

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Rain Inno

Platsenta geenide ekspressiooni moduleerivad mikroRNAd

Magistritöö

Juhendaja: Siim Sõber, PhD

Prof. Maris Laan, PhD

TARTU 2015

SISUKORD

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1. Raseduskomplikatsioonid	6
1.2. Preeklampsia	6
1.3. Platsenta ja selle roll preeklampsia kujunemisel	7
1.4. Platsenta geeniekspressioon tuisistusteta ja preeklamptilise raseduse korral	8
1.5. mikroRNAd	11
1.5.1. mikroRNA	11
1.5.2. MikroRNA biogenees	15
1.6. MikroRNAd platsentas	17
1.7. Platsenta mikroRNAd ekspressiooniprofiil preeklampsia korral	18
1.8. Trofoblasti rakuliini geeniekspressiooni reguleerimine mikroRNA <i>mimic</i> 'itega	20
2. Praktilise töö eesmärgid ja ülesehitus	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Tööskeem	21
3. Materjal ja metoodika	23
3.1. Algandmed	23
3.1.1. Valimi kirjeldus	23
3.1.2. MikroRNAd sekveneerimine ja diferentsiaalse ekspressiooni analüüs	25
3.1.3. Analüüsitulemustest sobivate mikroRNAd valimine	25
3.2. MikroRNAd sihtmärk-geenide tuvastamine ja katseks valimine	26
3.3. Rakuliini katsedisain	28

3.4.	cDNA süntees ja RT-qPCR	31
3.5.	Andmeanalüüs	34
4.	Tulemused	35
4.1.	Olulisemad preeklampsiaga seotud mikroRNAd	35
4.2.	Andmebaaside tulemused	37
4.3.	Asukoht genoomis	40
4.4.	Väljavalitud 6 mikroRNA sihtmärk-geenid ja ekspressioon	41
4.5.	MikroRNade <i>mimic</i> 'ite mõju ennustatud sihtmärk-geenide ekspressioonile JEG-3 rakuliinis	51
4.5.1.	<i>Mir-144</i> efekt JEG-3 rakuliinis	52
4.5.2.	<i>Mir-210</i> efekt JEG-3 rakuliinis	53
4.5.3.	<i>Mir-96</i> efekt JEG-3 rakuliinis	54
4.6.	MikroRNade mõju JEG-3 rakuliinis ekspresseeruvatele geenidele	55
5.	Arutelu.....	59
5.1.	Ennustatud mikroRNade sihtmärk-geenid ning nende tuvastamine katsega.....	59
5.2.	Geeniekspressiooni profiil JEG-3 rakuliinis ja platsentas.	60
5.3.	Uuringu tugevused ja puudused.....	60
5.4.	Edasised plaanid	61
	Kokkuvõte	62
	Summary.....	63
	Kirjanduse loetelu.....	64
	Kasutatud veebiaadressid	73
	LIHTLITSENTS.....	74

KASUTATUD LÜHENDID

KMI - kehamassiindeks

C14MC - kromosoom 14 mikroRNA klaster

C19MC - kromosoom 19 mikroRNA klaster

FBS - veise looteseerum (*fetal bovine serum*)

FRD - valepositiivsete määr (*false discovery rate*)

FGF - fibroblasti kasvufaktorid (*fibroblast growth factors*)

FPKM - fragmente kb kohta miljoni joondatud fragmendi kohta (*Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped*)

IUGR - emakasisene kasvupeetus (*intrauterine growth restriction*)

miRseq - mikroRNA järjestuse määramine (*microRNA sequencing*)

PE - preeklampsia

RNAseq - RNA järjestuse määramine (*RNA sequencing*)

ROS - aktiivset hapnikku sisaldavad ühendid (*reactive oxygen species*)

RT-qPCR - pöördtranskriptsiooni kvantitatiivne polümeraasi ahelreaksioon (*reverse transcription quantitative polymer chain reaction*)

Siport - Siport NeoFX transfektsiooni reagent

UTR - mittetransleeritav piirkond (*untranslated region*)

SISSEJUHATUS

Iga lapseootel naise soovib tuisistusteta rasedust ning terve lapse sündi. Sellest hoolimata esineb raseduse käigus erinevaid komplikatsioone, mis vähemal või suuremal määral kahjustavad ema ja/või loote tervist. Üheks sagedasemaks rasedusaegseks tuisistuseks on preeklampsia, mõjutades 2-5% rasedatest. Preeklampsia korral tekib rasedal hüpertensioon, proteiinuuria ning maksa normaalne metabolism on häiritud. Preeklampsia täpsed tekkepõhjused ei ole veel teada, kuid üheks oluliseks faktoriks on platsenta arengus asetleidvad kõrvalekalded. Praegu on preeklampsia ainukeseks ravimeetodiks sünnituse esilekutsumine, pärast platsenta irdumist preeklampsia sümptomid kaovad. Üheks platsenta genoomi avaldumist mõjutavateks faktoriteks on mikroRNAd, mis reguleerivad geenide ekspressioonitaset.

Käesolev magistritöö käsitleb preeklampsia korral platsentas diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAsid ning nende regulaatorset funktsiooni platsentas ekspresseeruvate geenide üle. Töö alaeesmärkideks on (i) teostada andmebaaside ja kirjandusallikate alusel analüüs, et ennustada sihtmärk-geene, mille ekspressiooni platsentas diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAd võiksid potentsiaalselt reguleerida; (ii) sooritada piloot-katsed trofoblasti JEG-3 rakuliinis, testimaks väljavalitud mikroRNA-de efekti potentsiaalsetele sihtmärk-geenidele ning hinnata immortaliseeritud rakuliini sobivust platsenta mikroRNAd *in vitro* uuringuteks *in vivo* efekti mudelina.

Märksõnad: mikroRNA, preeklampsia, JEG-3

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Raseduskomplikatsioonid

Osadel naistel esineb raseduse ajal komplikatsioone, mis võivad mõjutada ema ja/või lapse tervist. Isegi naistel, kes enne rasedust on täie tervise juures, esineb raseduskomplikatsioone. Mõningateks enam-levinud komplikatsioonideks on hüpertensioon, gestatsioonidiabeet, üsasisene kasvupeetus ning preeklampsia (Gouton *et al.*, 2015).

Raseduseaegne hüpertensioon esineb loote ja ema vaheliste arterite ebapiisava suuruse tõttu. Raseduse ajal raskendab see vere jõudmist platsentani, vähendades lootenii jõudvat toitainete ja hapniku hulka, mis omakorda aeglustab loote kasvu ning suurendab enneaegse sünni ning preeklampsia esinemise tõenäosust. Kõrgenenud vererõhk mõjub rasedate naiste organismile koormavalt, suurendades infarkti ohtu sünnitusel (Hameed *et al.*, 2015).

Gestatsioonidiabeet on raseduse ajal esinev kõrgenenud veresuhkru taseme tõusuga haigusseisund, mille puhul on näidatud, et nii rasedatel kui nende järglastel võib kaasneda suurenenud risk tüüp II diabeedi tekkeks. Gestatsioonidiabeedi korral on glükoositolerants, metabolism ja insuliini resistentsus muutunud, kuid täpsemad põhjused ei ole teada (Zhu *et al.*, 2015).

Üsasisene kasvupeetus on tingitud paljudest faktoritest, mis takistavad lootel kasvamist. Üheks põhjuseks võib olla vähenenud verevarustus läbi platsenta, mille tõttu on vähenenud toitainete ja hapniku transport lootenii. Imikutel, kes on sündides gestatsiooniaja kohta liiga väiksed, on leitud kõrgenenud riski kardiovaskulaarhaigusteks ning tüüp II diabeediks. (Ískender-Mazman *et al.*, 2014).

1.2. Preeklampsia

Preeklampsia puhul on tegu raseduskomplikatsiooniga, kus lisaks hüpertensioonile esineb ka proteiinuuria. Preeklampsia esinemise riski suurendab naisel ka esmasrasedus, varasemalt esinenud preeklampsia juhtum, vanus üle 35 eluaasta, kahe või enama loote kandmine ning ülekaalulisus. Lisaks sellele veel raseduseelsed haigusseisundid: kõrgenenud vererõhk, diabeet ning neerude alatalitus (Hernández-Díaz *et al.*, 2009). Preeklampsia avaldub üldjuhul raseduse

kolmandal trimestril, ravimata jätmise põhjustab rasedatel krampe ning võib lõppeda surmaga (Lain ja Roberts, 2002). Preeklampsilise raseduse imikud võivad olla sündides enneaegsed ning gestatsioonilise vanuse kohta väikesed (Lian *et al.*, 2013). Preeklampsia mõjutab 2-5% rasedusi (Redman ja Sargent, 2005). Haiguse tekkemehhanismid on siiani üsna ebaselged, kuid üheks peapõhjuseks peetakse häireid platsenta arengus ja funktsioonis. Pärast sünnituse esilekutsumist ja platsenta irdumist preeklampsia sümptomid kaovad (Roberts ja Cooper, 2001).

Hetkel püütakse preeklampsia avaldumist ennetada korduvate vererõhu mõõtmiste abil ja uriini analüüsil hindamaks neerude 'tervist'. Preeklampsia tekke ette ennustamiseks püütakse tuvastada biomolekule, mida kasutades biomarkeritena oleks võimalik preeklampsia tekke tõenäosust hinnata (English *et al.*, 2015).

1.3.Platsenta ja selle roll preeklampsia kujunemisel

Platsenta koosneb mitmetest erinevatest rakutüüpidest, üheks neist on trofoblasti rakud. Platsenta hattud koosnevad süntsüüsiotrofoblastidest ning tsütotrofoblastidest; mesenhümaalsed rakud; loote vaskulaarsed rakud, mis koosnevad vaskulaarsetest silelihasrakkudest, perivaskulaarsetest rakkudest ning endoteeli rakkudest (Wakamatsu *et al.*, 2011). Trofoblasti rakud on esimesed, mis diferentseeruvad embrüo arengu jooksul, tekkides areneva blastotsüsti ektodermist. Need rakud on vajalikud raseduse stabiilseks kulgemiseks, kinnitades emaka seinale ning algatades implantatsiooni protsessi. Trofoblasti rakud säilitavad raseduse lõpuni tüvirakkude populatsiooni, mis kuni raseduse lõpuni võivad diferentseeruda süntsüüsiotrofoblastiks ja invasiivseks trofoblastiks. Süntsüüsiotrofoblastid vastutavad platsentas toitainete ja gaasi vahetuse eest loote ja ema vahel. Tsütotrofoblasti rakud tungivad süntsüüsiotrofoblasti väätidesse ja moodustades sellega primaarseid koorioni hattusid, kus toimub platsenta arterite ja veenide areng. Trofoblasti rakud migreeruvad mööda hattusid emaka seinani ning kinnitavad platsenta emaka seina külge, mille järel trofoblasti rakud migreeruvad edasi ema spiraalarterini. Järgnevalt asendatakse endoteeli kiht trofoblasti rakkudega, mille tõttu degradeerub lihaskiht ning suureneb platsenta veresoonte läbilaskvusvõime. Spiraalarteris esinev muutus peab toimuma esimese trimestri lõpuks, et edasine rasedus kulgeks komplikatsioonideta. Ebaefektiivne platsenta kinnitumine on mitme rasedustüsistuse, kaasa arvatud preeklampsia tekke põhjuseks (Khong *et al.*, 1986).

1.4. Platsenta geeniekspressioon tuisistusteta ja preeklamptilise raseduse korral

Preeklamptilise ning tuisistusteta raseduse platsentade geeniekspressioonid on erinevad, sest mitmete geenide ekspressioon on diferentsiaalselt reguleeritud. Geeniekspressiooni erinevust preeklamptikute ja tuisistusteta rasedate platsentades on varem üleüldiselt uuritud. Song *et al.* (2015) avaldatud töös on selgelt näidatud, kuidas preeklampsia korral platsenta omab teistsugust geenide ekspressiooniprofiili võrreldes tuisistusteta rasedustega (tabel 1).

Tabel 1. Preeklamptilises platsentas ekspresseeruvad geenid, mille ekspressioon on statistiliselt oluliselt muutunud võrreldes tüsistusteta rasedusest pärinevate platsentaga. Geeniekspressiooni on määratud mikrokiipidega. Tabelis on esitatud autorite poolt toodud geenid või geeni nimekirja korral esimesed kümme geeni. Kohandatud Louwen *et al.* (2012) ülevaate tabeli alusel.

Autor	Ekspressiooni tuvastamise meetod	Ekspressioon ↑	Geenide nimed	Ekspressioon ↓	Geenide nimed
Centlow <i>et al.</i> , 2000	Operon v 2.1 human 70 mer oligo set	3	<i>Hba2, Hby Hbβ</i>	-	-
Enquobahrie <i>et al.</i> , 2008	Operon Human genome array ready oligo set	13	<i>LEP, FLT1, PCDHA3, CYP11A, F2R, IL9, FCGR2B, CDO1, VGLL1, EB13, INSL4, BCL6, INHA</i>	2	<i>MGC1132, NR4A2</i>
Founds <i>et al.</i> , 2009	Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 Gene Chip	5	<i>FSTL3, MMP12, LAIR2, S100A8</i>	31	<i>FSTL3, MMP12, LAIR2, S100A8</i>
Hoegh <i>et al.</i> , 2010	Affymetrix HG-U133A Gene Chip	12	<i>INHBA, LEP, COL17A1, HIG2, SH3BP5, MDR1</i>	9	<i>TXNRD1, FBLN1, THRAP1, BDKRB1,</i>
Jarvenpaa <i>et al.</i> , 2007	Affymetrix Human U133 plus 2.0	4	<i>EPAS1, FLT1, SIGLEC10, ANG4</i>	9	<i>ECGF1, JAG1, Palladin, COL18A1, TNFSF12, VEGF, ANPEP, PDGFA, SERPIN12</i>
Lapaire <i>et al.</i> , 2012	Affymetrix GeneChip Human 1.0 ST Arrays	-	<i>hCGβ, HTRA4, CRHBP, LHB, QPCT, CD97, MMP19, ADAM2, INHBC</i>	-	<i>CCL3, NOX4, VCAM1, FOSB, CX3CR1</i>
Lee <i>et al.</i> , 2009	Agilent Human 4X44K	121	<i>CXCR6, CXCL3, OSM, LEP, FLT1, VEGFA, SMOX, CYP26A, EGLN3, LDHA, CRY2L1</i>	294	-

Meng <i>et al.</i> , 2012	Illumina HumanHT-12 V4 BeadChip	483	<i>BTNL9, HMBS, ULBP1, CHRNA1, RMRP, HPDL, LOC100133277, PLR2J4, TLE6, LOC643955</i>	456	<i>INSL6, CXCL9, TMCC1, PAGE2, LOC100134067, KCNN1, ANKS1B, C3, ACOXL</i>
Nishizawa <i>et al.</i> , 2011	Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array	30.	<i>FSTL3, SERPINA3, INHBA, EB13, TREM1, BCL6, RNU2-1, SLCO2A1, INHA</i>	32	<i>CLDN1, LOC100129345, FAM164A, C20orf69, ZNF117, ANKRD20B, PART1, DKFZP434B2016, C7</i>
Sitras <i>et al.</i> , 2009	Applied Biosystems Human genome survey microarray v2.0	36	<i>LEP, FLT1, FLT4, β-hCG, ENG, LAEVERIN, BCL6, INHA, MMP14, PAPP2:</i>	82	<i>PDGFD</i>
Toft <i>et al.</i> , 2008	Affymetrix HG U133 plus 2.0	2	<i>FLT1, ENG</i>	-	-
Tsai <i>et al.</i> , 2011	Illumina Human6- v2 BeadArray	83	<i>ENG, PAPP2, RDH13, INHA, LEP, FLT1, SIAE, SIGLEC6</i>	45	<i>TUBA1B, F13A1, CRTAP, OPN3, RBBP4, JAK1, CTSC, TUBA1A, OPN3, VSIG4</i>
Winn <i>et al.</i> , 2009	Affymetrix HG-U133A / HG-U133B	55	<i>FLT1, LEP, CRH, SIGLEC6, PAPP2, INHA, ENG, HTRA1</i>	14	<i>ANTXR1, HSD17B1, ASB2, CA10, FBN2, GSTA3, GPR177, F5, KCNK3, NA, TMEM136,</i>
(Song <i>et al.</i> , 2015)	Illumina Human HT-12 V4.0 expression bead chip	26	<i>CRH, PRG2, LHB, LEP, ABP1, CGB5, PAPP2, COL17A1, EB13, PNCK</i>	124	<i>VTN, LOC348840, CADM3, MAP1L3C, BHLHB3, MSC, CPXM1, THY1, DARC, DPT</i>

1.5. mikroRNAd

1.5.1. mikroRNA

Esimene mikroRNA, *lin-4*, avastati 1993. aastal (Lee *et al.*, 1993). Pärast seda on avastatud mikroRNAd hulk märgatavalt suurenenud. MikroRNAd on 19-22 nukleotiidi pikkused üheaheelised RNA molekulid, mis alandab geeniekspressiooni. Olenevalt mikroRNA ja mRNA vahelisest seose tugevusest, mikroRNA kas vähendab mRNA-lt toimuvat translatsiooni või toimub mRNA lagundamine (Ambros, 2001).

MikroRNAsid jagatakse erinevatesse geeniperekondadesse vastavalt mikroRNA järjestuse ning pre-mikroRNA struktuuri alusel (Kozomara ja Griffiths-Jones, 2011). MikroRNAd perekonad on tähtsad, kuna ühes perekonnas olevad mikroRNAd võivad omada sarnaseid järjestusi, kattuvaid sihtmärk-järjestusi või sarnaseid funktsioone (Mathelier ja Carbone, 2013).

Bioloogilise mitmekesisuse tekkimine läbi genoomse evolutsiooni annab võimaluse organismidel diferentseeruda. MikroRNAd tekkisid varakult ja neid võib leida kaugelt suguluses olevatest organismidest, nii taimedest kui loomadest. mikroRNAd biogenees ja sihtmärk-geenide tuvastamine erineb suuresti organismiklasside vahel (Morales Prieto ja Markert, 2011). Kui võrrelda mikroRNAd fülogeneetilist jagunemist, leiame ainult *mir-100*, mida võib tuvastada kõikides pärishulkkraksetes organismides, välja arvatud käsnadest (Grimson *et al.*, 2008). Hiljem on toimunud kolm mikroRNAd evolutsioonilist eristumist. Esimene leidis aset kahekülgsete loomade evolutsiooni ajal, millega kaasnes 34 mikroRNA konserveerumine esmassuusetes ja teissuusetes organismide vahel. Teine mikroRNAd evolutsiooniline eristumine toimus selgroogsete evolutsiooni alguses ja kolmas loomade seas, kellel esineb platsenta. Sealt on pärit ka enamus platsenta spetsiifilisi mikroRNAsid. Nende evolutsioonietappide tõttu esineb korrelatsioon organismi keerukuse ja mikroRNA hulga vahel. Vastavalt miRBase andmebaasile (versioon 17) esineb sebrakala genoomis 358 mikroRNA geeni, hiirel 720 ja inimesel 1424 mikroRNA geeni (Berezikov, 2011).

Liigisiseste homoloogsete järjestuste tuvastamine on hea viis mikroRNA sihtmärk-geenide avastamiseks. MikroRNAd sihtmärgi tuvastamine põhineb ideaalsel Watson-Crick nukleotiidide paardumisel mikroRNA sihtmärk-järjestuse (*seed sequence*) ja mRNA 3'UTR piirkonna vahel. Ühe nukleotiidsed muutused kummaski piirkonnas võivad segada mikroRNAd funktsioneerimist. MikroRNAd sihtmärk-järjestustes esinevad mutatsioonid avaldavad

organismile vähem mõju, olles paremaks evolutsiooni sihtmärgiks, muutes mikroRNA ja mRNA seotuse tugevust. MikroRNAde ekspressiooni tasemete uurimine on näidanud, et esineb variatsioone liikide vahel ning teatud tingimustes ka koe siseselt (Gardner ja Vinther, 2008). Tabelis 2 on esitatud platsenta põhiste mikroRNAde esinemine 11 liigi vahel.

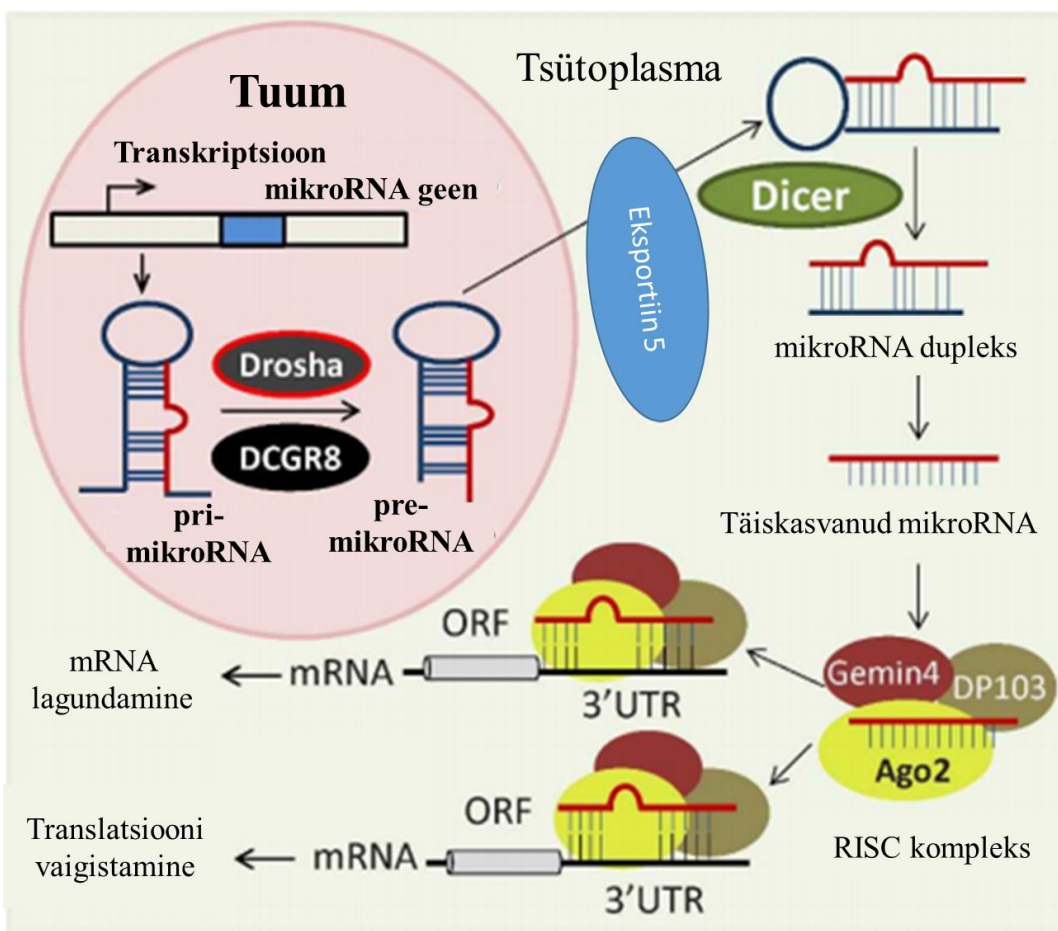
Tabel 2. Peamiste platsenta mikroRNAde ortoloogid loomades klastrite baasil. Informatsioon mikroRNA klastrite kohta, mis reguleerivad rasedust (C14MC, C19MC ja mir-371-3 klaster) on saadud publikatsioonidest, mis on tuvastanud ortolooge kasutades BLAST analüüsi, üle üheteistkümnel liigil. Tabelis on välja toodud mikroRNAd, mis ei oma kirjeldatud liigis ortolooge. Inimese puhul on tabelis välja toodud inimese spetsiifilised mikroRNAd. Tabel on koostatud Morales *et al.* (2014) joonise alusel.

	Opossum	Lehm	Koer	Hiir	Rott	Marmoset	Makaak	Orangutang	Gorilla	Šimpans	Inimene
C19MC	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-512-2</i> <i>mir-515-1</i> <i>mir-515-2</i> <i>mir-517a</i> <i>mir-517b</i> <i>mir-518a-2</i> <i>mir-518c</i> <i>mir-519d</i> <i>mir-520f</i> <i>mir-521-1</i> <i>mir-521-2</i> <i>mir-526a-2</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-518a-1</i> <i>mir-520b</i>	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	
miR-371-3	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-372</i> <i>mir-373</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	Kõikidel mikroRNAdel esinevad ortoloogid	

C14MC	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-300</i> <i>mir-337</i> <i>mir-655</i> <i>mir-668</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-300</i> <i>mir-337</i> <i>mir-412</i> <i>mir-665</i> <i>mir-770</i> <i>mir-1247</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-300</i> <i>mir-432</i> <i>mir-541</i> <i>mir-654</i> <i>mir-655</i> <i>mir-656</i> <i>mir-889</i> <i>mir-1185-1</i> <i>mir-1185-2</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-300</i> <i>mir-432</i> <i>mir-541</i> <i>mir-655</i> <i>mir-656</i> <i>mir-889</i> <i>mir-1185-1</i> <i>mir-1185-2</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-136</i>	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-655</i>	Kõikidel mikroRNA del esinevad ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid: <i>mir-1247</i>	Kõikidel mikroRNA del esinevad ortoloogid	
	Inimese spetsiifilised	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	Puuduvad mikroRNA ortoloogid	<i>mir-659</i> <i>mir-941</i> <i>mir-1302</i> <i>mir-3156</i> <i>mir-3648</i> <i>mir-3673</i> <i>mir-3690</i> <i>mir-4487</i> <i>mir-4739</i> <i>mir-5095</i>

1.5.2. MikroRNA biogenees

MikroRNAde süntees algab RNA polümeraas II-ga, mis sünteesib pika RNA transkripti – pri-mikroRNAd. Pri-mikroRNA moodustab juuksenõela-struktuuri, mida lõikab lühemaks endonukleaas Drosha, moodustades 60-70 nukleotiidi pikkuse kaheahelalise pre-mikroRNA. Pre-mikroRNA transporditakse eksportiin 5 abil tsütoplasmasse, kus seda protsessitakse RNase III ensüümiga Dicer poolt. Selle tagajärjel moodustub lühike kaheahelaline RNA molekul, mille ühest ahelast tekib täiskasvanud mikroRNA, mis kinnitub Argonaut valku sisaldavale RISC kompleksile. Moodustunud kompleks kinnitub mRNA külge, mRNA molekul lagundatakse või toimuv translatsioon vaigistatakse (joonis 1) (Donker *et al.*, 2007). MikroRNAd moodustavad mRNAga kas täiusliku või mitte-täiusliku kontakti, mille tõttu võib üks mikroRNA omada mitme geeni mRNAal sihtmärk-järjestust (Bartel, 2009).



Joonis 1. MikroRNA töötlemine ja funktsioneerimine rakus. MikroRNA biosüntees saab alguse transkriptsioonist, mida teostab RNA polümeraas II. Transkripteeritud mikroRNA, pri-mikroRNA, moodustab juuksenõela struktuuri. Pikka pri-mikroRNA molekuli protsessib esmalt RNAas III endonukleas Drosha, ja dsRNA-d siduv valk DGCR8. Selle protsessi käigus moodustub 60-70 nukleotiidi pikkune pre-mikroRNA mis omab juuksenõela struktuuri. Pre-mikroRNA transporditakse tuumast välja Eksportiin 5-ga. Tsütoplasmas protsessitakse pre-mikroRNA-d Dicer ensüümiga, eemaldades juuksenõela struktuuri ning moodustub lühike kaheaahelaline RNA molekul. Kaheaahelalise mikroRNA ühest ahelast moodustub täiskasvanud üheaahelaline mikroRNA, mis liitub RISC kompleksiga. MikroRNA-RISC kompleks seondub mRNA 3' UTR otsa, mis põhjustab mRNA-s ebastabiilsust ning see lagundatakse või takistab mRNA-lt toimuvat translatsiooni. Joonis on koostatud Chen ja Wang (2013) poolt ning tõlgitud eesti keelde töö autori poolt.

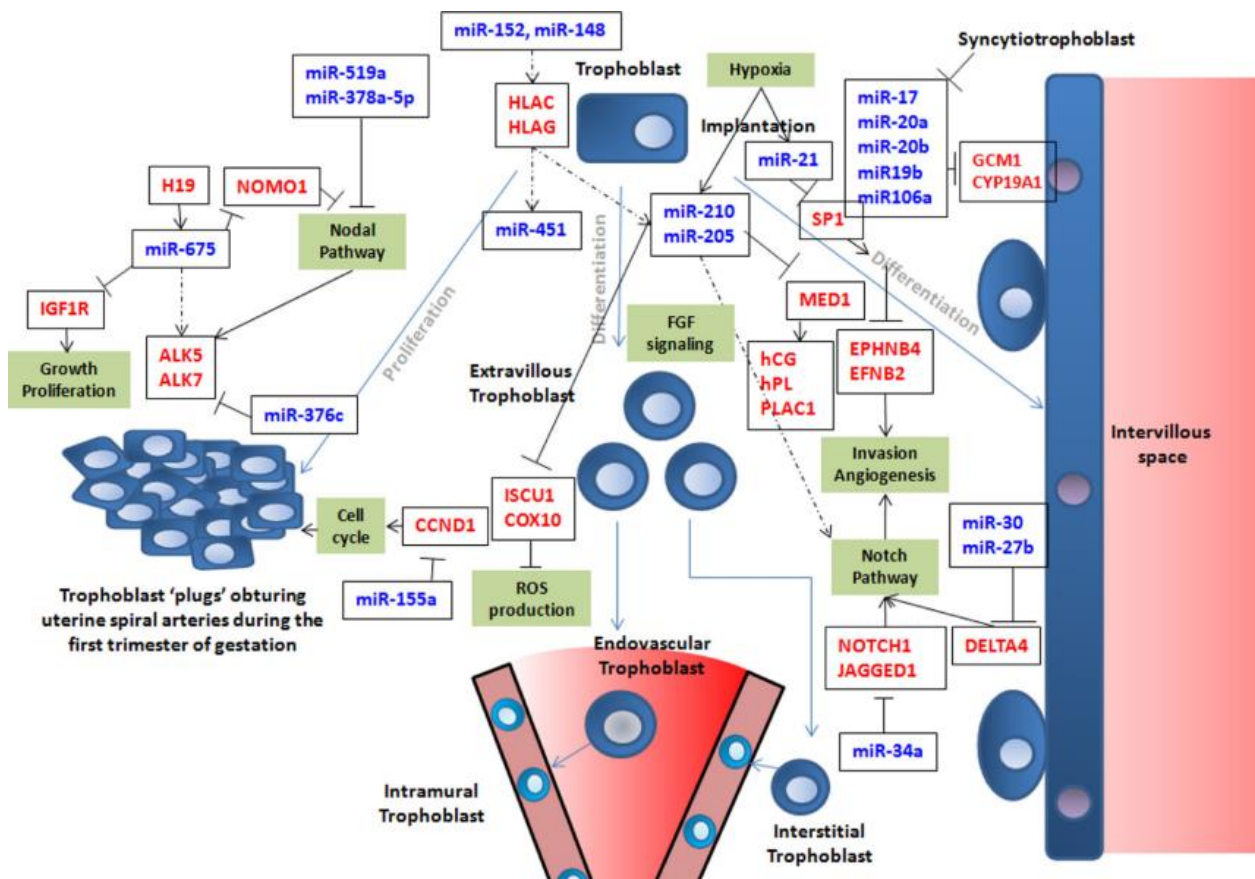
1.6. MikroRNAd platsentas

Varasemalt on mitmete uurimustööde poolt näidatud, et platsenta omab spetsiifilisi mikroRNAsid, mis reguleerivad geenide ekspressiooni platsentas (Barad *et al.*, 2004; Morales-Prieto ja Markert, 2011; Morales-Prieto *et al.*, 2013). Tekkinud muutused mikroRNade ekspressiooniprofiilis võivad viidata tekkivale või juba esinevale haigusseisundile. Võrreldes omavahel tuisustusteta raseduse platsentas ekspresseeruvate mikroRNade taset preeklamptilise raseduse platsenta mikroRNade tasemega, võib leida selgeid muutusi mikroRNade ekspressioonis (Mayor-Lynn *et al.*, 2011)

Morales-Prieto *et al.*, (2012) töös näidati 762 mikroRNA ekspressiooni profiili neljas trofoblasti rakuliinis: HTR-8/SVneo, JEG-3, AC1-M59 ja ACH-3P. Antud töös leiti, et mikroRNade ekspressioonimuster oli üldiselt sama, kuid väiksel määral esines siiski erinevusi. Võrreldes platsenta mikroRNade profiili enneaegse, õigeaegse ning esile kutsutud sünnituse korral, tuvastati 39 mikroRNAd, mis omasid antud gruppide vahel diferentsiaalset ekspressiooni (Montenegro *et al.*, 2009).

Mitmed platsentas kõrge ekspressiooniga mikroRNAd on pärit kromosoom 19 mikroRNade klastrist (C19MC), mida käsitleti esimesena Bentwich *et al.* (2005) töös. Tegu on ühe suurima ning primaatidele omase mikroRNA geenide klastriga. Primaarsetes trofoblasti rakkudes kõrgeima ekspressiooniga tuvastatud mikroRNAd on *mir-517a*, *mir-517b*, *mir-516b*, *mir-525-5p*, *mir-512-3p* ja *mir-513-3p* (Donker *et al.*, 2012). Oluline mikroRNade klaster asub veel kromosoomil 14 (C14MC), mille mikroRNAsid on võimalik tuvastada ka teistes imetajates, tegu on suurima platsentaspetsiifilise mikroRNade klastriga (Kamanu *et al.*, 2013).

Platsentas ekspresseeruvaid mikroRNAsid on tuvastatud ema vereringest kogu raseduse kestvuse jooksul (Kotlabova *et al.*, 2011). Platsentast pärit mikroRNAd võivad mõjutada ema organismi ja täidavad seeläbi reguleerivat rolli (Wang *et al.*, 2012). Doridot *et al.* (2013) töös toodi välja keerukas skeem, kuidas mikroRNAd läbi erinevate reguleerivate reguleerivad platsentas aset leidvaid muutusi (joonis 2).



Joonis 2. Ekspresseerunud mikroRNAde mõju trofoblasti rakkude arengule platsentas. Trofoblasti rakud on märgitud sinisena ja ümara tuumaga. Trofoblastid võivad jaguneda (vasakpoolne joonise osa) või diferentseeruda süntsüüsiotrofoblastideks (parempoolse joonise osa; sellisel juhul on tuum märgitud lillaga) või endovaskulaar või ema arterite kihiks (esitatud joonise all osas koonusega, tuumad on tähistatud helesinisega). Joonisel on punasega esitatud rakujagunemist reguleerivad geenid, Nodal, Notch ja FGF rada, ROS'i produktsioon, invasioon ja angiogenees. MikroRNA, mis reguleerivad antud protsesse ja radu, on esitatud sinisega. Sinised jooned tähistavad rakkude diferentseerumis- ja jagunemisradasid. Joonis on koostatud Doridot *et al.* (2013) poolt.

1.7. Platsenta mikroRNAde ekspressiooniprofiil preeklampsia korral

Preeklampsia korral on mikroRNAde ekspressiooniprofiili muutust platsentas tuvastatud mitmetes uurimustöodes, kasutades RT-qPCRi ning erinevaid mikroRNA kiipe (Enquobahrie *et al.*, 2011; Mayor-Lynn *et al.*, 2011; Pineles *et al.*, 2007). Platsentapõhised mikroRNA ekspressiooniuringud on tuvastanud mitmeid diferentsiaalselt ekspresseeruvaid mikroRNAsid, mis võivad omada reguloorset rolli platsenta arengus (Engels ja Hutvagner, 2006).

Diferentsiaalset ekspressiooni omavate mikroRNade uuringute tulemuste vahel ei ole väga suures mahus ülekattuvusi. Tulemuste mittekattumine võib olla selgitatav erinevate meetodite kasutamise ning platsenta sisese varieeruvusega (Chen ja Wang, 2013).

Mir-210 on kõige enam preeklampsiaga seostatud mikroRNA, mille diferentsiaalset ekspressiooni preeklampsia puhul on mitmes uurimustöös tuvastatud, *mir-210* ekspressioonitase suureneb hüpoksiaga. Platsenta ja erinevate kasvajate puhul on oluliseks etapiks verevarustuse tagamine koes. Vähesese hapniku transpordi korral on märgatud *mir-210* suurenenud ekspressiooni (Fasanaro *et al.*, 2009). Kasvajate juures on näidatud, kuidas *mir-210* reguleerib metastaaside teket (Tsuchiya *et al.*, 2011).

Mir-144 leiti preeklampsia biomarkereid otsides. MikroRNA *mir-144* diferentsiaalne ekspressioon on tuvastatud raseda naise vereplasmast. Ura *et al.* (2014) ja Li *et al.* (2013) töödes määrati preeklampsiat põdeva raseda vereplasmast mikroRNade kontsentratsioon ning võrreldi seda tuisistusteta kulgevate rasedustega. Mõlema puhul leiti, et *mir-144* oli statistiliselt olulisel määral alla reguleeritud (FDR<0,05). Lisaks on *mir-144* uuritud seoses põie- ja kurguvähi rakkude migratsiooniga. Põievähi korral näidati, et *mir-144* ekspressioonitase oli alanenud (Guo *et al.*, 2013) ning kurguvähi korral oli ekspressioonitase suurenenud võrreldes normaalse koega (Zhang *et al.*, 2013). Erinev ekspressiooni taseme suund võib olla tingitud koespetsiifilisusest.

Mir-96 on laialdaselt uuritud seoses erinevate kasvajatega: põie-, kopsu-, eesnäärme- ja rinnavähiga (Fang, 2013; Wang *et al.*, 2012b; Yu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). *Mir-96* tundub reguleerivat onkogeene ning mõjub vastavalt kasvajatüübile erinevalt. Pankrease kasvaja korral on täheldatud *mir-96* suurenenud ekspressiooni, mis reguleerib *KRAS* geeniekspressiooni alla (Yu *et al.*, 2010). *KRAS* mõjub pankrease kasvaja kasvule soodustavalt (Yu *et al.*, 2010). Vastupidist efekti on tuvastatud aga rinna- ja põievähi korral, kus *mir-96* reguleerib vastavalt *RECK* ja *FOXO1* geeni, surudes nende ekspressiooni maha ja soodustades kasvaja jagunemist (Fang, 2013; Xia *et al.*, 2014).

1.8. Trofoblasti rakuliini geeniekspressiooni reguleerimine mikroRNA *mimic* õitega.

Platsentapõhiste haiguste uurimise üheks kasutatavaks mudeliks on trofoblasti rakuliinid. Need jagunevad kolme rühma: platsenta kasvajatest pärit rakuliin, (BEWO, JEG-3, JAR), immortaliseeritud trofoblasti rakud ning piiratud elueaga trofoblasti rakud. Mudelite kasutamine võimaldab uurida, kuidas rakud erinevate stiimulite mõjul käituvad ning leida muutuseid erinevatel tasanditel. Selleks, et uurida mikroRNAde mõju trofoblasti rakuliinile ja muuta rakus esinevat mikroRNA hulka, on võimalik mikroRNAsid inhibeerida *antimir*'idega ning nende hulka suurendada mikroRNAde *mimic*'idega. *Antimir*'ide puhul on tegu mikroRNAle komplementaarse modifitseeritud RNA molekuliga, mis kinnitub mikroRNA järjestusele suurema afiinsusega kui mRNA molekul, tõkestades mikroRNA funktsiooni (Elmén *et al.*, 2008). MikroRNA *mimic*'ite puhul on tegu sünteesitud kaheaahelaliste mikroRNA molekulidega, mis rakku transfekteerides omandavad mikroRNA küpse vormi, suurendades sellega mikroRNA hulka rakus (Bader *et al.*, 2010). *Mimic*'ite viimine rakukultuuri põhjustab selliste geenide ekspressiooni mahasurumist, mis omavad mikroRNA seondumiskohta 3'UTR otsas. Katse tulemusel on võimalik tuvastada, kas antud mikroRNAdele ennustatud sihtmärk-geenide ekspressioonitase alaneb peale mikroRNA *mimic*'i transfekteerimist rakku (Wang *et al.*, 2014). Varasemad uuringud on käsitletud teemasid, milline on trofoblasti rakuliinide ekspressioonitaset normaaltingimustes (Morales-Prieto *et al.*, 2012) ning üksiku geeni ekspressiooni peale mikroRNA *mimic*'i transfekteerimist (Dong *et al.*, 2009; Doridot *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

2. PRAKTILISE TÖÖ EESMÄRGID JA ÜLESEHITUS

2.1. Töö eesmärgid

Uurimisprojekti üldiseks eesmärgiks on tuvastada platsentas diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde regulatoorne mõju platsentas ekspresseeruvatele geenidele. Uurimistöö tugineb 8 preeklampsia ja 8 tuisistusteta raseduste kogu miRNoomi avaldamata andmetele (Siim Sõber *et al.*, avaldamata andmed). MiRnoomiks nimetatakse genoomis ekspresseeruvate mikroRNAde kogumit.

Käesoleva magistritöö fookuses on mikroRNAd, mis tuvastati miRnoomi analüüsis kui kõige tugevamalt diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAd preeklampsia patsientide platsentades võrreldes tuisistusteta platsentadega.

Töö alaeesmärgid:

- 1) Andmebaaside ja kirjandusallikate detailne analüüs, ennustamaks sihtmärk-geene, mille ekspressiooni võiksid eelnevalt tuvastatud mikroRNAd platsentas reguleerida.
- 2) Piloot-katsete teostamised trofoblasti JEG-3 rakuliinis, testimaks väljavalitud kolme mikroRNA efekti potentsiaalsetele sihtmärk-geenidele. Lisaks üldisemalt analüüsida immortaliseeritud rakuliini sobivust platsenta mikroRNAde *in vitro* uuringuteks *in vivo* efekti imiteerimiseks.

2.2. Tööskeem

Algandmed on saadud *REPROgrammed fetal and/or maternal METAbolism (REPROMETA)* valimist pärit 16 platsenta proovi mikroRNA ja RNA sekveneerimisest. Sekveneerimisest pärit ekspressiooniandmete analüüsimine ning diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde tuvastamine on teostatud Siim Sõbra poolt.

Käesoleva magistritöö raames teostatud etapid:

1. Preeklampsia korral platsentas diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde tuvastamine ning mikroRNAde diferentsiaalset ekspressiooni analüüsivate programmide DESeq (Anders ja Huber, 2010) ja DESeq2 (Love *et al.*, 2014) analüüsi tulemustest ülekattuvate mikroRNAde tuvastamine.

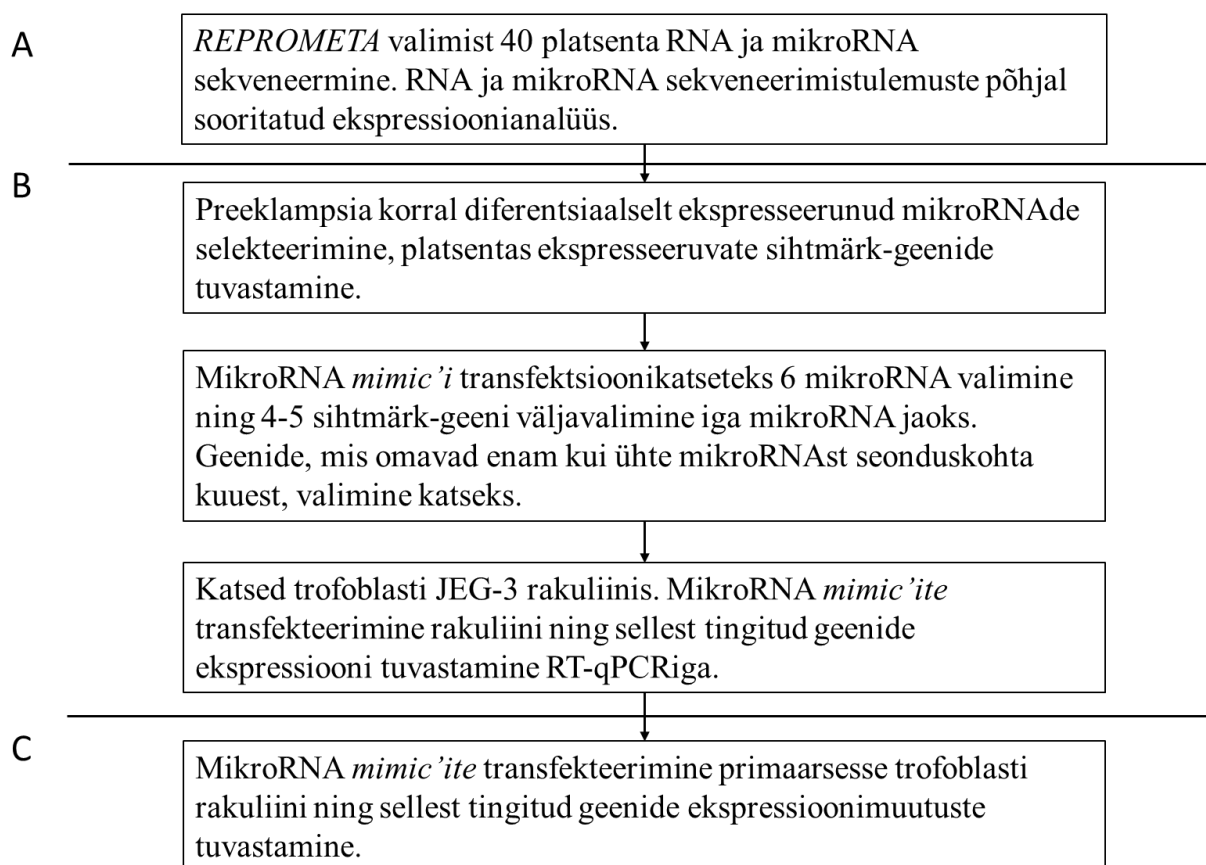
2. Analüüsiprogrammide tulemuste hulgast ülekattunud mikroRNAde sihtmärk-geenide, mis on platsentas ekspresseerunud ning omavad kõrget seondumisskoori mikroRNA sihtmärke ennustavates andmebaasides, tuvastamine.

3. Kõige huvipakkuvamate mikroRNAde väljavalimine (n=6) *in vitro* katsete jaoks trofoblasti JEG-3 rakuliinis ning igale mikroRNAle nelja kuni viie platsentas ekspresseeruvate sihtmärk-geenide tuvastamine.

4. MikroRNAde üle-ekspressioonikatsed trofoblasti JEG-3 rakuliinis, kasutades *mimic*'eid, sihtmärk-geenide ekspressiooni alla reguleerimiseks.

5. Kinnitada sihtmärk-geenide ekspressioonimuutused RT-qPCR meetodiga.

Töö üldine skeem on joonisel 3.



Joonis 3. Töö üldine skeem. Osa A oli eelnevalt sooritatud Siim Sõbra poolt. RNA ja mikroRNA sekveneermise andmete analüüsimiseks kasutati DESeq (Anders ja Huber, 2010) ja DESeq2 (Love *et al.*, 2014) R-i pakette. Käesolevas magistritöös teostati üldise katse B osa ning C viiakse läbi doktorantuuris.

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1. Algandmed

3.1.1. Valimi kirjeldus

Uuring põhineb *REPROgrammed fetal and/or maternal METAbolism (REPROMETA)* valimil, mis koguti vahemikus 2006-2011 Tartu Ülikooli Naistekliinikus. Valim koguti platsenta genoomi ekspresiooniprofiili määramiseks. Proovid koguti emadelt, isadelt ja sünnitusejärgselt nabaväädist. Proovide kogumis viisid läbi dots. Kristiina Rull, Dr. Pille Vaas ning Dr. Pille Teesalu (Rull *et al.*, 2015). Platsenta proovid jagati raseduse kulgemise ja lapse sünniaegse suuruse järgi gruppidesse. Projekti valimist jäeti välja rasedused, kus registreeriti loote arengus häireid või kromosomaalseid anomaaliaid, perekonnad, kus eksisteeris pärilik geneetiline haigus ning patsiendid, kellel esines eelnevalt diabeet, hüpertensioon või krooniline neerupuudulikkus.

Uuringus kasutati 8 platsentat tüsistusteta raseduste grupist ning 8 preeklamptilise raseduse grupist. Gestatsiooni vanus ja laste sugude osakaal gruppide sees ning vahel üritati hoida võimalikult võrdsetena. Kõikides gruppides esines nii keisrilõikeid kui ka vaginaalseid sünnitusi (tabel 3).

Käesolev uuring põhineb järgmistel uuringugruppidel: (a) preeklampsia (PE) ja (b) tüsistusteta rasedus. PE oli defineeritud kui hüpertensioon (süstoolne vererõhk üle 160 mmHg ja/või diastoolne vererõhk üle 110 mmHg) ja/või proteiinuuria, kus 24 tunni jooksul kogunes uriini üle 5g valku. Tüsistusteta raseduse grupp koosnes komplikatsioonideta rasedustest, kus sündis normaalkaaluline vastsündinu (sünnikaal jäi kümnnenda kuni üheksakümnnenda protsentiili vahele sünnikaalude jaotuses).

Tabel 3. miRseqi jaoks kasutatud valimi andmed, mis on esitatud aritmeetilise keskmisena koos standardhälbega. Tabel on koostatud kohandatud Söber *et al.* (avaldamata andmed) tabeli alusel.

	Õigeaegne	PE ¹
Ema vanus (aastates)	29.3 ± 7.85	27.4 ± 7.39
Ema pikkus (cm)	164.5 ± 5.34	168.8 ± 3.85
Raseduseelne KMI ² (kg/m ²)	23.9 ± 3.77	26.3 ± 5.00
Rasedusaegne kaalutõus (kg)	17.2 ± 3.52	10.9 ± 3.36*
Esmane rasedus (n)	3	6
Suitsetas raseduse ajal (n)	2	2
Gestatsioonilivanus sündides (päevades)	278.6 ± 11.5	266.1 ± 3.94*
Sünnitustegevus (jah/ei)	5/3	2/6
Sünnitusviis (vaginaalne/keisrilõige)	5/3	2/6
Isa vanus (aastates)	31.8 ± 5.99	32.8 ± 8.94
Isa KMI (kg/m ²)	25.1 ± 3.83	28.8 ± 6.34
Vastsündinu kaal (g)	3703 ± 392	2794 ± 488*
Vastsündinud pikkus (cm)	51.3 ± 1.89	47.6 ± 1.51*
Ponderal indeks ³ (g/cm ³)	2.74 ± 0.27	2.57 ± 0.29
IUGR ⁴ (n)	0	4
Vastsündinu sugu (F/M)	3/5	4/4
Platsenta kaal (g)	571.3 ± 115.8	476.9 ± 119.9

¹PE, preeklampsia

²KMI, kehamassiindeks

³Ponderal indeks on suhe vastsündinu kehakaalu ja pikkuse vahel: [kaal (g) x 100] ÷ [pikkus (cm)]³

⁴IUGR, emakasisene kasvupeetus (*intrauterine growth restriction*)

*P-väärtus < 0.05 võrrelduna tuisistusteta rasedate grupiga, Student'i T-test (kvantitatiivsete muutujate jaoks) või χ^2 test (binaarsete muutujate jaoks).

3.1.2. MikroRNAd e sekveneerimine ja diferentsiaalse ekspresiooni analüüs

Platsenta proovidest eraldatud mikroRNA raamatukogu valmistamine, sekveneerimine ja esmaste toorandmete bioinformaatiline töötlus sooritati FIMM-is (*Institute for Molecular Medicine Finland*). Edasine andmeanalüüs teostas Siim Sõbra poolt, kasutades miRseq tulemuste analüüsimiseks kahte R-i paketti DESeq (Anders ja Huber, 2010) ja DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Kahe erineva meetodi kasutamine oli tingitud programmi uuema ja tundlikuma versiooni avaldamisest vahetult peale andmeanalüüsi teostamist DESeq paketi. DESeq ja DESeq2 puhul on tegu R-is paiknevate pakettidega, mis kasutavad negatiivsel binoomjaotusel põhinevat mudelit suuremahuliste andmehulkade haldamiseks ning analüüsimiseks, milleks on RNA ja miRseq (Sõber *et al.*, avaldamata andmed).

3.1.3. Analüüsitulemustest sobivate mikroRNAd e valimine

REPROMETA projektiga kogutud tüsistusteta rasedate ja preeklamptilise raseduse gruppide vahelisel võrdlemisel DESeq (Anders ja Huber, 2010) ja DESeq2 (Love *et al.*, 2014) tulemuste põhjal moodustati 43 mikroRNA nimekiri, mis koosnes kahe meetodi vahel ülekattuvatest mikroRNAdest. Väljavalitud mikroRNAd e ekspresioonitasemete suhe erines tüsistusteta rasedate ja preeklamptilise raseduse gruppide vahel rohkem kui 1,19 korda ning DESeq2 näitas statistiliselt olulist seost ($FDR < 0,05$ DESeq2). MikroRNAd e funktsiooni paremaks mõistmiseks uurisin varem avaldatud artikleid, kus käsitleti mikroRNA võimalikke funktsioone raku. Eriti oluliseks pidasin varasemaid uurimustöid, mis olid seotud raseduse kulgemise ja rasedusaegsete komplikatsioonide esinemisega. MikroRNAd e funktsiooni tuvastamiseks on oluline teada mikroRNAd e asukohta genoomis. Klastrites paiknevad mikroRNAd e võivad omada sarnast funktsiooni, reguleerides sarnase funktsiooni või tervenisti samu gene. MikroRNA geenide asukoha tuvastamiseks kasutasin miRBase andmebaasi (versioon 21) (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). MikroRNAd e sihtmärk-geenide leidmiseks kasutasin kolme andmebaasi: TargetScan (Grimson *et al.*, 2007), Miranda (Betel *et al.*, 2008) ja MirTarBase'i (Hsu *et al.*, 2014). Kogutud informatsiooni põhjal valisin välja 13 mikroRNAd e edasiseks uurimiseks. Tabelis 4 on ära toodud täpsed kriteeriumid 13 mikroRNA väljavalimiseks.

Tabel 4. Platsentas diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde väljavalmimise kriteeriumid REPROMETA valimist preeklampsia ja tüsistusteta raseduse võrdlemisega.

Selekteerimise kriteerium	Kriteerium
DESeq2 analüüsi valepositiivse tulemuse piir.	DESeq2 FDR < 0.05
DESeq ja DESeq2 analüüsi tulemused.	DESeq ja DESeq2 analüüsil tulemustel suurenenud ekspressioonitase preeklampsia korral.
Varasematest uuringutest pärinevad tulemused.	MikroRNA reguleerib gene, mis osalevad raku elutsükli, reguleerivad rakkude liikuvust ja jagunemist.
MikroRNA asukoht genoomis.	MikroRNA paikneb platsentaspetsiifiliste mikroRNAde klastris või mikroRNA geenid paiknevad samas kromosoomis.
MikroRNA sihtmärk-geenid.	MikroRNA omab sihtmärk-geene, mis ekspresseeruvad platsentas.

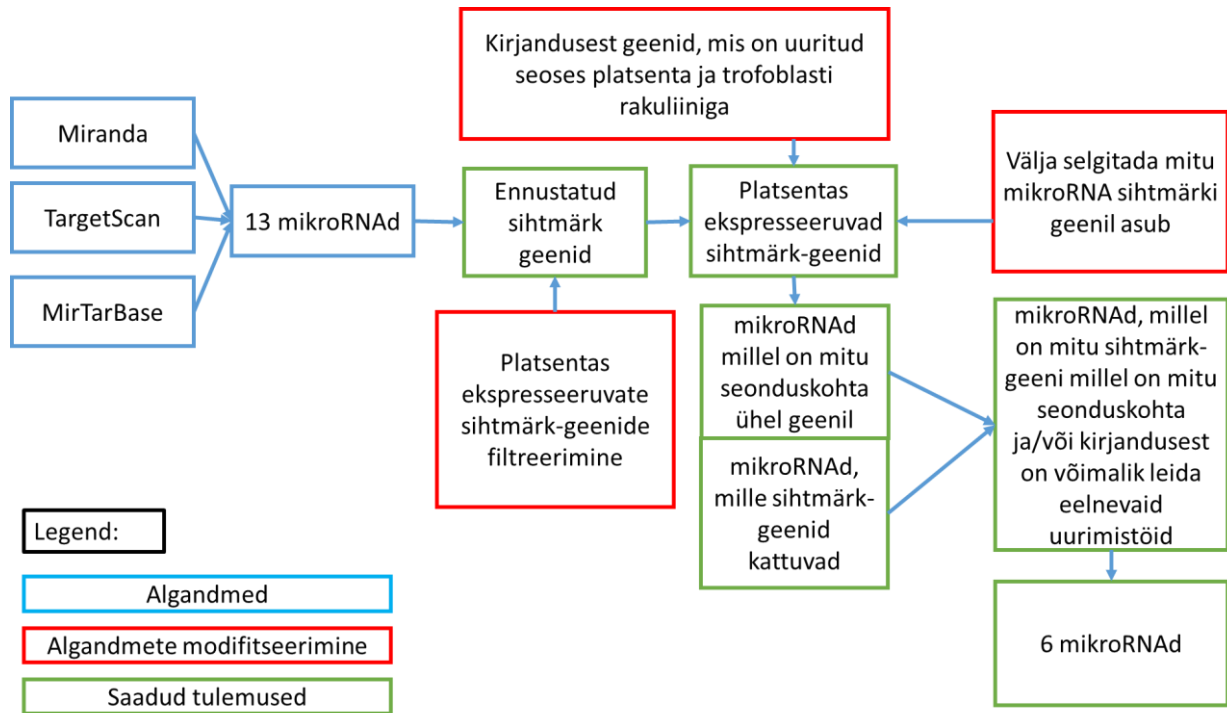
3.2. MikroRNAde sihtmärk-geenide tuvastamine ja katseks valimine

Erinevate sihtmärk-geenide andmebaase kasutades tegin kindlaks, millised geenid on valitud 13 mikroRNA poolt reguleeritud (joonis 5). TargetScanHuman andmebaas (versioon 6.2, väljastatud juuni, 2012) (Grimson *et al.*, 2007) ennustab matemaatilise mudeli põhjal mikroRNAde sihtmärk-geene. Kasutasin andmebaasi allalaetavat versiooni *Conserved Family Info* faili, kus on välja toodud mikroRNAde sihtmärk-geenid, mis omavad andmebaasi poolt esitatud kõrget tõenäosusskoori sihtmärk-järjestuse esinemise suhtes. Mind huvitava informatsiooni kättesaamiseks kasutasin enda kirjutatud pythoni (versioon 3.3) skripti, millega filtreerisin välja eelnevalt valitud 13 mikroRNAle sihtmärk-geenid. Sellest omakorda filtreerisin välja geenid, mis ekspresseeruvad platsentas. Filtreerimise jaoks kasutasin pythonis (versioon 3.3) enda kirjutatud skripti. *Mir-210* sihtmärk-geenideks ennustas TargetScan üsna vähe platsentas ekspresseeruvaid geene. Lisainformatsiooni saamiseks kasutasin MirTarBase'i (versioon 4.5, väljastatud 2013) (Hsu *et al.*, 2014) andmebaasi. Tegu on andmebaasiga, kus mikroRNA sihtmärk-geenid on katseliselt valideeritud. See annab suurema kindluse sihtmärk-geenide õigsuse kohta, samas piirab see olemasolevate sihtmärk-geenide nimekirja. Kolmandana kasutasin mudelipõhist mikroRNA seondumiskoha andmebaasi Miranda (väljastatud august 2010) (Betel *et al.*, 2008),

milles on võimalik seondumiskohti visuaalselt vaadata. Andmebaasist Miranda kasutasin samuti kõrge statistilise väärtusega ennustatud sihtmärk-geenide faili, millest filtreerisin välja platsentas ekspresseeruvad geenid.

Kirjandusest, TargetScanist, MirTarBase'ist ja Mirandast kogutud sihtmärk-geenide nimekirja juurde lisasin geenide ekspressiooniväärtused platsentas. Selleks kasutasin Protein Atlas (versioon 13, väljastatud 11.6.2014) (Uhlen *et al.*, 2010) ja Expression Atlas (väljastatud 13.10.2014) (Kapushesky *et al.*, 2010), millest võtsin platsentas ekspresseeruvate geenide RNA ekspressioonitasemed. Protein Atlasest võtsin lisaks juurde BEWO rakuliini geeniekspressiooni andmed sihtmärk-geenidele. Rakuliinid JEG-3 ja BEWO omavad sarnast geeniekspressiooni profiili. Teades BEWO rakuliinis esinevat geeniekspressiooni taset, võime eeldada sarnast ekspressiooni ka JEG-3 rakuliinis (Bilban *et al.*, 2010).

Alge 13 mikroRNA seast valisin välja kuus nn. prioriteetset mikroRNAd, millest kolmega (*mir-96*, *mir-144*, *mir-210*) teostati käesoleva magistritöö raames *in vitro* pilootkatsed JEG-3 rakuliini kasutades. Need kuus olid valitud eelneva kirjanduse ja *REPROMETA* katsest saadud analüüsi tulemuste põhjal. Igale mikroRNAle valisin välja neli kuni viis geeni sihtmärk-geenide seast, mille tuvastasin andmebaaside ja kirjanduse abil. Sobivaks lugesin geeni juhul, kui sellele oli ennustanud kõrge statistilise väärtusega seondumiskoht või MirTarBase'is oli välja toodud katseliselt mikroRNA ja geeni vaheline seos. Olulised olid ka geenid, mis omasid mitme mikroRNA seondumiskohta, mis võimaldab hiljem hinnata mikroRNade koosmõju geeniekspressioonile.



Joonis 4. 13 mikroRNA seast katseteks kuue prioriteetse mikroRNA väljavalimine. Kasutades TargetScan (Grimson *et al.*, 2007), Miranda (Betel *et al.*, 2008) ja MirTarBase (Hsu *et al.*, 2014) andmebaasi, otsisin mikroRNAde jaoks välja platsentas ekspresseeruvad geenid, mis ennustatavalt omavad kirjeldatud mikroRNAde seondumiskohti. MikroRNAdele, millele andmebaasid ennustasid vähe sihtmärk-geene, otsisin kirjandusest juurde varasemates uurimistöodes tuvastatud sihtmärk-geene. mikroRNA sai välja valitud, kui omas sihtmärk-geene, mis varajasemalt olid kinnitatud eksperimentaalselt ning kattusid osaliselt nimekirjas olevate teiste mikroRNA sihtmärkidega.

3.3. Rakuliini katsedisain

Rakuliini katseteks kasutasin trofoblasti JEG-3 rakuliini. Rakuliini kasvatasin RPMI 1640 (Mediatech) kasvu söötmes, kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS) (GE Healthcare), 100U/l penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (SmartMedia). Rakud külvasin tihedusega 6×10^6 raku/ml 12-kannulisele kasvuplaadile. MikroRNA *mimic*'ite (Ambion) transfektsiooniks kasutasin Siport NeoFX (Ambion) transfektsiooni reagenti. Pilootkatses kasutasin kuuest väljavalitud mikroRNA-de nimekirjast kolme (*mir-144*, *mir-210*, *mir-96*), mis on varasemates uurimistöodes paremini uuritud (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2010). Uurimaks,

kuidas mikroRNA *mimic*'id mõjutavad JEG-3 rakuliinis geeniekspressiooni, pidin algselt tuvastama, milline on uuritavate geenide algne ekspressioonitase JEG-3 rakuliinis, mida kasutan katseteks, näitamaks kas ja kuidas mõjutavad katseks kasutatud reagensid nende geenide ekspressiooni. Sooritatud katsed on esitatud tabelis 5. Kõiki JEG-3 rakuliini kasvukeskkonna tingimusi kontrollisin kolmes kasvukannus.

Mimic'i transfektsiooni tootjapoolne protokoll:

1. Kasvatelt rakkudelt eemaldada sööde
2. Pesta PBS-ga (8-9 ml) ja seejärel eemaldada PBS rakkudelt
3. Lisada rakkudele 1 ml trüpsiin, asetada rakud 37°C juurde ja oota 5 minutit
4. Trüpsiiniga tassile lisada 4 ml söödet
5. Rakud tõsta 15 ml tuubi, tsentrifugida 5 min 200 g ja eemaldada sööde
7. Lisada 4 ml söödet ning suspendeerida korralikult, aga rahulikult läbi
8. Määrata rakkude arv ning lahjendada kuni on saavutatud soovitud kontsentratsioon
9. Lahjendamiseks kasutada siPORT NeoFX Opti-MEM I lahust ja inkubeerida 10 min toatemperatuuril, (segada kokku siPORT 3 µL + Opti-MEM 47 µL, (50 µL kokku))
10. Lahjendada *mimic* Opti-MEM lahusega ja inkubeeri 10 min toatemperatuuril (segada kokku *mimic* 10 µM 3 µL + Opti-MEM 47 µL, (50 µL kokku))
11. Segada kokku lahjendatud *mimic* ja lahjendatud siPORT, inkubeeri 10 min toatemperatuuril ja kanda plaadile
12. Kanda rakud transfektsiooni segule peale, segada plaati rahulikult liigutades. Kanna kanda 0.9 ml söödet+rakud
13. Inkubeerida transfekteeritud rakke normaaltingimustes
14. Eemaldada rakud 8-72 h hiljem kui transfektsioon on mõjunud. Kui rakkude keskkond hakkab mõjuma toksiliselt, vahetada sööde aga mitte enne 4 h

Tabel 5. JEG-3 rakuliiniga sooritatud katsete variatsioonid.

	Katse 1	Katse 2	Katse 3	Katse 4	Katse 5
Rakuliin	JEG-3	JEG-3	JEG-3	JEG-3	JEG-3
Rakkude tihedus külvamisel	0.1x10 ⁶ rakku/ml	6x10 ⁶ rakku/ml 9x10 ⁶ rakku/ml	8x10 ⁶ rakku/ml	7.5x10 ⁶ rakku/ml	5.5x10 ⁶ rakku/ml
Kasvu aeg	24 h	24 h	24 h	24 h ja 48 h	48 h
Kasvusööde	RPMI 1460 sööde, 5% FBS ¹ , antibiootikumid	RPMI 1460 sööde, 5% FBS ¹ , antibiootikumid	RPMI 1460 sööde, 5% FBS ¹ , antibiootikumid	RPMI 1460 sööde, 5% FBS ¹ , antibiootikumid	RPMI 1460 sööde, 5% FBS ¹ , antibiootikumid
Lisati kasvukannu		3 µL H ₂ O + 3 µL Siport	3 uL <i>mimic</i> ² (30nM)* + 3 µL Siport	Kas 3, 6, 9 µL <i>mir-210 mimic</i> 'iga (vastavalt 30 nM, 60 nM, 90 nM) ³ ja vastavalt 3, 6, 9 µL Siporti	9 µL <i>mimic</i> ² (90 nM) ³ + 9 µL Siport. 3, 6, 9 uL Siport
Eesmärk	JEG-3 rakuliini geeniekspressiooni määramine	Külvi tiheduse optimeerimine	Tootjapoolse protokoll katsetamine	<i>mimic</i> 'i koguse optimeerimine	<i>mimic</i> 'ite mõju testimine ja Siporti mõju kontrollimine

¹FBS-veise looteserum (*fetal bovine serum*); Siport - Siport NeoFX transfektsiooni reagent

²*mimic*- katses kasutatud mikroRNAde *mimic*, kas *mir-210*, *mir-144*, *mir-96*

³*mimic*'i lõppkontsentratsioon

3.4.cDNA süntees ja RT-qPCR

Rakuliinist eraldasin RNA NucleoSpin miRNA kitiga (Macherey-Nagel), kasutades tootjapoolt soovitatud protokollit, ning cDNA sünteesisin SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix kitiga (Invitrogen). Ekspressioonitaseme tuvastamine toimus RT-qPCRi (*Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) abil, kasutades Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR masinat. RT-qPCRi protokolliks kasutasin Solise 5x HOT FIREpol EvaGreen qPCR mix Plus (ROX) polümeraasi ning tootjapoolset protokollit (Solis Biodyne).

RT-qPCRiks kasutasin enda disainitud praimereid. Disainiks kasutasin NCBI Primer-Blast programmi (Ye *et al.*, 2012), praimerite järjestused on esitatud tabelis 6.

RT-qPCRi ühe 10 µL reaktsiooni protokolliks kasutatud PCR segu (reaktsioonisegu kokku 10 µl), sulgudes on välja toodud reagentide lõppkontsentratsioon:

- EvaGreen polümeraas 2 µL (1x)
- Edaspidist praimerit 0,25 µL (100-200 nM)
- Vastassuunalist praimerit 0,25 µL (100-200 nM)
- cDNA 0,5 µL (0,001-2 ng/µl)
- H₂O 7 µL (kuni reaktsioonisegu lõppmahuni)

7900HT Fast Real-Time PCR masina protokoll:

Algne denaturatsioon	95 °C	15 min
40 tsüklit		
Denaturatsioon	95 °C	30s
Praimerite seondumine	60 °C	30s
Ekstensioon	72 °C	30s

Tabel 6. Uuritava 6 mikroRNAle väljavalitud sihtmärk-geenide praimerpaarid

Geeni nimi	Edaspidine praimer	Vastassuunaline praimer
CCND1	5'-TCCTGTGCTGCGAAGTGGAA-3'	5'-TTCTGTTCTCGCAGACCTCCA-3'
DOT1L	5'-ACCAGACTGACCAACTCGCA-3'	5'-AAATCCTAGTTACCTCCAACTGTGC-3'
EFNA3	5'-CCTGCACTGGAAGTGTCTGA-3'	5'-AAAGTCTTCCAGCACGTTGA-3'
FBLN1	5'-GGCCGCAACTGCCAAGACATT-3'	5'-TGGTGGGGAAAGAGAGGTGGT-3'
FOXO1	5'-TGCCCAACCAAAGCTTCCCA-3'	5'-GTGTAACCTGCTCACTAACCTCA-3'
FOXO3	5'-TGTTGGTTTGAACGTGGGGA-3'	5'-TGTCCACTTGCTGAGAGCAG-3'
HDAC4	5'-GCCTCTGTTCAACTTGTGGG-3'	5'-GTCTCGGCCAGAAAGTCCAT-3'
HNRNPH1	5'-CAGTTCAGCGACCACGTTTGT-3'	5'-CTCGCCACTTGGTCTGCCTT-3'
HSD17B1	5'-AGCCTCTCCCCACAGTCTCA-3'	5'-CGTGGCATACTTTGAAGCTCT-3'
IPMK	5'-ACGGGAAGGACAAAGTGGGTAT-3'	5'-AATCGTTTGGTGCAGTGGGA-3'
ISCU	5'-CACTGCTCCATGCTGGCTGA-3'	5'-TGCACAGCAGGTGGGAAACA-3'
ITGA5	5'-CCAAGACTGGCCGTGTGGTT-3'	5'-GGTTCCTTTGGGCACACCA-3'
KRAS	5'-AGACTCCTGGCTGTGTGAAAA-3'	5'-CTAACAGTCTGCATGGAGCAGG-3'
KRT80	5'-CAGCTGAAGAAGGACCTGGATGC-3'	5'-TTCACCTCCTCCACGATGCC-3'
LEP	5'-ACCCTGTGCGGATTCTTGTG-3'	5'-TGAAGTCCAAACCGGTGACT-3'
LRRC8A	5'-CGGCCAACCGGATCGAGAC-3'	5'-CAGGTCTCCTCCACCACCA-3'
MCM4	5'-GCCTTTCCACGGTACTCCGA-3'	5'-ACCTGGCATCCTCACTCCGA-3'
NRIP1	5'-TGA CTGAAGGAGGACAGGGAA-3'	5'-CAGTCTGACCACAGTGCTGAT-3'
PRKD3	5'-GGACTGAAATGTGAAGGCTGTGGA-3'	5'-AGAGGCCGGGTCCTGGTAAA-3'
PTEN	5'-GGCACAAGAGGCCCTAGATT-3'	5'-ACAAACTGAGGATTGCAAGTTCC-3'
RDX	5'-GCATGACGACAAGTTAACACCT-3'	5'-TCAGGCTTCCTTCTTCGCAT-3'

RECK	5'-TGCCCAGAGACAATGGTTGAAA-3'	5'-GCCTAAGCCAACCCAGCCAT-3'
RHOA	5'-ATGAAGCAGGAGCCGGTGAAA-3'	5'-TCCATGTACCCAAAAGCGCCAA-3'
SASH1	5'-GCATCGGGTTTCTCCACTTCCA-3'	5'-ATGACCTGGCGCAGCAGTAT-3'
SHMT2	5'-TCTTTGTTTTGGGCGGCTCG-3'	5'-TCGGCTGCAGAAGTTCTCTGA-3'
SIN3B	5'-TGCAGCTCGTCAGCCCATTT-3'	5'-TCCAATGGTCAAGCTCCTTGCAG-3'
STMN1	5'-GGTTCCCCATTGTCTGAAGGGA-3'	5'-TGGGATAAGGAAAGTCCTGCCG-3'
TAGLN2	5'-TGGACCTCTGGGAAGGAAAGAACA-3'	5'-TTGCCCTCTTGCAGCTGGTTAT-3'
UBC	5'-AGTAGTCCCTTCTCGGCGAT-3'	5'-GACGATCACAGCGATCCACA-3'

3.5. Andmeanalüüs

MikroRNAde andmebaaside, TargetScani (Grimson *et al.*, 2007), Miranda (Betel *et al.*, 2008) ja MirTarBase Hsu *et al.*, 2014), failidest mikroRNAde ja geenide väljafiltreerimiseks kasutasin enda kirjutatud python (3.3) skripti.

SDS-i 2.4 (Applied Biosystems) programmi kasutasin geenide RT-qPCRi standardkõverate analüüsimiseks, millega määrasin RT-qPCRiks kasutatava cDNA koguse. Hiljem kasutasin SDS programmi RT-qPCRi toorandmete standardiseerimiseks sooritatud katsete vahel. RT-qPCR andmete normaliseerimiseks kasutasin *UBC* geeni, mis on platsentas stabiilse ekspressiooniga nii tüsistusteta kui ka preeklampilise raseduse korral ning on varasemates preeklampsia geeniekspressiooni uuringutes kasutatud kontroll-geenina (Söber *et al.*, avaldamata andmed).

Tulemuste analüüsimiseks kasutasin T-testi, usalduspiiriga 95%.

Trofoblasti JEG-3 geeniekspressiooni profiili võrdlemiseks *REPROMETA* valimist pärit RNAseqi saadud geeniekspressiooni profiiliga, kasutasin R-is lineaarset regressiooni.

4. TULEMUSED

4.1. Olulisemad preeklampsiaga seotud mikroRNAd

REPROMETA valimist kasutati mikroRNA sekveneerimiseks 16 platsentat, millest 8 pärines tuisistusteta rasedusest ja 8 preeklampsia juhtumitest. Platsenta mikroRNade sekveneerimisel miRseq meetodiga saadi informatsioon mikroRNade ekspresioonitasemete kohta tuisistusteta rasedusest pärit platsentas ja preeklamptilises platsentas. MikroRNade ekspresiooniandmete põhjal, diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNade leidmiseks, kasutati kahte erinevat R-i paketti: DESeq (Anders ja Huber, 2010) ja DESeq2 (Love *et al.*, 2014). Käesolevas uuringus defineerisin mikroRNade diferentsiaalse ekspresiooni juhul kui preeklamptilises platsentas oli mikroRNade suhe 1,19 korda erinev tuisistusteta platsenta ekspresioonist (Söber *et al.*, avaldamata andmed). 43 diferentsiaalse ekspresiooniga mikroRNade sihtmärk-geenide tuvastamisega leiti 12 mikroRNAd, mis võivad omada olulist rolli platsenta genoomi funktsioonis ja raseduse kulgemise määramisel. Lisaks võtsin fookusesse ka platsentas suhteliselt madala ekspresiooniga *mir-1*, mis on varasemates uuringutes tuvastatud kui preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseeruv mikroRNA. Tabelis 7 on esitletud väljavalitud 13 mikroRNA DESeq ja DESeq2 analüüsi tulemused. Väljavalitud 13 mikroRNAle otsisin juurde nende sihtmärk-geenid, mis on platsentas ekspresseerunud.

Tabel 7. miRseqi tulemuste põhjal diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAd. Kõigi mikroRNade seast valiti välja DESeq ja DESeq2 programmiga 13 (Sõber *et al.*, avaldamata andmed).

mikroRNA	DESEQ				DESEQ2			
	Ekspressiooni-tase ¹	Ekspressiooni-tasemete suhe ²	P-väärtus	Kohandatud p-väärtus ³	Ekspressiooni-tase ⁴	Ekspressiooni-tasemete suhe ²	P-väärtus	Kohandatud p-väärtus ⁵
<i>mir-96</i>	127,78	1,99	0,0028	0,33	128,57	2	5,97e-10	1,96e-07
<i>mir-210</i>	826,93	2,79	0,0001	0,04	831,77	1,95	1,14e-07	1,88e-05
<i>mir-144</i>	3822,14	2,62	0,0035	0,33	3856,80	1,87	2,03e-07	2,22e-05
<i>mir-31</i>	817,63	2,19	0,0000	0,03	821,44	1,84	3,11e-07	2,55e-05
<i>mir-520a-3p</i>	16697,11	1,83	0,0038	0,33	16801,86	1,83	8,88e-07	5,82e-05
<i>mir-193b</i>	7453,93	2,55	0,0001	0,03	7500,21	1,80	2,09e-06	0,00011
<i>mir-149</i>	5314,90	1,52	0,0763	0,92	5344,73	1,59	5,10e-06	0,00021
<i>mir-193a-3p</i>	154,66	2,64	0,0113	0,53	156,08	1,58	6,52e-06	0,00024
<i>mir-520a-5p</i>	6261,00	1,52	0,0543	0,88	6293,93	1,56	8,51e-06	0,00028
<i>mir-32</i>	393,74	1,60	0,0209	0,69	396,55	1,53	1,77e-05	0,00053
<i>mir-1285</i>	109,49	1,66	0,0358	0,88	110,18	1,48	3,15e-05	0,00080
<i>mir-33</i>	78,18	1,83	0,0035	0,33	78,76	1,43	0,00014	0,00261
<i>mir-1</i>	34,34	2	0,0050	0,36	AP	AP	AP	AP

¹ DESeq analüüsil saadud keskmine normaliseeritud lugemite arv.

² Tüsistusteta ja preeklampsiaga rasedate gruppide vaheline ekspresiooni tasemete suhe.

³ Kohandatud P-väärtus mitmese testimise jaoks.

⁴ DESeq2 analüüsil saadud keskmine normaliseeritud lugemite arv.

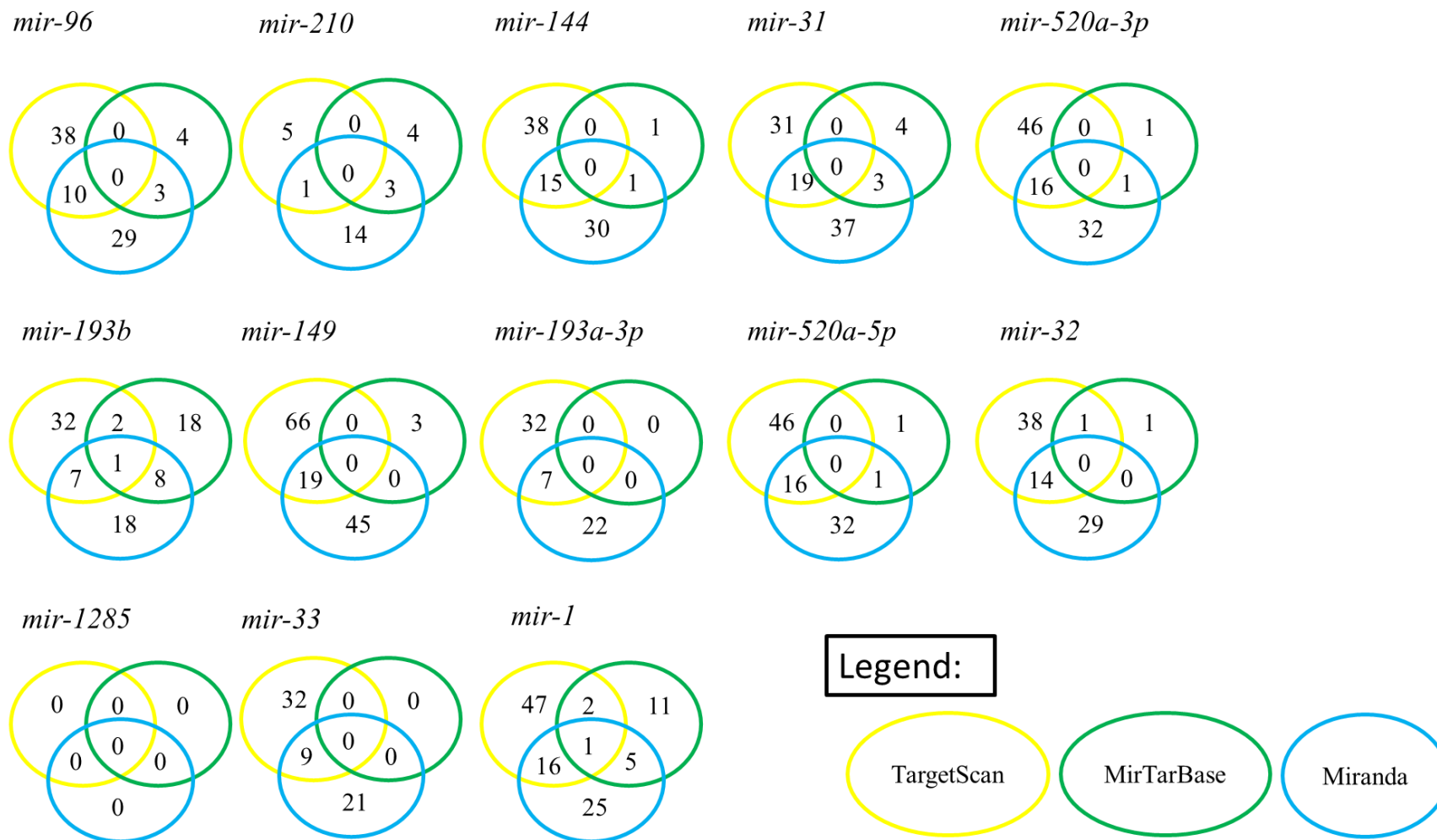
⁵ Kohandatud P-väärtus mitmese testimise jaoks.

AP-andmed puuduvad

4.2. Andmebaaside tulemused

Tuvastamiseks potentsiaalselt preeklampsias olulisi mikroRNAsid ja nende võimalikke sihtmärk-geene, leidsin andmebaaside ja kirjanduse põhjal võimalikud sihtmärk-geenid analüüsis tuvastatud 13 mikroRNAle. Kokku kasutasin kolme mikroRNA sihtmärgi andmebaasi: TargetScan (Grimson *et al.*, 2007), Miranda (Betel *et al.*, 2008) ja MirTarBase'i (Hsu *et al.*, 2014). Andmebaasid erinevad üksteisest sihtmärk-geeni tuvastamise meetodite poolest. TargetScan ja Miranda on mudeli põhised, ennustades sihtmärk-geene järjestuse ja ortoloogia põhjal. MirTarBase näitab mikroRNA sihtmärk-geene, mis on varajasemalt eksperimentaalselt kinnitatud.

Andmebaasid ei suutnud antud 13 mikroRNAle võrdse edukusega sihtmärk-geene tuvastada (joonis 5). *Mir-1285-le* ei tuvastanud üksi andmebaas sihtmärk-geene. *Mir-210-le* tuvastati teiste mikroRNAdega võrreldes vähem sihtmärk-geene, samas kirjandusest võib leida geenide *HSD17B1* (Ishibashi *et al.*, 2012) ja *KCMF1* (Luo *et al.*, 2014) katseliselt kinnitatud tõendeid mikroRNA *mir-210* sihtmärk-geeniks olemise kohta, mida üksi kasutatud andmebaas ei sisaldanud. TargetScani ja Miranda vahel esines suurem ülekattuvus ennustatud geenide osas, kui TargetScan ja MirTarBase'i või Miranda ja MirTarBase'i puhul (tabel 8). See näitab, et matemaatilise mudeli põhised ennustused kasutavad andmebaasid saavad sarnaseid tulemusi, kuid omavad siiski suurt variatsiooni. MirTarBase, milles on esitatud erinevate katseliste meetodite poolt kinnitatud mikroRNAde sihtmärk-geenid, omab väiksemat mikroRNA ja sihtmärk-geenide andmete hulka, piirates sellega tulemuste suurust. Ainult kahele mikroRNAle ennustati sama sihtmärk-geen kõigi kolme andmebaasi poolt: *mir-193b* geen *CDC42EP4* ja *mir-1* geen *TKT*.



Joonis 5. MikroRNA sihtmärk-geenide andmebaaside TargetScan (Grimson *et al.*, 2007), MirTarBase'i (Hsu *et al.*, 2014) ja Miranda (Betel *et al.*, 2008) poolt ennustatud platsentas ekspresseeruvate kõrge statistilise skooriga ennustatud sihtmärk-geenide arv. Kollases rõngas asub TargeScani poolt ennustatud geenide arv, rohelises rõngas asub MirTarBase poolt avaldatud sihtmärk-geenide arv ja sinises rõngas on Miranda poolt ennustatud sihtmärk-geenide arv välja valitud kolmeteistkümnele mikroRNAle ning ülekattuvad osades on välja toodud vastavate andmebaaside poolt ülekattunud ennustatud sihtmärk-geenide arvud.

Tabel 8. MikroRNAde andmebaaside, TargetScan (Grimson *et al.*, 2007), Miranda (Betel *et al.*, 2008) ja MirTarBase'i (Hsu *et al.*, 2014), poolt ennustatud ülekattuvad sihtmärk-geenid. Rasvaselt on märgitud kolme andmebaasi poolt ülekattuvad geenid.

mikroRNA	MirTarBase/Miranda	TargetScan/Miranda	MirTarBase/Target-Scan
<i>mir-96</i>	<i>FOXO1, HOXA9, KRAS</i>	<i>CTDSP1, DLX3, GLTSCR1, PRKD3, SIN3B, SLC2A8, SLCO3A1, SYNGR1, TREM1, VIPR1</i>	
<i>mir-210</i>	<i>EFNA3, FGFRL1, ISCU</i>	<i>SIN3B</i>	
<i>mir-144</i>	<i>PTEN</i>	<i>ABCA12, AHDC1, GLTSCR1, IPO13, KCNC4, MAFK, NPHP1, NRIP1, PLEKHA7, PRKD3, RNF44, SLCO3A1, SNCA, ZNF714, ZNF90</i>	
<i>mir-31</i>	<i>DMD, RDX, RHOA</i>	<i>ACAP3, AVPI1, C15orf39, DACT2, DLX4, FAM160B2, FBLN1, GLTSCR1, INADL, KIAA1211, KRT80, OTUD5, PIGT, PRKD3, SIN3B, SPINT1</i>	
<i>mir-520a-3p</i>	<i>CCND1</i>	<i>TEAD3, TKT, VAMP2, AQPEP, C7orf43, CD320, CDHR5, CRTC2, FBLN1, KIAA1522, LDHD, MKNK2, NRIP1, P2RY6, PER1, SASH1, SRCIN1, ZNF512B, ULK1</i>	
<i>mir-193b</i>	<i>CCND1, CDC42EP4, KRAS, LRRC8A, PTEN, SHMT2, STMN1, SYMPK</i>	<i>AQPEP, CDC42EP4, GRB7, NRIP1, PLEKHA5, ST8SIA4, TRIM62</i>	<i>CDC42EP4, CHCHD10</i>
<i>mir-149</i>		<i>AVPI1, BIN2, C10orf54, C15orf39, CRTC2, FAM160B2, FBLN1, LAMC3, LEP, MEN1, P2RY6, PLEKHA5, RHBDF1, SLC2A8, SLCO3A1, SRCIN1, ST8SIA4, TEAD3, UPK1B</i>	
<i>mir-193a-3p</i>		<i>AQPEP, CDC42EP4, GRB7, NRIP1, PLEKHA5,</i>	

<i>mir-520a-5p</i>	<i>CCND1</i>	<i>ST8SIA4, TRIM62</i> <i>AQPEP, C7orf43, CD320,</i> <i>CDHR5, CRTC2, FBLN1,</i> <i>KIAA1522, LDHD,</i> <i>MKNK2, NRIP1, P2RY6,</i> <i>PER1, SASH1, SRCIN1,</i> <i>ZNF512B, ULK1</i>	
<i>mir-32</i>		<i>ADM, CHCHD10, DPPA4,</i> <i>PTGES2</i> <i>GAA, INADL, KCNC4,</i> <i>KIAA1211, LMO2,</i> <i>PLEKHA5, RFX1, RNF44,</i> <i>SLC9A1, ZNF512B,</i> <i>ZNF90</i>	
<i>mir-1285</i> <i>mir-33b</i>		<i>C17orf103, CDR2L,</i> <i>DNAH11, KIAA1211,</i> <i>PIM3, PLEKHA5, SASH1,</i> <i>SLC16A1, ZNF750</i>	
<i>mir-1</i>	<i>HDAC4, LRRC8A,</i> <i>PIGT, TAGLN2, TKT</i>	<i>ABCA12, BMP1, C7orf43,</i> <i>KIAA1522, TKT</i> <i>CDR2L, FAM160B2,</i> <i>PION, PLEKHA5,</i> <i>PLEKHA7, PRKD3,</i> <i>RNF44, SLCO3A1, SP2,</i> <i>SSH3, TKT, TNPO2,</i> <i>VAMP2</i>	

4.3. Asukoht genoomis

Samuti on oluliseks faktoriks mikroRNA asukoht genoomis ning kuulumine mikroRNA perekonda, mis näitab, millist funktsiooni mikroRNA rakus omab. 19. ja 14. kromosoomis asuvad platsenta-spetsiifiliste mikroRNAde klastrid. Uurimaks, kas preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseeruvaid mikroRNAsid transkripteerivad geenid paiknevad genoomis lähestikku, tuvastasin nende asukohta (tabel 9) miRBase andmebaasi andmete abil (versioon 21) (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). MikroRNAd on lisaks lahterdatud perekondadesse nende eeldatava funktsiooni järgi rakus ning struktuuri alusel. Väljavalitud 13 mikroRNA seas esines gene, mis on pärit samast kromosoomist, näiteks: *mir-1285* ja *mir-96* geenid asuvad kromosoomil 7 ning *mir-32* ja *mir-31* geenid asuvad kromosoomil 9. Kromosoomil 17 asub kolm mikroRNA geeni *mir-193a-3p*, *mir-144*. *mir-33b*. Huvi pakuvad veel mikroRNAd *mir-520a-3p* ja *mir-520a-5p*, mis on pärit samast mikroRNA transkriptist kromosoomil 19. MikroRNAde geenide asukoht võib olla mõjutavaks faktoriks mikroRNA ekspresseerumisel ning funktsioneerimisel.

Tabel 9. Preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde kuulumine mikroRNA perekondadesse ning nende geenide asukoht genoomis. Tabel on koostatud miRBase andmebaasi andmete alusel (versioon 21) (Griffiths-Jones *et al.*, 2008).

mikroRNA	mikroRNA perekond	Asukoht genoomis	Asukoht genoomi versioonis GRCh38 ¹	Ahel
<i>mir-149</i>	mir-149	Chr2	240456001-240456089	+
<i>mir-1285</i>	mir-1285	Chr7	92204015-92204098	-
<i>mir-96</i>	mir-96	Chr7	129774692-129774769	-
<i>mir-32</i>	mir-32	Chr9	109046229-109046298	-
<i>mir-31</i>	mir-31	Chr9	21512115-21512185	-
<i>mir-210</i>	mir-210	chr11	568089-568198	-
<i>mir-193b</i>	mir-193	chr16	14303967-14304049	+
<i>mir-193a-3p</i>	mir-193	chr17	31559996-31560083	+
<i>mir-144</i>	mir-144	chr17	28861533-28861618	-
<i>mir-33b</i>	mir-33	chr17	17813836-17813931	-
<i>mir-520a-5p</i>	mir-515	chr19	53690881-53690965	+
<i>mir-520a-3p</i>	mir-515	chr19	53690881-53690965	+
<i>mir-1</i>	mir-1	chr20	62554306-62554376	+

¹ GRCh38-Inimese genoomist koostatud versioon 38

4.4. Väljavalitud 6 mikroRNA sihtmärk-geenid ja ekspressioon

DESeq (Anders ja Huber, 2010) ja DESeq2 (Love et al., 2014) programmi poolt ennustatud 13 preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNA seast valisin välja kuus: *mir-1*, *mir-31*, *mir-96*, *mir-144*, *mir193b*, *mir-210*, mida kasutasin edasistes katsetes. Väljavalitud kuus mikroRNAd omasid katseliselt valideeritud või kahe andmebaasi poolt ennustatud ülekattuvaid sihtmärk-geene, mis on platsentas ekspresseerunud. Nendele kuuete mikroRNAle valisin välja neli kuni viis sihtmärk-geeni iga mikroRNA jaoks ning lisaks geenid, mis omasid kuue mikroRNA seas sihtmärk-järjestust mitme mikroRNA puhul. Geeni valimisel osutus oluliseks peale mikroRNA seonduskohtade arv geeni transkriptil ka selle funktsioon raku elutegevuses. Tabelis 10 on esitatud TargetScani (Grimson *et al.*, 2007) ja Miranda (Betel *et al.*, 2008) poolt ennustatud mikroRNA sihtmärkide arv geeni transkriptil ning MirTarBase (Hsu *et al.*, 2014)

andmebaasi poolt esitatud katseliselt tuvastatud mikroRNA ja geeni vaheline seos. Andmebaasi tulemustest võib näha, et need ei lange täielikult kokku, TargetScani ja Miranda tulemused on rohkem ülekattuvad ning ennustatavate sihtmärk-geenide arv on suurem. MirTarBase'i tulemused samas tagavad suurema kindluse sihtmärgi olemasolu kohta.

MikroRNAd reguleerivad geenide ekspressioonitaset alla, samas ei ole geenide ekspressioonitase püsiv, vaid on ajas muutuv. Raseduse kulgemise jooksul muutuvad geenide ekspressioonitasemed märgatavalt. Tabelis 11 on esitatud geenide ekspressioonitase esimesel ja teisel trimestri ning lõpuni kulgenud tüsistusteta ning preeklamptilise rasedusel korral. Kui võrdleme omavahel geenide ekspressioone raseduse kulgedes, on näha, et need ei püsi konstantsetena, vaid muutuvad. Võrreldes BEWO rakuliini geenide ekspressioone eri trimestrite omadega, võib leida geenide gruppe, kus ekspressioonitasemed on sarnased, aga ei lange kokku ühegi trimestri jooksul. Geeniekspressiooni erinevused annavad aimu rakuliini mudelina kasutamise piirangute kohta.

Katsetes kasutatud geenid *FBLN1*, *HNRNPH1*, *KRT80*, *MCM4*, *PRKD3* ja *SIN3B* omasid mitme mikroRNA seonduskohta, nende geenide kasutamine annab võimaluse tulevikus uurida, kuidas mikroRNAd koos mõjutavad geeniekspressiooni (joonis 6).

Varasemalt on uuritud mõningate väljavalitud kuue mikroRNA ja nende sihtmärk-geenide vahelist seost. MikroRNAd omavad suurt rolli geenide ekspressiooni mõjutamises. Varasemates uuringutes on väljavalitud kuus mikroRNAd seostatud mitmete erinevate kasvajatüüpidega. Tabelis 11 on välja toodud erinevad katsed, millega on näidatud mikroRNAd rolli erinevates kudedes.

Tabel 10. Katseks valitud kuue mikroRNA sihtmärk-geenid, mille abil kontrollin mikroRNA *mimic*'i mõju JEG-3 rakuliini geeniekspressioonile (TargetScan (Grimson et al., 2007), Miranda (Betel et al., 2008) ja MirTarBase'i (Hsu et al., 2014)).

Geeni nimi	Geeni ensambli kood	mikroRNA	TargetScan\	Sihtmärk-transkriptid ²	mikroRNA seonduskoha tüüp ja skoor ⁶		
			MirTarBase\ Miranda ¹		8mer ³	7mer-m8 ⁴	7mer-1a ⁵
<i>HDAC4</i>	ENSG00000068024	mir-1	3\0\1	ENST00000345617		0.82	0.77
<i>IPMK</i>	ENSG00000151151	mir-1	2\0\0	ENST00000373935	0.74		0.17
<i>LRRC8A</i>	ENSG00000136802	mir-1	3\4\1	ENST00000372600	0.80		
<i>MCM4</i>	ENSG00000104738	mir-1	0\1\0				
<i>TAGLN2</i>	ENSG00000158710	mir-1	3\6\1	ENST00000368097	0.71		
<i>KRT80</i>	ENSG00000167767	mir-144	2\0\1	ENST00000313234			0.00
<i>NRIP1</i>	ENSG00000180530	mir-144	1\0\1	ENST00000318948		0.00	
<i>PTEN</i>	ENSG00000171862	mir-144	1\3\3	ENST00000371953		0.52	
<i>SASH1</i>	ENSG00000111961	mir-144	1\0\2	ENST00000367467			0.31
<i>CCND1</i>	ENSG00000110092	mir-193b	1\6\2	ENST00000227507	0.55		
<i>HNRNPH1</i>	ENSG00000169045	mir-193b	0\1\0				
<i>LRRC8A</i>	ENSG00000136802	mir-193b	3\1\1	ENST00000259324		0.38	
<i>MCM4</i>	ENSG00000104738	mir-193b	0\2\1				
<i>PRKD3</i>	ENSG00000115825	mir-193b	2\0\1	ENST00000234179		0.08	0.00
<i>SHMT2</i>	ENSG00000182199	mir-193b	2\4\2	ENST00000414700		0.08	0.00
<i>STMN1</i>	ENSG00000117632	mir-193b	3\1\1	ENST00000357865		0.08	
<i>DOT1L</i>	ENSG00000104885	mir-210	1\0\1	ENST00000398665		0.07	
<i>EFNA3</i>	ENSG00000143590	mir-210	1\4\1	ENST00000368408		0.24	
<i>HSD17B1</i>	ENSG00000108786	mir-210					
<i>ISCU</i>	ENSG00000136003	mir-210	2\6\1	ENST00000311893	0.00		

<i>SIN3B</i>	ENSG00000127511	mir-210	1\0\1	ENST00000379803		0.07	
<i>DMD</i>	ENSG00000198947	mir-31	2\4\1	ENST00000357033			0.17
<i>FBLN1</i>	ENSG00000077942	mir-31	2\0\1	ENST00000327858		0.21	0.00
<i>ITGA5</i>	ENSG00000161638	mir-31	1\4\1	ENST00000293379			0.17
<i>KRT80</i>	ENSG00000167767	mir-31	4\0\4	ENST00000394815	0.46		
<i>MCM4</i>	ENSG00000104738	mir-31	0\1\1				
<i>RDX</i>	ENSG00000137710	mir-31	1\4\0	ENST00000343115			0.17
<i>RHOA</i>	ENSG00000067560	mir-31	0\4\2				
<i>SASH1</i>	ENSG00000111961	mir-31	1\0\0	ENST00000367467			0.00
<i>SIN3B</i>	ENSG00000127511	mir-31	3\0\3	ENST00000379803		0.00	
<i>FBLN1</i>	ENSG00000077942	mir-96	2\0\1	ENST00000327858			0.00
<i>FOXO1</i>	ENSG00000150907	mir-96	2\4\2	ENST00000379561	0.95		
<i>FOXO3</i>	ENSG00000118689	mir-96	3\4\3	ENST00000406360		0.00	0.74
<i>KRAS</i>	ENSG00000133703	mir-96	2\5\2	ENST00000311936		0.86	
<i>LEP</i>	ENSG00000174697	mir-96	2\0\2	ENST00000308868		0.00	0.00
<i>PRKD3</i>	ENSG00000115825	mir-96	2\0\2	ENST00000234179			0.00
<i>RECK</i>	ENSG00000122707	mir-96	1\0\1	ENST00000377966			0.74
<i>SIN3B</i>	ENSG00000127511	mir-96	3\0\3	ENST00000379803	0.25	0.55	

¹Vastavalt TargetScani, MirTarBase'i ja Miranda poolt ennustatud mikroRNA seonduskohtade arv.

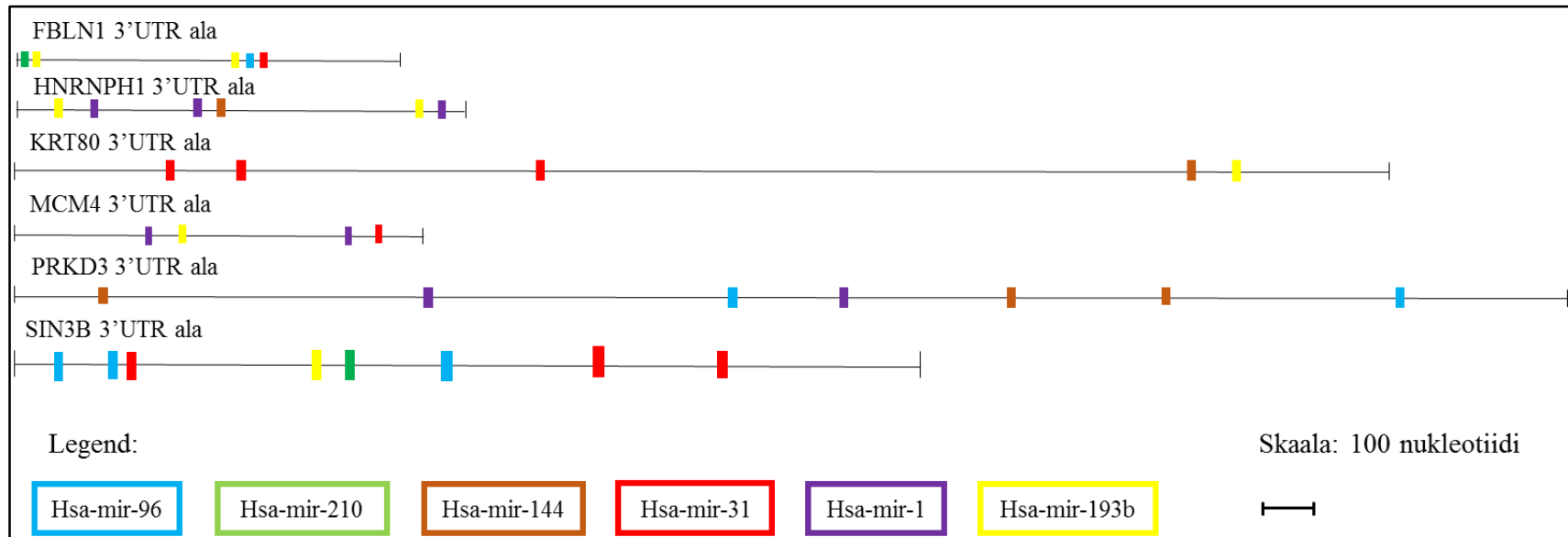
²TargetScanni poolt ennustatud transkript, millel asub mikroRNA seonduskoht.

³8mer - TargetScani poolt kasutatav konserveerituse näitaja, mis näitab seondustüübi olemasolu tõenäosust. Täiskasvanud mikroRNA seondusjärjestuse 2-8 nukleotiidid, millele järgneb nukleotiid A, on komplementaarne mRNA 3'UTRil asuva järjestusega.

⁴7mer-m8 - TargetScani poolt kasutatav konserveerituse näitaja, mis näitab seondustüübi olemasolu tõenäosust. Täiskasvanud mikroRNA seondusjärjestuse 2-8 nukleotiidid on komplementaarne mRNA 3'UTRil asuva järjestusega.

⁵7mer-1A - TargetScani poolt kasutatav konserveerituse näitaja, mis näitab seondustüübi olemasolu tõenäosust. Täiskasvanud mikroRNA seondusjärjestuse 2-7 nukleotiidid, millele järgneb nukleotiid A, on komplementaarne mRNA 3'UTRil asuva järjestusega.

⁶Andmebaas TargetScan poolt ennustus skoor mikroRNA seonduskohale, skaalas 0-1, kus 1 on kõige suurema tõenäosusega esinev seonduskoht.



Joonis 6. MikroRNA seonduskohad geenidel, mis omavad mitut mikroRNA sihtmärk-järjestust. MikroRNA seonduskohad geenide 3'UTR'is on esitatud eri värvi kastidega (täpsemalt legendis). Geenide 3'UTR pikkused nukleotiidides: *FBLN1* 688, *HNRNPH1* 781, *KRT80* 2401, *MCM4* 730, *PRKD3* 2672, *SIN3B* 1626. Joonis on koostatud Miranda (Betel et al., 2008) andmebaasi alusel.

Tabel 11. Sihtmärk-geenide geeniekspressiooni tasemed, mida kasutatakse mikroRNAde *mimic*'ite mõju määramiseks. Geenid on esitatud nende nimede ja Ensembli koodiga. Esitatud on *REPROMETA* projektist pärit esimese ja teise trimestri, tüsistusteta ja preeklampsilise raseduse, BEWO rakuliini ning Protein Atlase (versioon 13, väljastatud 11.6.2014) (Uhlen et al., 2010) ja Expression Atlasest (väljastatud 13.10.2014) (Kapushesky et al., 2010) pärit platsentas esinevate geenide ekspressioon FPKMides.

Geen	Geeni ensambli kood	RNA ekspressioon FPKM ⁷ ides					Expression Atlas ⁷	
		I tri ¹	II tri ²	norm ³	PE ⁴	BeWo ⁵	Protein Atlas ⁶	
<i>CCND1</i>	ENSG00000110092	5.70	16.19	17.04	15.46	74.20	61.00	kõrge
<i>DMD</i>	ENSG00000198947	4.52	5.00	4.22	5.23	5.2	15	madal
<i>DOT1L</i>	ENSG00000104885	3.82	5.31	3.93	2.74	34.4	7	madal
<i>EFNA3</i>	ENSG00000143590	0.32	0.25	0.16	0.23	2.7	2	madal
<i>FBLN1</i>	ENSG00000077942	285.48	380.71	597.79	457.41	311.2	553	kõrge
<i>FOXO1</i>	ENSG00000150907	1.79	3.68	2.81	3.65	7.9	11	madal
<i>FOXO3</i>	ENSG00000118689	5.85	5.84	5.63	4.84	9.2	15	madal
<i>HDAC4</i>	ENSG00000068024	4.61	5.91	3.14	3.45	11.1	5	madal
<i>HNRNP1</i>	ENSG00000169045	47.84	52.01	44.49	42.51	504.20	275.00	keskmine
<i>HSD17B1</i>	ENSG00000108786	207.67	204.97	210.82	175.13	181.1	81	kõrge
<i>IPMK</i>	ENSG00000151151	12.48	8.15	6.42	8.29	3.6	8	keskmine
<i>ISCU</i>	ENSG00000136003	14.09	13.28	8.78	8.46	118.5	101	keskmine
<i>ITGA5</i>	ENSG00000161638	65.58	66.82	49.68	103.18	65.1	81	keskmine
<i>KRAS</i>	ENSG00000133703	5.92	6.70	5.60	4.85	49	19	madal
<i>KRT80</i>	ENSG00000167767	3.00	3.59	4.43	1.80	34.40	8.00	madal
<i>LEP</i>	ENSG00000174697	1533.00	17.58	7.70	55.05	1.2	5	madal
<i>LRRC8A</i>	ENSG00000136802	7.01	8.35	10.08	15.17	23.5	23	kõrge

<i>MCM4</i>	ENSG00000104738	9.92	6.79	7.53	5.35	89.8	27	madal
<i>NRIP1</i>	ENSG00000180530	24.84	12.90	12.06	15.12	8.70	11.00	keskmine
<i>PRKD3</i>	ENSG00000115825	9.41	7.04	3.43	5.96	23.90	12.00	kõrge
<i>PTEN</i>	ENSG00000171862	16.17	19.54	22.36	17.30	20.60	25.00	keskmine
<i>RDX</i>	ENSG00000137710	16.55	12.71	20.76	17.09	58.9	39	madal
<i>RECK</i>	ENSG00000122707	0.90	1.56	1.44	1.46	0.4	9	kõrge
<i>RHOA</i>	ENSG00000067560	39.18	31.83	29.59	36.21	203.6	291	keskmine
<i>SASH1</i>	ENSG00000111961	53.73	24.01	12.49	21.01	2.50	20.00	keskmine
<i>SHMT2</i>	ENSG00000182199	2.92	3.20	1.58	2.69	178.40	54.00	keskmine
<i>SIN3B</i>	ENSG00000127511	15.41	18.83	17.02	12.57	55.1	34	madal
<i>STMN1</i>	ENSG00000117632	9.20	8.43	3.97	5.89	148.70	114.00	madal
<i>TAGLN2</i>	ENSG00000158710	62.73	37.00	30.73	43.06	292.7	222	kõrge

¹*REPROMETA* projekti valimist pärit saadud geeniekspressiooni tulemused esimese trimestri platsentadest, FPKMides (*Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped*).

²*REPROMETA* projekti valimist pärit saadud geeniekspressiooni tulemused teise trimestri platsentadest, FPKMides.

³*REPROMETA* projekti valimist pärit saadud geeniekspressiooni tulemused tüsistusteta lõppenud raseduse platsentadest, FPKMides.

⁴*REPROMETA* projekti valimist pärit saadud geeniekspressiooni tulemused preeklampsiaga lõppenud raseduse platsentadest, FPKMides.

⁵Geeniekspressiooni tase Bewo rakuliinis, avaldatud FPKMides Protein Atlase andmete kohaselt.

⁶Geeniekspressioon platsentas, võetud Protein Atlasest, avaldatud FPKMides.

⁷Geeniekspressioon platsentas, võetud Expression Atlasest, väärtus avaldatud teiste kudede suhtes.

Tabel 12. Eelnevalt avaldatud uurimistööd preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde ja platsentas ekspresseeruvate geenide kohta.

Geeni nimi/ Ensembli kood	mikroRNA	viide	mikroRNA roll	Kude/rakuliin
<i>HDAC4</i> / ENSG00000068024	<i>mir-1</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)	Reguleerib lihasraku pooldumist	Lihaskude
	<i>mir-1</i>	(Sluijter <i>et al.</i> , 2010)	Reguleerib lihasrakkude pooldumist ja diferentseerumist südame lihasrakuks	Kardiomüotsüüdi tüvirakk CMPC
<i>TAGLN2</i> / ENSG00000158710	<i>mir-1</i>	(Yoshino <i>et al.</i> , 2011)	Rakujagunemine, apoptoos	Põievähi rakuliin
	<i>mir-1</i>	(Nohata <i>et al.</i> , 2011)	Pidurdab kasvajakude jagunemist	
<i>PTEN</i> / ENSG00000171862	<i>mir-144</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)	Soodustab kurguvähi rakkude pooldumist	Kurguvähi rakud
<i>CCND1</i> / ENSG00000110092	<i>mir-193b</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2010)	<i>Mir-193b</i> üles-reguleerimine mõjub vähi arengule pidurdavalt, tõkestab jagunemist	Melanoomi rakuliin Malme-3m
<i>SHMT2</i> / ENSG00000182199	<i>mir-193b</i>	(Leivonen <i>et al.</i> , 2011)	<i>Mir-193b</i> aeglustab rakuliini kasvu	Rinnavähi rakuliin Mcf-7
<i>STMN1</i> / ENSG00000117632	<i>mir-193b</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2013)	<i>Mir-193b</i> üles-reguleerimine mõjub vähi arengule pidurdavalt, tõkestab jagunemist	Melanoomi rakuliin
<i>EFNA3</i> / ENSG00000143590	<i>mir-210</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2013)	<i>Mir-210</i> maha surumine suurendas rakkude jagunemist	Perifeerse närviraku müoliin kihi kasvaja
	<i>mir-210</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)	Hüpoksia korral on <i>mir-210</i> üles-reguleeritud	Trofoblasti rakuliin JAR

<i>HSD17B1/</i> ENSG00000108786	<i>mir-210</i>	(Ishibashi <i>et al.</i> , 2012)	Hüpoksia korral on <i>mir-210</i> üles-reguleeritud	Trofoblasti rakuliinid BEWO ja JEG-3
<i>ISCU/</i> ENSG00000136003	<i>mir-210</i>	(Chan <i>et al.</i> , 2009)	Hüpoksia korral on <i>mir-210</i> üles-reguleeritud	Inimese kopsuarteri endoteelirakud HPAEC
	<i>mir-210</i>	(Favaro <i>et al.</i> , 2010)	Hüpoksia korral on <i>mir-210</i> üles-reguleeritud	Käärsoole kasvaja rakuliin HCT116
	<i>mir-210</i>	(Muralimanoharan <i>et al.</i> , 2012)	Hüpoksia korral on <i>mir-210</i> üles-reguleeritud	Primaarsed trofoblasti rakud
<i>ITGA5/</i> ENSG00000161638	<i>mir-31</i>	(Valastyan <i>et al.</i> , 2009)	<i>Mir-31</i> ekspressiooni suurendamine reguleeris geeniekspressiooni alla	Kloneeritud konstrukt
	<i>mir-31</i>	(Valastyan <i>et al.</i> , 2009)	<i>Mir-31</i> reguleeris <i>ITGA5</i> geeniekspressiooni, mis mõjus metastaaside tekkele tõkestavalt	Rinnavähi rakud Mda-mb-231
<i>RDX/</i> ENSG00000137710	<i>mir-31</i>	(Valastyan <i>et al.</i> , 2009)	<i>Mir-31</i> ekspressiooni suurendamine reguleeris geeniekspressiooni alla	Kloneeritud konstrukt
	<i>mir-31</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2014)	Madal <i>mir-31</i> vähendab ellujäämist glioblastoomi haigetel	Glioomi rakud
<i>RHOA/</i> ENSG00000067560	<i>mir-31</i>	(Valastyan <i>et al.</i> , 2009)	<i>Mir-31</i> üles-reguleerimine reguleeris geeniekspressiooni alla	Kloneeritud konstrukt
	<i>mir-31</i>	(Valastyan <i>et al.</i> , 2009)	<i>Mir-31</i> reguleeris <i>ITGA5</i> geeniekspressiooni, mis mõjus metastaaside tekkele tõkestavalt	Rinnavähi rakud Mda-mb-231
	<i>mir-31</i>	(Fan <i>et al.</i> , 2012)	<i>Mir-31</i> reguleerib interleukiin-2	Süsteemne

			ekspressiooni, reguleerides <i>RHOA</i> geeni	erütematoosne luupus
<i>FOXO1</i> / ENSG00000150907	<i>mir-96</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2014)	<i>Mir-96</i> ekspressiooni suurendamine suurendab rakkude kasvu	Eesnäärmevähi rakuliin
	<i>mir-96</i>	(Myatt <i>et al.</i> , 2010)	<i>Mir-96</i> ekspressioon vähendab <i>FOXO1</i> ekspressiooni	HEC-1B and Ishiwaka
	<i>mir-96</i>	(GUO <i>et al.</i> , 2012)	<i>Mir-96</i> ekspressioon vähendab <i>FOXO1</i> ekspressiooni	Inimese T24 TCC rakuliin
<i>FOXO3</i> / ENSG00000118689	<i>mir-96</i>	(Li <i>et al.</i> , 2014)	<i>Mir-96</i> üles-ekspressioon suurendab kasvaja kasvu	Kopsuvähi rakud A549, SPC-A-1
<i>KRAS</i> / ENSG00000133703	<i>mir-96</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2010)	<i>Mir-96</i> üles-ekspressioon inhibeerib raku jagunemist	Eesnäärme kasvaja
<i>RECK</i> / ENSG00000122707	<i>mir-96</i>	(Guo <i>et al.</i> , 2014)	<i>Mir-96</i> soodustab kasvaja arengute, reguleerides <i>RECK</i> geeniekspressiooni	Kopsuvähi rakuliin NSCLC

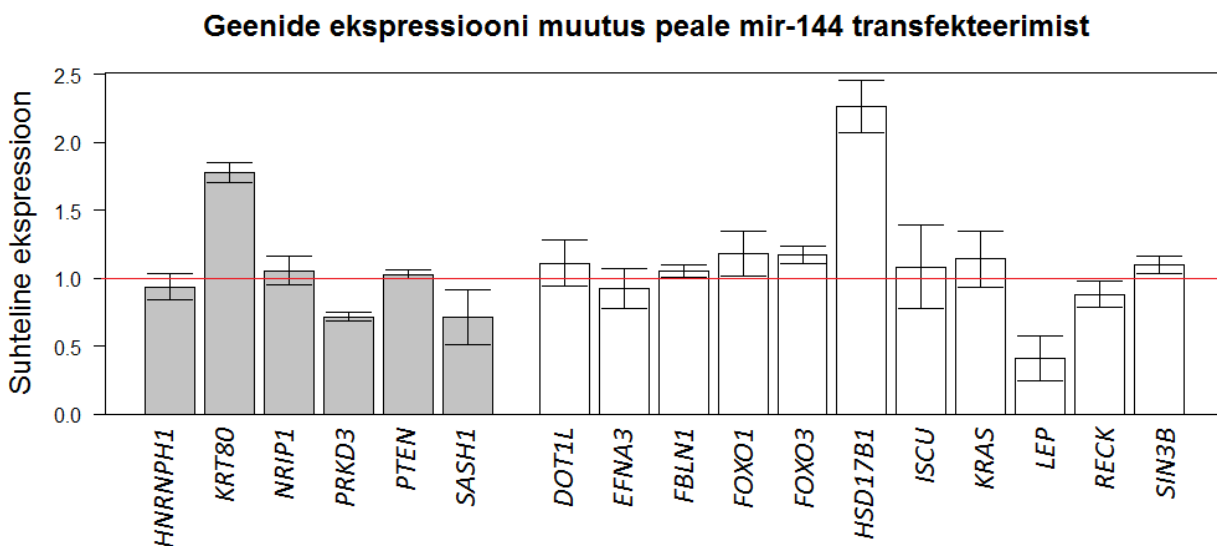
4.5. MikroRNAd *mimic*'ite mõju ennustatud sihtmärk-geenide ekspressioonile JEG-3 rakuliinis

Katsetes transfekterisin mikroRNA *mimic*'eid, *mir-96*, *mir-144* ja *mir-210*, trofoblasti rakuliini. Väljavalitud kolme mikroRNA diferentsiaalne ekspressioon on varajasemates uuringutes seostatud preeklampsiaga ning platsenta arenguga (Chen *et al.*, 2015; Ishibashi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013), mis andis aluse eeldada, et valitud mikroRNAd omavad olulist rolli raku elutegevuses. Peale mikroRNAd transfekterimist rakuliini tuvastasin sihtmärk-geeni ekspressiooni muutust kõikide mikroRNA *mimic*'ite puhul, kasutades selles RT-qPCR meetodit. Geeniekspressiooni muutust võrdlesin rakuliini vastu, millesse oli lisatud ainult Siport reagenti. Siport transfektsiooni reagenti mõju geeniekspressioonile tuvastasin varasemas katses. Katsete tulemuste normaliseerimiseks kasutasin geeni *UBC* ning saadud tulemused normaliseerisin omakorda kontrolli suhtes, milleks kasutasin JEG-3 rakuliini, millele oli ainult lisatud transfektsiooni reagenti Siport.

4.5.1. *Mir-144* efekt JEG-3 rakuliinis

Geenide seast, mis omavad *mir-144* seonduskohta (joonis 7), tuvastasin oodatavat geeniekspressiooni alanemist kolme geeni puhul: *HNRNPH1* ($p=0,7$ T-test) *PRKD3* ($p=0,18$ T-test) ja *SASH1* ($p=0,44$ T-test). Neist ühelgi juhul polnud aga muutus geeniekspressiooni tasemes statistiliselt oluline.

Geeni *KRT80* puhul, mis samuti omab *mir-144* seonduskohta, oli tuvastatav geeniekspressiooni taseme suurenemine ($p=0,08$ T-test). Märkatavat statistiliselt tähendusrikast geeniekspressiooni suurenemist tuvastasin ka *HSD17B1* geeni puhul ($p=0,0085$ T-test).

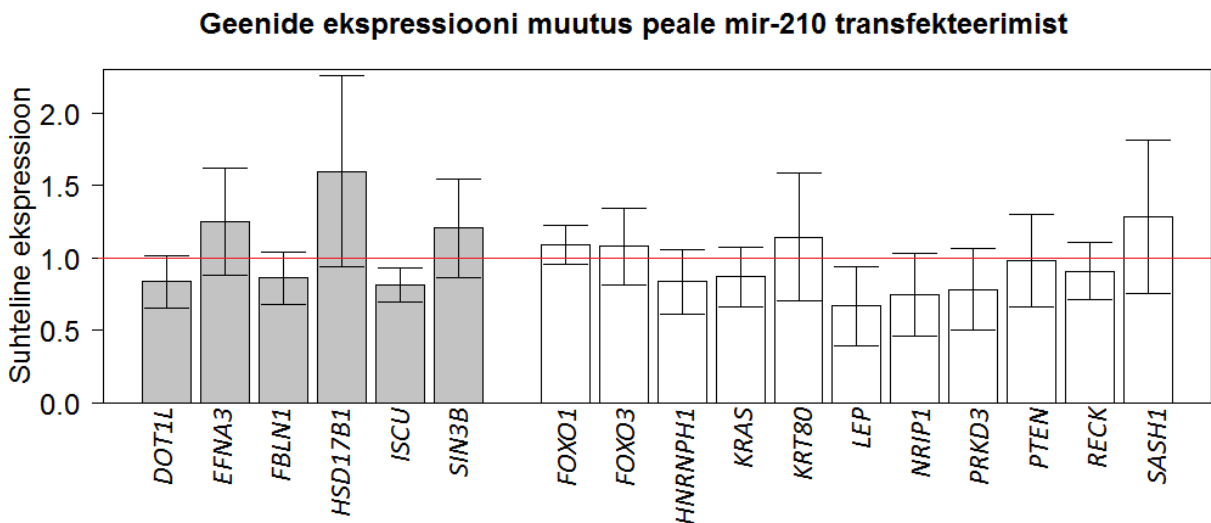


Joonis 7. *Mir-144* mõju geeniekspressioonile, avaldatud ekspresioonitaseme suhte muutus kontrolli suhtes. Sihtmärk-järjestust omavad geenid on esitatud hallide tulpadega, sihtmärk-järjestust mitteomavad geenid on esitatud valgete tulpadena. Punase joonega on esitatud geenide ekspresioonitase kontrollgruppidel. Kontrolliks on kasutatud JEG-3 rakuliini, millele on lisatud ainult transfektsiooni reagenti Siport.

4.5.2. *Mir-210* efekt JEG-3 rakuliinis

Geenide seast, mis omavad *mir-210* seonduskohta (joonis 8), tuvastasin geenide *DOT1L* ($p=0,5$ T-test), *FBLN1* ($p=0,24$ T-test) ja *ISCU* ($p=0,099$ T-test) geeniekspressiooni alanemist. Geenide *HSD17B1* ($p=0,2$ T-test) ja *EFNA3* ($p=0,6$ T-test) puhul tuvastasin geeniekspressiooni suurenemist, kuigi andmebaasid ennustasid geenidele *mir-210* sihtmärk-järjestust.

Mir-210 mõju geeni ekspressioonile polnud aga ühelgi juhul statistiliselt oluline.

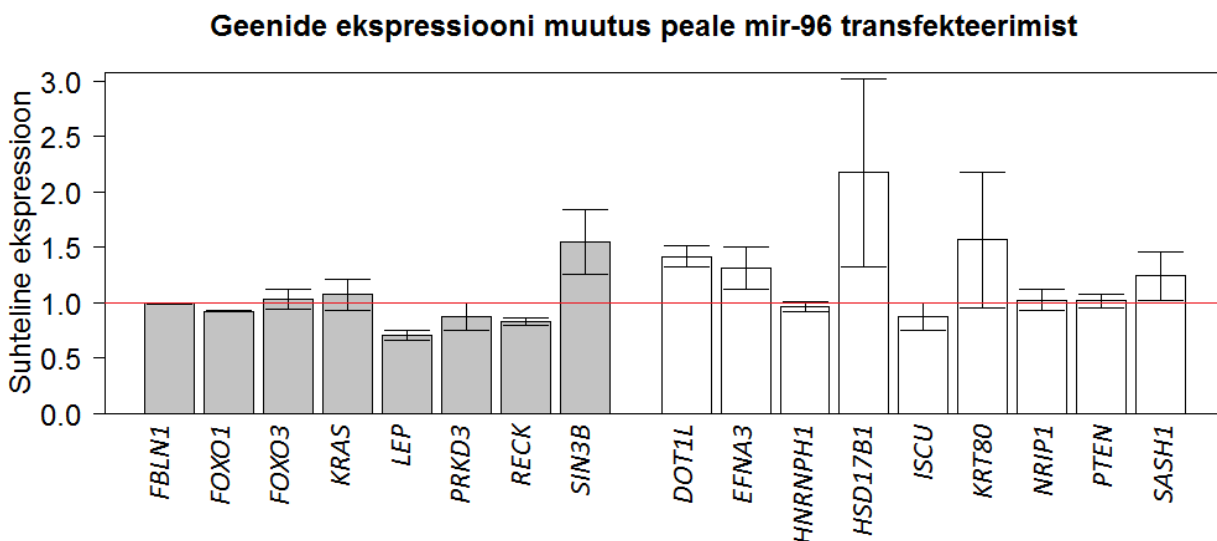


Joonis 8. *Mir-210* mõju geeniekspressioonile, avaldatud ekspressioonitaseme suhte muutus kontrolli suhtes. Sihtmärk-järjestust omavad geenid on esitatud hallide tulpadega, sihtmärk-järjestust mitteomavad geenid on esitatud valgete tulpadena. Punase joonega on esitatud geenide ekspressiooni tase kontrollgruppides. Kontrolliks on kasutatud JEG-3, rakuliini millele on lisatud ainult transfektsiooni reagenti Siport.

4.5.3. *Mir-96* efekt JEG-3 rakuliinis

Geenide seast, mis omavad mikroRNA *mir-96* seonduskohta (joonis 9), tuvastasin ekspressioonitaseme langust *FOXO1* ($p=0,09$ T-test), *LEP* ($p=0,5$ T-test), *RECK* ($p=0,1$ T-test) geenidel. Geeni *SIN3B* puhul tuvastasin geeniekspressiooni suurenemist ($p=0,087$ T-test), kuigi andmebaaside poolt oli tuvastatud *mir-96* sihtmärk-järjestus.

Ka *mir-96* mõju geeni ekspressioonile polnud ühelgi juhul *in vitro* katsetes statistiliselt oluline.

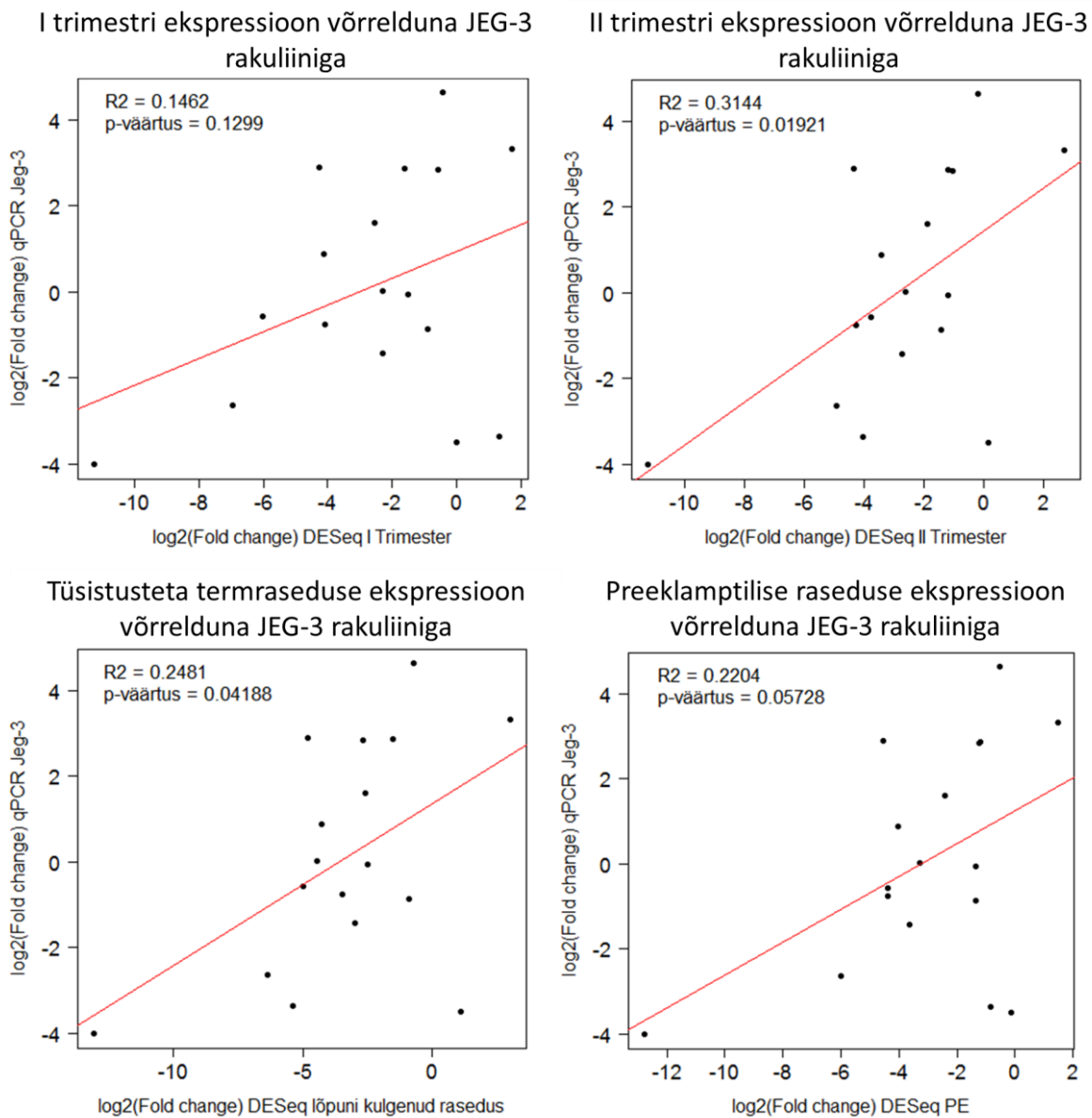


Joonis 9. *Mir-96* mõju geeniekspressioonile, avaldatud ekspressiooni taseme suhte muutus kontrolli suhtes. Sihtmärk-järjestust omavad geenid on esitatud hallide tulpadega, sihtmärk-järjestust mitteomavad geenid on esitatud valgete tulpadena. Punase joonega on esitatud geenide ekspressioonitase kontrollgruppides. Kontrolliks on kasutatud JEG-3, rakuliini millele on lisatud ainult transfektsiooni reagenti Siport.

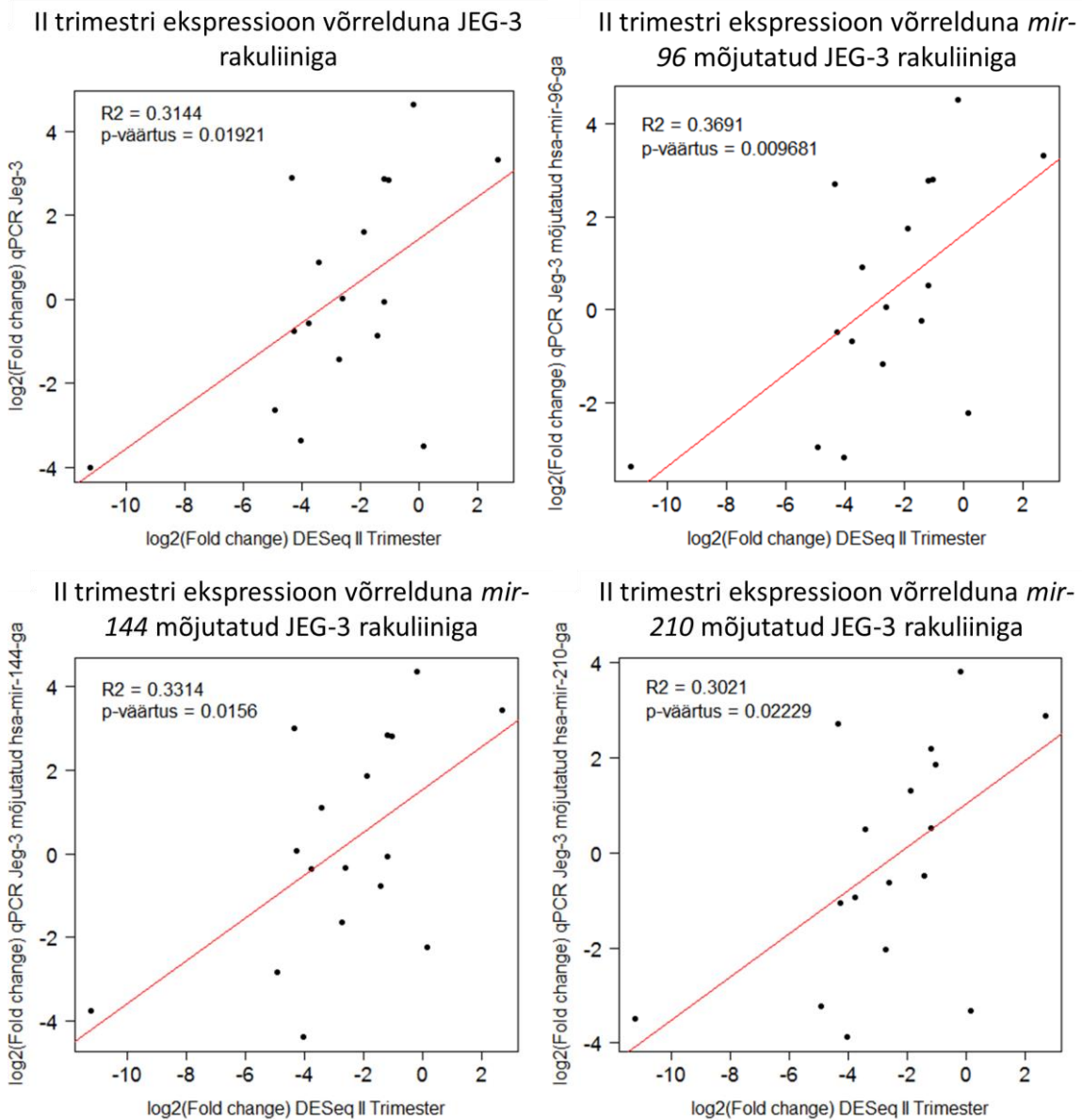
4.6. MikroRNade mõju JEG-3 rakuliinis ekspresseeruvatele geenidele

Trofoblasti JEG-3 rakuliini kasutatakse platsenta koe ja primaarsete trofoblasti rakkude mudelina. JEG-3 rakuliin sai alguse trofoblasti rakkudest ning varasemas uuringutes on näidatud, et JEG-3 rakuliin käitub trofoblasti rakkudega sarnaselt. Uurimaks JEG-3 rakuliini sobivust platsenta mudelina, võrdlesin *REPROMETA* projektist pärit RNAseqist saadud geeniekspressiooni JEG-3 RT-qPCRist pärit geeniekspressiooniga. Esmalt võrdlesin paarikaupa JEG-3 rakuliini, esimese ja teise trimestri aborte, tüsistusteta ning preeklamptilise raseduse geeniekspressioone (joonis 10). Geenid, mille põhjal võrdluse sooritasin, olid samad, millega määrasin mikroRNA *mimic*'i mõju sihtmärk-geenide ekspressioonile. Antud töös uuritud JEG-3 rakuliini geenide ekspressioon sarnaneb kõige rohekm II trimestri platsenta koe transkriptide profiilile ($R^2=0,31$). Samas on tegu üsna nõrga sarnasusega. *mir-96 mimic*'i transfekterimisel JEG-3 rakuliini tõusis geeniekspressiooni profiili korrelatsioon nii raseduse II trimestri ($R^2=0,37$ võrreldes $R^2=0,31$; joonis 11) kui preeklamptilise raseduse platsenta koega ($R^2=0,26$ võrreldes $R^2=0,22$; joonis 12). Tulemuste põhjal võib spekuloida, et võrreldes platsentaga on JEG-3 rakuliinis *mir-96* tase madalam ning mikroRNA transfekterimisel rakku muudab see JEG-3 geeniekspressiooni profiili platsenta transkriptomile sarnasemaks.

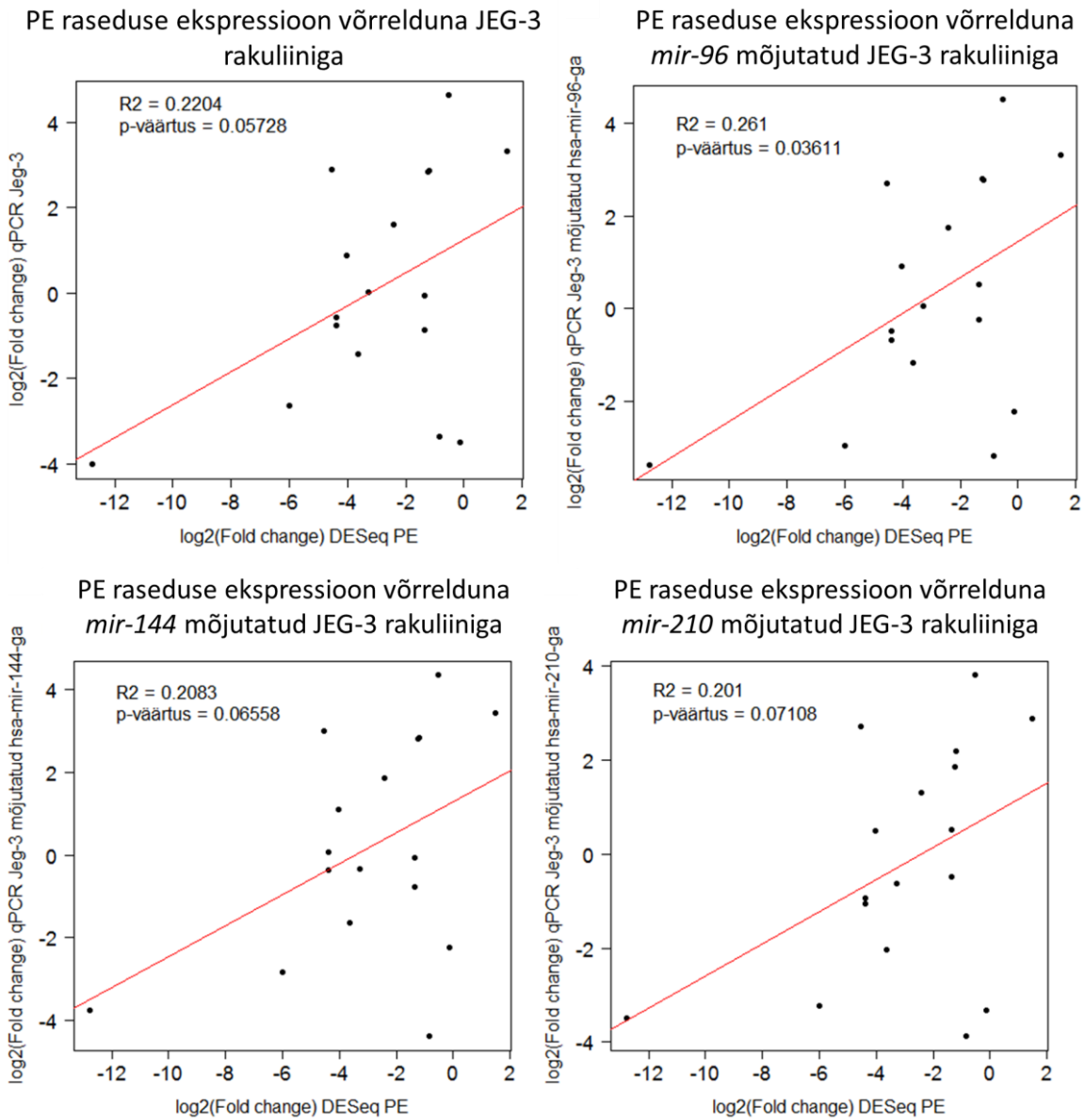
Kokkuvõttes näitavad antud analüüsid aga seda, et rakuliinidel saadud katsetulemusi ei ole võimalik automaatselt üle kanda *in vivo* mudelile. Antud katse teostamiseks sobiksid paremini primaarsed trofoblasti rakud.



Joonis 10. JEG-3 rakuliini RT-qPCRist pärit geeniekspressiooni võrdlus esimese ja teise trimestri, tüsistusteta termrasedus ja PE platsenta RNAseqist pärit geeniekspressiooniga. Punase joonega on esitatud regressioonijoon. JEG-3 rakuliini geeniekspressioon omab kõige suuremat sarnasust teise trimestriga.



Joonis 11. Teise trimestri RNAseqi geeniekspressiooni tulemuste võrdlus JEG-3 rakuliini geeniekspressiooniga ja JEG-3 rakuliiniga, mida on mõjutatud vastavalt mikroRNAde *mir-96*, *mir-144* ja *mir-210*. *Mir-96* muudab JEG-3 rakuliini kõige enam sarnasemaks teise trimestriga. Punase joonega on esitatud regressioonijoon.



Joonis 12. PE grupi RNaseqi geeniekspressiooni tulemuste võrdlus JEG-3 rakuliini geeniekspressiooniga ja JEG-3 rakuliiniga, mida on mõjutatud vastavalt mikroRNAde *mir-96*, *mir-144* ja *mir-210*. *Mir-96* muudab JEG-3 rakuliini kõige enam sarnasemaks PE grupiga. Punase joonega on esitatud regressioonijoon.

5. ARUTELU

5.1. Ennustatud mikroRNade sihtmärk-geenid ning nende tuvastamine katsega

Andmebaaside abil tuvastasin valitud 13 mikroRNAle sihtmärk-geenid ning määrasin transkriptidel oleva mikroRNA seonduskohtade arvu. *mir-1285*'le ei ennustanud ükski andmebaas sihtmärk-geene ning *mir-210*'le ennustati vähem sihtmärk-geene. Kirjanduses on jällegi *mir-210* põhjalikumalt uuritud ja on tuvastatud sihtmärk-geene, mis ei kajastu andmebaasides. *HSD17B1* (Ishibashi *et al.*, 2012) ja *KCMF1* (Luo *et al.*, 2014) on varasemates uuringutes katseliselt kinnitatud kui *mir-210* sihtmärk-geenid.

Kogutud info põhjal valisin välja kuus mikroRNAd, mida kasutasin edasistes katsetes. Iga mikroRNA jaoks valisin välja neli kuni viis geeni, mis omasid mikroRNA seondumiskohta. Lisaks valisin välja geenid, mis omavad rohkem kui ühte mikroRNA seondumiskohta. Mitme mikroRNA seondumiskoha omamine võimaldab väljavalitud geene kasutada mikroRNade funktsiooni omavahelisel võrdlemisel. Varasemates uuringutes on leitud mikroRNade *mir-144*, *mir193b*, *mir-210* ja *mir-31* mõju sihtmärk-geenidele erinevates kudedes. *mir-144* on varasemalt uuritud kui geeni *PTEN* ekspressiooniregulaator, mis soodustab kurgu kasvaja proliferatsiooni (Zhang *et al.*, 2013). Antud töös ei tuvastanud *mir-144* mõju *PTEN* geeniekspressioonile. *Mir-193b* ja *mir-31* on varasemalt samuti uuritud seoses eri tüüpi kasvajatega (Chen *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2012; Leivonen *et al.*, 2011; Valastyan *et al.*, 2009). *Mir-210* on laialdaselt uuritud kui üks põhilistest mikroRNAdest, mis omab rolli preeklampsia tekkimisel (Ishibashi *et al.*, 2012). Varasemates uurimustöodes on *mir-210* uuritud kui *EFNA3* (Wang *et al.*, 2013), *HSD17B1* (Ishibashi *et al.*, 2012) ja *ISCU* (Chan *et al.*, 2009) geeni reguleeriv mikroRNA. Käesolevas töös tuvastasin ainult *ISCU* geeniekspressiooni alanemist *mir-210* tõttu. *EFNA3* ja *HSD17B1* geenide ekspressioonis märkasin vastupidist mõju geenide ekspressiooni suurenemisega. *KRAS* geeni puhul tuvastasin geeniekspressiooni langust, samas ükski andmebaas ei ennustanud geenile *mir-210* seondumiskohta. Ootamatu tulemus võib olla tingitud sekundaarse mõjust. Ota *et al.* (2012) uurimustöös näidati, kuidas geen *KRAS* suurendab *mir-210* ekspressiooni taset. *mir-210* taseme suurenemine rakuliinis võib käivitada rajad, mis vähendavad *KRAS* geeniekspressiooni taset.

5.2. Geeniekspressiooni profiil JEG-3 rakuliinis ja platsentas.

Trofoblasti JEG-3 rakuliini kasutatakse platsenta ja trofoblasti rakuliini lihtsustatud mudelina. Rakuliini kasutamine platsenta mudelina annab võimaluse lihtsamalt uurida mikroRNAde mõju geenide ekspressioonile. Samas on rakuliin siiski platsenta rakkude lihtsustatud ja ebatäiuslik mudel. Selleks, et uurida kui sarnased on *REPROMETA* projektis kasutatud grupid JEG-3 rakuliinile ja kuidas mikroRNAd mõjutavad JEG-3 rakuliini sarnasust nendega, võrdlesin geenide ekspressioonitasemeid. Rakuliinis JEG-3 esinenud geeniekspressiooni profiil sarnanes kõige enam teise trimestri platsentale. Kui vaadata, kuidas mõjutas mikroRNAdega transfekteerimine mudeleid, võib näha, et *mir-96* muutis kõige enam JEG-3 rakuliini geenide ekspressiooniprofiili sarnasemaks teise trimestri ning preeklampsia grupiga. MikroRNA *mir-96* mõju võib olla tingitud platsenta ja JEG-3 rakuliinis esinevast mikroRNA taseme erinevusest ning selle suurendamine muudab rakuliini platsentale sarnasemaks. Varasemates töödes leiti, et JEG-3 rakuliin ja primaarsed trofoblasti rakud erinevad üksteisest geeniekspressiooni ning stressitingimustele reageerimise poolest (Burleigh *et al.*, 2007; Novakovic *et al.*, 2011). Antud töö tulemused kinnitavad seda, et JEG-3 rakuliini katsete tulemused ei ole kõikides aspektides ülekantavad primaarsetele trofoblastidele.

5.3. Uuringu tugevused ja puudused

Varasemalt ei ole valitud kuue mikroRNAGA JEG-3 trofoblasti rakuliinis katseid tehtud. Käesolev magistritöö kirjeldab, kuidas valitud mikroRNAd rakuliini reguleerivad. Regulatsiooni hindamiseks oli valitud iga mikroRNA kohta neli kuni viis geeni, et katseliselt hinnata andmebaaside ennustatud mõju sihtmärk-geenidele.

Kui võrrelda JEG-3 rakuliinis ja platsenta geeniekspressiooni profiili, selgub, et kuigi JEG-3 võiks sobida mõne mikroRNA sihtmärk-geenide tuvastamiseks, on *in vivo* geeniekspressiooniprofiil platsenta omast siiski erinev (Suman ja Gupta, 2012).

5.4. Edasised plaanid

Doktorantuuris jätkan magistrantuuris alustatud valitud kuue mikroRNA seotud katseid. Esimeses etapis jätkan katsetega trofoblasti JEG-3 rakuliinis kolme järgmise valitud mikroRNAga (*mir-1*, *mir-31*, *mir-193b*).

Teises etapis viin katseseeria üle primaarsetele trofoblasti rakkudele, et hinnata valitud kuue mikroRNA reguloorset rolli ennustatud sihtmärk-geenidele ning edasi ka kogu transkriptomile. Viimase profileerimiseks plaanin kasutada geeniekspressioonikiipi HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina).

Kolmandas etapis soovin uurida kõigi kuue valitud mikroRNA sünergilist efekti *mimic*'ite kombineeritud transfektsioonil nii JEG-3 rakuliini kui ka primaarse trofoblasti rakkude baasil. Trofoblasti rakuliinides ei ole varem uuritud, kuidas mitu mikroRNAd koos mõjutavad geeni või geenide ekspressiooni. Lõppeesmärk on *in vitro* katsetel kombineeritud *mimic*'ite komplektiga saadud primaarse trofoblasti transkriptoomi profiili võrrelda *in vivo* platsenta RNASeq andmetega preeklamptilise raseduse korral. Katsete tulemused võiksid panustada teadmisesse, milline on platsenta mikroRNAde roll preeklampsia kujunemisel.

KOKKUVÕTE

Rasedusega seotud tüsistused võivad mõjutada paljude lapseootel naiste elusid. Üheks sagedasemaks rasedüstüsistuseks on preeklampsia, mis esineb 2-5% raseduste korral. Preeklampsia üheks tekkepõhjuseks võib olla platsenta arengus ja funktsioonis esinevad häired.

Käesolev magistritöö keskendub preeklampsia esinemisel diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAde geenide ekspressiooni regulatoorse rolli uurimisele trofoblasti JEG-3 rakuliinis. Magistritöö jooksul tuvastasin kuus preeklampsia korral diferentsiaalselt ekspresseerunud mikroRNAd ning valisin igale mikroRNAle neli kuni viis sihtmärk-geeni. Koekultuuris läbi viidud katsetes kasutasin kuuest mikroRNast kolme. Pärast mikroRNAde *mimic*'ite transfekkeerimist rakuliini tuvastasin geeniekspressiooni taseme muutuse RT-qPCRiga.

Katsete tulemused näitasid, et mikroRNA *mimic*'id küll reguleerivad sihtmärk-geene, kuid ei mõju kõikidele sihtmärk-geenidele ekspressiooni pärssivalt. Vastupidi, osadel sihtmärk-geenidel tuvastasin geeniekspressiooni suurenemist, mis võib olla seletatav mikroRNAde sekundaarse mõjuga geenide ekspressioonile.

Võrreldes omavahel katseks kasutatud JEG-3 rakuliini geeniekspressiooni esimese ja teise trimestri aborte, tüsistusteta kulgenud raseduste ja preeklamptiliste raseduste platsentade transkriptommi andmetega, leidsin, et JEG-3 rakuliini geeniekspressioon sarnaneb kõige enam teise trimestri rakuliiniga. *mir-96 mimic*'i transfekkeerimise järel tõusis korrelatsioon JEG-3 rakuliini ja preeklamptilise raseduse platsenta geenide avaldumise tasemete vahel.

Käesoleva magistritööga leidsin, et mikroRNA *mimic*'id reguleerivad geeniekspressiooni JEG-3 rakuliinis. Siiski, kasutades JEG-3 rakuliini kui platsenta mudelit tuleb tulemuste tõlgenduses olla ettevaatlik ning neid mitte otse üle kanda *in vivo* tingimustele.

The influence of microRNAs on the expression in genes associated with preeclampsia.

Rain Inno

SUMMARY

Complications that occur in the period of pregnancy are quite common and can affect the health of the mother and the child. One of the most common pregnancy complication that occurs is preeclampsia. The cause of it is not well understood, but it is believed that the fault is in placenta, more precisely in mistakes that occur in placental development. Mechanisms behind that are still not well-known, but one of the causes may be badly regulated microRNAs. It is shown that microRNAs are very important in regulating gene expression and molecular pathways.

This thesis focuses on the microRNAs that are differentially expressed in preeclamptic placenta tissue. The aim of this study is to evaluate if these microRNAs can change expression levels of genes that are expressed in placenta and how good of a model the trophoblastic cell line JEG-3 is for placenta. This was tested in trophoblastic cell line JEG-3 by transfecting microRNA mimics into the cell line.

Results of the trophoblast JEG-3 experiment show that microRNAs, which are differentially expressed in placenta in case of preeclampsia, regulate gene expression of genes that are expressed in placenta. By comparing gene expression profile of genes in preeclamptic placenta and trophoblast cell line JEG-3, the expression profile does not match very well. After microRNA transfection the correlation is better, but only slightly. Results show that trophoblastic cell line is a good model for valuating microRNA regulations of gene expression, but not for valuating gene expression profile as a model of placenta.

KIRJANDUSE LOETELU

Ambros, V. (2001). microRNAs: Tiny Regulators with Great Potential. *Cell* 107, 823–826.

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11, R106.

Bader, A.G., Brown, D., and Winkler, M. (2010). The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Res.* 70, 7027–7030.

Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., et al. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* 14, 2486–2494.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* 37, 766–770.

Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* 12, 846–860.

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36, D149–D153.

Bilban, M., Tauber, S., Haslinger, P., Pollheimer, J., Saleh, L., Pehamberger, H., Wagner, O., and Knöfler, M. (2010). Trophoblast invasion: Assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 31, 989–996.

Burleigh, D.W., Kendzierski, C.M., Choi, Y.J., Grindle, K.M., Grendell, R.L., Magness, R.R., and Golos, T.G. (2007). Microarray Analysis of BeWo and JEG3 Trophoblast Cell Lines: Identification of Differentially Expressed Transcripts. *Placenta* 28, 383–389.

Centlow, M., Carninci, P., Nemeth, K., Mezey, E., Brownstein, M., and Hansson, S.R. (2008). Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes. *Fertil. Steril.* 90, 1834–1843.

Chan, S.Y., Zhang, Y.-Y., Hemann, C., Mahoney, C.E., Zweier, J.L., and Loscalzo, J. (2009). MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. *Cell Metab.* 10, 273–284.

Chen, D., and Wang, W. (2013). Human Placental MicroRNAs and Preeclampsia. *Biol. Reprod.* 88, 130.

- Chen, J., Feilotter, H.E., Pare, G.C., Zhang, X., Pemberton, J.G.W., Garady, C., Lai, D., Yang, X., and Tron, V.A. (2010). MicroRNA-193b Represses Cell Proliferation and Regulates Cyclin D1 in Melanoma. *Am. J. Pathol.* *176*, 2520–2529.
- Chen, J., Abi-Daoud, M., Wang, A., Yang, X., Zhang, X., Feilotter, H.E., and Tron, V.A. (2013). Stathmin 1 is a potential novel oncogene in melanoma. *Oncogene* *32*, 1330–1337.
- Chen, K., Chen, X., He, J., Ding, Y., Geng, Y., Liu, S., Liu, X., and Wang, Y. (2015). Mouse Endometrium Temporal and Spatial Expression mRNA and MicroRNA Associated With Embryo Implantation. *Reprod. Sci.* Thousand Oaks Calif.
- Dong, Q., Fan, R., Zhao, S., and Wang, Y. (2009). Over-expression of SOCS-3 Gene Promotes IL-10 Production by JEG-3 Trophoblast Cells. *Placenta* *30*, 11–14.
- Donker, R.B., Mouillet, J.-F., Nelson, D.M., and Sadovsky, Y. (2007). The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol. Hum. Reprod.* *13*, 273–279.
- Donker, R.B., Mouillet, J.F., Chu, T., Hubel, C.A., Stolz, D.B., Morelli, A.E., and Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Mol. Hum. Reprod.* *18*, 417–424.
- Doridot, L., Miralles, F., Barbaux, S., and Vaiman, D. (2013a). Trophoblasts, invasion, and microRNA. *Front. Genet.* *4*.
- Doridot, L., Houry, D., Gaillard, H., Chelbi, S.T., Barbaux, S., and Vaiman, D. (2013b). miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics* *9*, 142–151.
- Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjärn, M., Hansen, H.F., Berger, U., et al. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* *452*, 896–899.
- Engels, B.M., and Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* *25*, 6163–6169.
- English, F.A., Kenny, L.C., and McCarthy, F.P. (2015). Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integr. Blood Press. Control* *8*, 7–12.
- Enquobahrie, D.A., Meller, M., Rice, K., Psaty, B.M., Siscovick, D.S., and Williams, M.A. (2008). Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *199*, 566.e1–e566.11.
- Enquobahrie, D.A., Abetew, D.F., Sorensen, T.K., Willoughby, D., Chidambaram, K., and Williams, M.A. (2011). Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *204*, 178.e12–e178.e21.
- Fan, W., Liang, D., Tang, Y., Qu, B., Cui, H., Luo, X., Huang, X., Chen, S., Higgs, B.W., Jallal, B., et al. (2012). Identification of microRNA-31 as a novel regulator contributing to impaired

interleukin-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *64*, 3715–3725.

Fang, L. (2013). miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncol. Rep.*

Fasanaro, P., Greco, S., Lorenzi, M., Pescatori, M., Brioschi, M., Kulshreshtha, R., Banfi, C., Stubbs, A., Calin, G.A., Ivan, M., et al. (2009). An Integrated Approach for Experimental Target Identification of Hypoxia-induced miR-210. *J. Biol. Chem.* *284*, 35134–35143.

Favaro, E., Ramachandran, A., McCormick, R., Gee, H., Blancher, C., Crosby, M., Devlin, C., Blick, C., Buffa, F., Li, J.-L., et al. (2010). MicroRNA-210 Regulates Mitochondrial Free Radical Response to Hypoxia and Krebs Cycle in Cancer Cells by Targeting Iron Sulfur Cluster Protein ISCU. *PLoS ONE* *5*.

Founds, S.A., Conley, Y.P., Lyons-Weiler, J.F., Jeyabalan, A., Hogge, W.A., and Conrad, K.P. (2009). Altered Global Gene Expression in First Trimester Placentas of Women Destined to Develop Preeclampsia. *Placenta* *30*, 15–24.

Gardner, P.P., and Vinther, J. (2008). Mutation of miRNA target sequences during human evolution. *Trends Genet.* *24*, 262–265.

Gouton, M., Nizard, J., Patel, M., Sassolas, F., Jimenez, M., Radojevic, J., Mathiron, A., Amedro, P., Barre, E., Labombarda, F., et al. (2015). Maternal and fetal outcomes of pregnancy with Fontan circulation: A multicentric observational study. *Int. J. Cardiol.* *187*, 84–89.

Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., Dongen, S. van, and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* *36*, D154–D158.

Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.

Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., and Bartel, D.P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* *455*, 1193–1197.

Guo, H., Li, Q., Li, W., Zheng, T., Zhao, S., and Liu, Z. (2014). MiR-96 downregulates RECK to promote growth and motility of non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* *390*, 155–160.

GUO, Y., LIU, H., ZHANG, H., SHANG, C., and SONG, Y. (2012). miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer. *Oncol. Lett.* *4*, 561–565.

Guo, Y., Ying, L., Tian, Y., Yang, P., Zhu, Y., Wang, Z., Qiu, F., and Lin, J. (2013). miR-144 downregulation increases bladder cancer cell proliferation by targeting EZH2 and regulating Wnt signaling. *FEBS J.* *280*, 4531–4538.

- Hameed, A.B., Lawton, E.S., McCain, C., Morton, C.H., Mitchell, C., Main, E.K., and Foster, E. (2015). Pregnancy-Related Cardiovascular Deaths in California: Beyond Peripartum Cardiomyopathy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*
- Hernández-Díaz, S., Toh, S., and Cnattingius, S. (2009). Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ* 338.
- Hoegh, A.M., Borup, R., Nielsen, F.C., Sørensen, S., and Hviid, T.V.F. (2010). Gene Expression Profiling of Placentas Affected by Pre-Eclampsia. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.
- Hsu, S.-D., Tseng, Y.-T., Shrestha, S., Lin, Y.-L., Khaleel, A., Chou, C.-H., Chu, C.-F., Huang, H.-Y., Lin, C.-M., Ho, S.-Y., et al. (2014). miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 42, D78–D85.
- Ishibashi, O., Ohkuchi, A., Ali, M.M., Kurashina, R., Luo, S.-S., Ishikawa, T., Takizawa, T., Hirashima, C., Takahashi, K., Migita, M., et al. (2012). Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 59, 265–273.
- İskender-Mazman, D., Akçören, Z., Yiğit, Ş., Kale, G., Korkmaz, A., Yurdakök, M., and Durukan, T. (2014). Placental findings of IUGR and non-IUGR. *Turk. J. Pediatr.* 56, 368–373.
- Jarvenpaa, J., Vuoristo, J.T., Savolainen, E.-R., Ukkola, O., Vaskivuo, T., and Ryyanen, M. (2007). Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 23, 351–355.
- Kamanu, T.K.K., Radovanovic, A., Archer, J.A.C., and Bajic, V.B. (2013). Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Sci. Rep.* 3.
- Kapushesky, M., Emam, I., Holloway, E., Kurnosov, P., Zorin, A., Malone, J., Rustici, G., Williams, E., Parkinson, H., and Brazma, A. (2010). Gene Expression Atlas at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Res.* 38, D690–D698.
- Khong, T.Y., De Wolf, F., Robertson, W.B., and Brosens, I. (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93, 1049–1059.
- Kotlabova, K., Doucha, J., and Hromadnikova, I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J. Reprod. Immunol.* 89, 185–191.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 39, D152–D157.
- Lain KY, and Roberts JM (2002). COntemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 287, 3183–3186.

- Lapaire, O., Grill, S., Lalevee, S., Kolla, V., Hösli, I., and Hahn, S. (2012). Microarray Screening for Novel Preeclampsia Biomarker Candidates. *Fetal Diagn. Ther.* *31*, 147–153.
- Lee, G.S.R., Joe, Y.S., Kim, S.J., and Shin, J.C. (2009). Cytokine-related genes and oxidation-related genes detected in preeclamptic placentas. *Arch. Gynecol. Obstet.* *282*, 363–369.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Leivonen, S.-K., Rokka, A., Ostling, P., Kohonen, P., Corthals, G.L., Kallioniemi, O., and Perala, M. (2011). Identification of miR-193b Targets in Breast Cancer Cells and Systems Biological Analysis of Their Functional Impact. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *10*.
- Li, H., Ge, Q., Guo, L., and Lu, Z. (2013). Maternal Plasma miRNAs Expression in Preeclamptic Pregnancies. *BioMed Res. Int.* *2013*.
- Li, J., Li, P., Chen, T., Gao, G., Chen, X., Du, Y., Zhang, R., Yang, R., Zhao, W., Dun, S., et al. (2014). Expression of microRNA-96 and its potential functions by targeting FOXO3 in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol.* 1–8.
- Lian, I.A., Langaas, M., Moses, E., and Johansson, Å. (2013). Differential Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface in Preeclampsia Is Influenced by Gestational Age. *PLoS ONE* *8*.
- Liu, C., Zhou, Y., and Zhang, Z. (2012). MiR-210: an important player in the pathogenesis of preeclampsia? *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 943–944.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*.
- Luo, R., Shao, X., Xu, P., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, Y., Liu, M., Ji, L., Li, Y.-X., Chang, C., et al. (2014). MicroRNA-210 contributes to preeclampsia by downregulating potassium channel modulatory factor 1. *Hypertension* *64*, 839–845.
- Mathelier, A., and Carbone, A. (2013). Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4392–4408.
- Mayor-Lynn, K., Toloubeydokhti, T., Cruz, A.C., and Chegini, N. (2011). Expression Profile of MicroRNAs and mRNAs in Human Placentas From Pregnancies Complicated by Preeclampsia and Preterm Labor. *Reprod. Sci.* *18*, 46–56.
- Meng, T., Chen, H., Sun, M., Wang, H., Zhao, G., and Wang, X. (2012). Identification of Differential Gene Expression Profiles in Placentas from Preeclamptic Pregnancies Versus Normal Pregnancies by DNA Microarrays. *OMICS J. Integr. Biol.* *16*, 301–311.
- Montenegro, D., Romero, R., Kim, S.-S., Tarca, A.L., Draghici, S., Kusanovic, J.P., Kim, J.-S., Lee, D.-C., Erez, O., Gotsch, F., et al. (2009). Expression Patterns of MicroRNAs in the Chorioamniotic Membranes: a Role for MicroRNAs in Human Pregnancy and Parturition. *J. Pathol.* *217*, 113–121.

- Morales Prieto, D.M., and Markert, U.R. (2011). MicroRNAs in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 88, 106–111.
- Morales-Prieto, D.M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., and Markert, U.R. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 33, 725–734.
- Morales-Prieto, D.M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., and Markert, U.R. (2013). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *J. Reprod. Immunol.* 97, 51–61.
- Morales-Prieto, D.M., Ospina-Prieto, S., Schmidt, A., Chaiwangyen, W., and Markert, U.R. (2014). Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta* 35, *Supplement*, S39–S45.
- Muralimanoharan, S., Maloyan, A., Mele, J., Guo, C., Myatt, L.G., and Myatt, L. (2012). MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta* 33, 816–823.
- Myatt, S.S., Wang, J., Monteiro, L.J., Christian, M., Ho, K.-K., Fusi, L., Dina, R.E., Brosens, J.J., Ghaem-Maghami, S., and Lam, E.W.-F. (2010). Repression of FOXO1 expression by microRNAs in endometrial cancer. *Cancer Res.* 70, 367–377.
- Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Kato, T., Sekiya, T., Kurahashi, H., and Udagawa, Y. (2011). Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 9, 107.
- Nohata, N., Sone, Y., Hanazawa, T., Fuse, M., Kikkawa, N., Yoshino, H., Chiyomaru, T., Kawakami, K., Enokida, H., Nakagawa, M., et al. (2011). miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2, 29–42.
- Novakovic, B., Gordon, L., Wong, N.C., Moffett, A., Manuelpillai, U., Craig, J.M., Sharkey, A., and Saffery, R. (2011). Wide-ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived cell lines: implications and opportunities for understanding trophoblast function. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 344–353.
- Ota, T., Doi, K., Fujimoto, T., Tanaka, Y., Ogawa, M., Matsuzaki, H., Kuroki, M., Miyamoto, S., Shirasawa, S., and Tsunoda, T. (2012). KRAS Up-regulates the Expression of miR-181a, miR-200c and miR-210 in a Three-dimensional-specific Manner in DLD-1 Colorectal Cancer Cells. *Anticancer Res.* 32, 2271–2275.
- Pineles, B.L., Romero, R., Montenegro, D., Tarca, A.L., Han, Y.M., Kim, Y.M., Draghici, S., Espinoza, J., Kusanovic, J.P., Mittal, P., et al. (2007). Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 261.e1–e6.
- Redman, C.W., and Sargent, I.L. (2005). Latest Advances in Understanding Preeclampsia. *Science* 308, 1592–1594.
- Roberts, J., and Cooper, D. (2001). Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet* 357, 53–56.

- Rull, K., Vaas, P., Hanson, E., Teesalu, P., Rebane, T., and Laan, M. (2015). [185-POS]: REPROMETA and HAPPY PREGNANCY study: Combining the retrospective and prospective approach for discovery and development of new biomarkers for pregnancy complications. *Pregnancy Hypertens. Int. J. Womens Cardiovasc. Health* 5, 94–95.
- Sitras, V., Paulssen, R.H., Grønnaas, H., Leirvik, J., Hanssen, T.A., Vårtun, Å., and Acharya, G. (2009). Differential Placental Gene Expression in Severe Preeclampsia. *Placenta* 30, 424–433.
- Sluijter, J.P.G., Mil, A. van, Vliet, P. van, Metz, C.H.G., Liu, J., Doevendans, P.A., and Goumans, M.-J. (2010). MicroRNA-1 and -499 Regulate Differentiation and Proliferation in Human-Derived Cardiomyocyte Progenitor Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 859–868.
- Song, J., Li, Y., and An, R.F. (2015). Identification of Early-Onset Preeclampsia-Related Genes and MicroRNAs by Bioinformatics Approaches. *Reprod. Sci.* 1933719115570898.
- Suman, P., and Gupta, S.K. (2012). Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Placenta* 33, 874–877.
- Toft, J.H., Toft, J.H., Lian, I.A., Tarca, A.L., Erez, O., Espinoza, J., Eide, I.P., Bjørge, L., Chen-Sun, Draghici, S., et al. (2008). Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 21, 267–273.
- Tsai, S., Hardison, N.E., James, A.H., Motsinger-Reif, A.A., Bischoff, S.R., Thames, B.H., and Piedrahita, J.A. (2011). Transcriptional Profiling of Human Placentas from Pregnancies Complicated by Preeclampsia Reveals Disregulation of Sialic Acid Acetyltransferase and Immune Signalling Pathways. *Placenta* 32, 175–182.
- Tsuchiya, S., Fujiwara, T., Sato, F., Shimada, Y., Tanaka, E., Sakai, Y., Shimizu, K., and Tsujimoto, G. (2011). MicroRNA-210 Regulates Cancer Cell Proliferation through Targeting Fibroblast Growth Factor Receptor-like 1 (FGFRL1). *J. Biol. Chem.* 286, 420–428.
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S., et al. (2010). Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* 28, 1248–1250.
- Ura, B., Feriotto, G., Monasta, L., Bilel, S., Zwyer, M., and Celeghini, C. (2014). Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 53, 232–234.
- Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009a). A Pleiotropically Acting microRNA, miR-31, Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Cell* 137, 1032–1046.
- Valastyan, S., Benaich, N., Chang, A., Reinhardt, F., and Weinberg, R.A. (2009b). Concomitant suppression of three target genes can explain the impact of a microRNA on metastasis. *Genes Dev.* 23, 2592–2597.

- Wakamatsu, M., Kikuchi, A., Tamaru, S., Ono, K., Horikoshi, T., Takagi, K., Ogiso, Y., and Tanemura, M. (2011). Voronoi diagram description of the maternal surface of the placenta: Preliminary report: Voronoi diagram of the placenta. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* *37*, 792–799.
- Wang, S., Jiao, B., Geng, S., Song, J., Liang, Z., and Lu, S. (2014a). Concomitant microRNA-31 downregulation and radixin upregulation predicts advanced tumor progression and unfavorable prognosis in patients with gliomas. *J. Neurol. Sci.* *338*, 71–76.
- Wang, W., Feng, L., Zhang, H., Hachy, S., Satohisa, S., Laurent, L.C., Parast, M., Zheng, J., and Chen, D. (2012a). Preeclampsia Up-Regulates Angiogenesis-Associated MicroRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) That Target Ephrin-B2 and EPHB4 in Human Placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, E1051–E1059.
- Wang, Y., Luo, H., Li, Y., Chen, T., Wu, S., and Yang, L. (2012b). hsa-miR-96 up-regulates MAP4K1 and IRS1 and may function as a promising diagnostic marker in human bladder urothelial carcinomas. *Mol. Med. Rep.* *5*, 260–265.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, H., Wang, J., Zhang, Y., Wang, Y., Pan, Z., and Luo, S. (2014b). Aberrantly Up-regulated miR-20a in Pre-eclamptic Placenta Compromised the Proliferative and Invasive Behaviors of Trophoblast Cells by Targeting Forkhead Box Protein A1. *Int. J. Biol. Sci.* *10*, 973–982.
- Wang, Z., Yin, B., Wang, B., Ma, Z., Liu, W., and Lv, G. (2013). MicroRNA-210 Promotes Proliferation and Invasion of Peripheral Nerve Sheath Tumor Cells Targeting EFNA3. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* *21*, 145–154.
- Winn, V.D., Gormley, M., Paquet, A.C., Kjaer-Sorensen, K., Kramer, A., Rumer, K.K., Haimov-Kochman, R., Yeh, R.-F., Overgaard, M.T., Varki, A., et al. (2009). Severe Preeclampsia-Related Changes in Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface Include Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like Lectin-6 and Pappalysin-2. *Endocrinology* *150*, 452–462.
- Xia, H., Chen, S., Chen, K., Huang, H., and Ma, H. (2014). MiR-96 promotes proliferation and chemo- or radioresistance by down-regulating RECK in esophageal cancer. *Biomed. Pharmacother.* *68*, 951–958.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* *13*, 134.
- Yoshino, H., Chiyomaru, T., Enokida, H., Kawakami, K., Tatarano, S., Nishiyama, K., Nohata, N., Seki, N., and Nakagawa, M. (2011). The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br. J. Cancer* *104*, 808–818.
- Yu, J.-J., Wu, Y.-X., Zhao, F.-J., and Xia, S.-J. (2014). miR-96 promotes cell proliferation and clonogenicity by down-regulating of FOXO1 in prostate cancer cells. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *31*, 910.

- Yu, S., Lu, Z., Liu, C., Meng, Y., Ma, Y., Zhao, W., Liu, J., Yu, J., and Chen, J. (2010). miRNA-96 Suppresses KRAS and Functions as a Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* *70*, 6015–6025.
- Zhang, H., Fu, Y., Su, Y., Shi, Z., and Zhang, J. (2014a). Identification and expression of HDAC4 targeted by miR-1 and miR-133a during early development in *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *179C*, 1–8.
- Zhang, L.-Y., Lee, V.H.-F., Wong, A.M.G., Kwong, D.L.-W., Zhu, Y.-H., Dong, S.-S., Kong, K.-L., Chen, J., Tsao, S.-W., Guan, X.-Y., et al. (2013). MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. *Carcinogenesis* *34*, 454–463.
- Zhang, Y., Fei, M., Xue, G., Zhou, Q., Jia, Y., Li, L., Xin, H., and Sun, S. (2012). Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 249–259.
- Zhang, Y., Chen, M., Zhang, Y., Peng, P., Li, J., and Xin, X. (2014b). miR-96 and miR-330 overexpressed and targeted AQP5 in lipopolysaccharide-induced rat lung damage of disseminated intravascular coagulation: *Blood Coagul. Fibrinolysis* *25*, 731–737.
- Zhu, C., Yang, H., Geng, Q., Ma, Q., Long, Y., Zhou, C., and Chen, M. (2015). Association of Oxidative Stress Biomarkers with Gestational Diabetes Mellitus in Pregnant Women: A Case-Control Study. *PLoS ONE* *10*, e0126490.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

Expression Atlas - <http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>

Protein Atlas - <http://www.proteinatlas.org/>

MirTarBase - <http://MirTarBase.mbc.nctu.edu.tw/>

TargetScan – <http://TargetScan.org/>

Miranda - <http://www.microrna.org/microrna/home.do>

LIHTLITSENTS

Mina Rain Inno (sünnikuupäev: 28. november 1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Platsenta geenide ekspressiooni moduleerivad mikroRNAd, mille juhendajad on Siim Sõber ja Maris Laan.

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

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartu, 26 mai 2015