.
- Heinzen, E. L., Yoon, W., Weale, M. E., Sen, A., Wood, N. W., Burke, J. R., *et al.* (2007). Alternative ion channel splicing in mesial temporal lobe epilepsy and Alzheimer’s disease. *Genome Biol.* 8. doi:10.1186/gb-2007-8-3-r32.
- Irimia, M., Weatheritt, R. J., Ellis, J. D., Parikshak, N. N., Gonatopoulos-Pournatzis, T., Babor, M., *et al.* (2014). A highly conserved program of neuronal microexons is misregulated in autistic brains. *Cell* 159, 1511–1523. doi:10.1016/j.cell.2014.11.035.
- Juhanson, P., Rull, K., Kikas, T., Laivuori, H., Vaas, P., Kajantie, E., *et al.* (2016). Stanniocalcin-1 Hormone in Nonpreeclamptic and Preeclamptic Pregnancy: Clinical, Life-Style, and Genetic Modulators. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4799–4807.

doi:10.1210/jc.2016-1873.

- La Cognata, V., D'Agata, V., Cavalcanti, F., and Cavallaro, S. (2015). Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease? *Neurogenetics* 16, 245–263. doi:10.1007/s10048-015-0449-x.
- Li, Y. I., Knowles, D. A., Humphrey, J., Barbeira, A. N., Dickinson, S. P., Im, H. K., *et al.* (2018). Annotation-free quantification of RNA splicing using LeafCutter. *Nat. Genet.* 50, 151–158. doi:10.1038/s41588-017-0004-9.
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2013). The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 41. doi:10.1093/nar/gkt214.
- Lin, L., Jiang, P., Park, J. W., Wang, J., Lu, Z. xiang, Lam, M. P. Y., *et al.* (2016). The contribution of Alu exons to the human proteome. *Genome Biol.* 17. doi:10.1186/s13059-016-0876-5.
- Lipscombe, D. (2005). Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 358–363. doi:10.1016/j.conb.2005.04.002.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.*, 1–15. doi:10.3791/3998.
- MacLeod, J. N., Lee, A. K., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E. (1992). Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* 267, 14219–14226.
- Majewska, M., Lipka, A., Paukszto, L., Jastrzebski, J. P., Myszczyński, K., Gowkielewicz, M., *et al.* (2017). Transcriptome profile of the human placenta. *Funct. Integr. Genomics* 17, 551–563. doi:10.1007/s10142-017-0555-y.
- Männik, J., Vaas, P., Rull, K., Teesalu, P., and Laan, M. (2012). Differential placental expression profile of human Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin genes in pregnancies with pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 180–7. doi:10.1016/j.mce.2012.02.009.
- Männik, J., Vaas, P., Rull, K., Teesalu, P., Rebane, T., and Laan, M. (2010). Differential expression profile of Growth Hormone/Chorionic Somatomammotropin genes in placenta of small- and large-for-gestational-age newborns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2433–2442. doi:10.1210/jc.2010-0023.
- McKenna, Aaron, Matthew Hanna, Eric Banks, Andrey Sivachenko, Kristian Cibulskis, Andrew Kernytsky, Kiran Garimella, David Altshuler, Stacey Gabriel, M. D., DePristo, and M. A., McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., *et al.* (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA

- sequencing data. *Genome Res.* 20, 254–260. doi:10.1101/gr.107524.110.20.
- Mol, B. W. J., Roberts, C. T., Thangaratinam, S., Magee, L. A., De Groot, C. J. M., and Hofmeyr, G. J. (2016). Pre-eclampsia. *Lancet* 387, 999–1011. doi:10.1016/S0140-6736(15)00070-7.
- Palmer, K. R., Tong, S., and Kaitu'u-Lino, T. J. (2017). Placental-specific sFLT-1: Role in pre-eclamptic pathophysiology and its translational possibilities for clinical prediction and diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 69–78. doi:10.4317/jced.2.e30.
- Park, E., Pan, Z., Zhang, Z., Lin, L., and Xing, Y. (2018). The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 102, 11–26. doi:10.1016/j.ajhg.2017.11.002.
- Ramos-Molina, B., Lambertos, A., and Peñafiel, R. (2018). Antizyme Inhibitors in Polyamine Metabolism and Beyond: Physiopathological Implications. *Med. Sci.* 6, 89. doi:10.3390/medsci6040089.
- Romo, L., Mohn, E. S., and Aronin, N. (2018). A fresh look at huntingtin mRNA processing in huntington's disease. *J. Huntingtons. Dis.* 7, 101–108. doi:10.3233/JHD-180292.
- Schad, E., Tompa, P., and Hegyi, H. (2011). The relationship between proteome size, structural disorder and organism complexity. *Genome Biol.* 12, R120. doi:10.1186/gb-2011-12-12-r120.
- Scotti, M. M., and Swanson, M. S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nat. Rev. Genet.* 17, 19–32. doi:10.1038/nrg.2015.3.
- Sibley, C. R., Blazquez, L., and Ule, J. (2016). Lessons from non-canonical splicing. *Nat. Rev. Genet.* 17, 407–421. doi:10.1038/nrg.2016.46.
- Sildver, K., Veerus, P., and Lang, K. (2015). Sünnikaalukõverad Eestis ja sünnikaalu mõjutavad tegurid: registripõhine uuring - Eesti Arst - Eesti Arstide Liidu ajakiri. *Eesti Arst* 94, 465–470.
- Sint, D., Raso, L., and Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol. Evol.* 3, 898–905. doi:10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x.
- Söber, S., Kaartokallio, T., Reiman, M., Kankainen, M., Rull, K., Rull, K., Laivuori, H., Laan, M. (2018). Core signature of differentially expressed placental genes in preeclampsia inferred from the RNA-Seq datasets across diverse clinical cases. Submitted for publication.
- Söber, S., Reiman, M., Kikas, T., Rull, K., Inno, R., Vaas, P., *et al.* (2015). Extensive shift in placental transcriptome profile in preeclampsia and placental origin of adverse pregnancy

- outcomes. *Sci. Rep.* 5, 13336. doi:10.1038/srep13336.
- Spencer, T. E. (2014). Biological roles of uterine glands in pregnancy. *Semin. Reprod. Med.* 32, 346–357. doi:10.1055/s-0034-1376354.
- Su, C.-H., D, D., and Tarn, W.-Y. (2018). Alternative Splicing in Neurogenesis and Brain Development. *Front. Mol. Biosci.* 5, 1–9. doi:10.3389/fmolb.2018.00012.
- Wang, Z., and Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna* 14, 802–813. doi:10.1261/rna.876308.802.
- Will, C., and Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a003707. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. doi:10.1101/cshperspect.a003707.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://bioinformatics.cvr.ac.uk/blog/tag/cigar-string/> - vaadatud ja kasutatud 23.04.2019

<http://broadinstitute.github.io/picard/> - vaadatud ja kasutatud 23.04.2019

<http://davidaknowles.github.io/leafcutter/articles/Usage.html> - vaadatud ja kasutatud 23.04.2019

<http://disgenet.org/> - vaadatud ja kasutatud 20.04.2019

<http://primer3.ut.ee/>

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> - vaadatud ja kasutatud 23.04.2019

<https://www.ensembl.org/> - vaadatud ja kasutatud 09.03.2019

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> - vaadatud ja kasutatud 09.03.2019

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<https://www.proteinatlas.org/> - vaadatud ja kasutatud 20.04.2019

<https://www.thermofisher.com/ee/en/home.html> - vaadatud ja kasutatud 10.05.2019

<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis/uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers.html> - vaadatud ja kasutatud 15.05.2019

<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/fragment-analysis-fundamentals.html> - vaadatud ja kasutatud 15.05.2019

LISAD

Lisa 1. Alternatiivse splaissingu ülegenoomne analüüs

Alternatiivse splaissingu analüüsi RNA sekveneerimisandmetel viis läbi Mario Reiman. REPROMETA proovide RNA-Seq toorandmete esmane bioinformaatiline töötlus tehti Helsingi Ülikoolis *FIMM Sequencing Core Laboratory*'s. Kasutati Illumina NGS data jaoks välja töötatud eeltötlusvahendit Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) ja tulemuseks saadi otstest seondunud kvaliteetsed lugemid, mis tuleb joondada inimese referents genoomiga GRCh38. Referentsgenoom saadi ENSEMBL andmebaasist ja lugemid joondati STAR (Dobin *et al.*, 2013) tarkvara abil. Duplitseeritud lugemite sorteerimiseks ja märkimiseks kasutati Picard tools (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) tarkvara ja SubRead (Liao *et al.*, 2013) joondajat kasutades saadi lugemid omistada kindlatele geneetilistele omadustele. Lisaks kasutati programmi GATK (Genome Analysis Toolkit) (McKenna *et al.*, 2010), et panna erinevatele transkripti variantidele nimi. RNA-SeQC (Deluca *et al.*, 2012) ja FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) programme kasutati kvaliteedikontrolli jaoks (Sõber *et al.*, 2018) ning saadud andmed töödeldi edasi kasutades LeafCutter programmi.

Kasutades varasemalt teadaolevaid transkriptide FPKM väärtusi jäeti edasisest uuringust välja transkriptid, millel oli platsenta koes liiga madal ekspressioon (<5 FPKM). Mario Reimani poolt läbiviidud LeafCutter analüüs pilootvalimis tuvastas *ADAM12* geeni puhul kahte splaissimise sündmust: üks sündmus vastab pika transkripti (*ADAM12-202*) splaissimise muustrile ja teine vastab lühikese transkripti (*ADAM12-201*) splaissimise muustrile (Lisa 2). Analüüs tuvastas ka madala sagedusega krüptilisi splaissimise sündmusi, mis ei vasta andmebaasis olemasolevatele transkriptidele. *FNI* geeni puhul tuvastas LeafCutter kolme splaissimise sündmust: F209 transkripti 25. eksoni esinemist ja vahele jätmist (Lisa 3). *FNI-209* transkripti puhul loeb programm kahte splaissimise sündmust, sest esimeseks sündmuseks on 24. ja 25. eksoni vahelise introni eemaldamine ja teiseks on 25. ja 26. eksoni vahelise introni eemaldamine. Teiste transkriptide (F204, F211 ja F212) puhul loeb programm ühte splaissimise sündmust, sest nende transkriptide puhul jäetakse F209 transkripti 25. ekson vahele.

LIHTLITSENTS

Mina, Käbi-Riin Ojassoo,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Platsenta alternatiivne splaissing normaalses ja preeklamptilises raseduses“, mille juhendajad on Triin Kikas, Mario Reiman ja Mihkel Vaher, 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 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Käbi-Riin Ojassoo

27.05.2019