

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Annette Oder

***FLT1* geeni regulaatoralas paiknevate dinukleotiidi korduste rikka piirkonna alleelse varieeruvuse tuvastamise protokoll väljatöötamine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Triin Kikas ja PhD Triin Laisk

TARTU 2021

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b>	<b>2</b>
<b>INFOLEHT</b>	<b>4</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b>	<b>8</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	<b>9</b>
1.1. Preeklampsia	9
1.1.1. Preeklampsia iseloomustus	9
1.1.2. Riskifaktorid	10
1.1.3. Preeklampsia prognoos, diagnoos ja ravi	12
1.1.4. Platsenta roll preeklampsia patogeneesis	13
1.2. Preeklampsia geneetilised faktorid	15
1.2.1. FLT1	19
1.2.1.1. rs149427560	20
1.3. Mikrosatelliidid	22
1.3.1. Dinukleotiidsed mikrosatelliidid	23
1.3.2. Haigustega seotud lühikesed kordusjärjestused	23
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA</b>	<b>25</b>
2.1. Töö eesmärgid ja hüpotees	25
2.2. Disain	25
2.3. Materjal ja meetodika	28
2.3.1. Valim	28
2.3.2. Praimerite disain	28
2.3.3. PCR-i optimeerimine	29

2.3.4. Sekveneerimine	29
2.4. Tulemused	30
2.4.1. Dinukleotiidi korduste rikka piirkonna iseloomustus	30
2.4.2. Praimerite disain	30
2.4.3. Parimate praimerite valik	35
2.4.4. Sekveneerimise kvaliteedinäitajad	40
2.4.5. Piirkonna alleelne kompositsioon	41
2.5. Arutelu	46
2.5.1. Väljatöötatud töövoog ja piirkonna varieeruvus	46
2.5.2. Piirkonna mõju FLT1 geeni ekspressioonile	47
2.5.3. Piirkonna mõju preeklampsiale	48
<b>KOKKUVÕTE</b>	<b>49</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>50</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU</b>	<b>51</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID</b>	<b>55</b>
<b>LIHTLITSENTS</b>	<b>56</b>

# INFOLEHT

## ***FLT1* geeni regulaatoralas paiknevate dinukleotiidi korduste rikka piirkonna alleelse varieeruvuse protokolliviäljatöötamine**

Preeklampsia on raseduskomplikatsioon, mille tüüpnähtudeks on kõrge vererõhk ja proteiinuuria. Preeklampsilise raseduse ajal vabastatakse süntsüüsiotrofoblastide stressi tõttu platsentast suures koguses antiangiogeenseid faktoreid. Ühte antiangiogeenset faktorit, sFlt-1, kodeeritakse *FLT1* geenilt, mille regulaatoralas asub rohkelt dinukleotiidi korduseid. Need kordused võivad mõjutada *FLT1* ekspressioonitaset. Käesoleva töö eesmärk on välja töötada töövoog, et tuvastada *FLT1* geeni regulaatoralas olevaid dinukleotiidi korduste allelele.

Märksõnad: Preeklampsia, *FLT1*, dinukleotiidne mikrosatelliit

CERCS kood: B790 Kliiniline geneetika

## **Developing a protocol for detecting allelic variation in the dinucleotide rich regulatory region of the *FLT1* gene**

Preeclampsia is a pregnancy complication mainly characterized by hypertension and proteinuria. Its symptoms are primarily caused by circulating antiangiogenic factors in the mother's blood as a result of syncytiotrophoblast stress. sFlt-1, which is an antiangiogenic factor, is coded from the *FLT1* gene. *FLT1* has many dinucleotide rich repeats in its regulatory area which may influence its expression. This study aims to develop a protocol for detecting different alleles of these dinucleotide rich variants.

Keywords: Preeclampsia, *FLT1*, dinucleotide microsatellite

CERCS: B790 Clinical genetics

# KASUTATUD LÜHENDID

<i>ANO9</i>	<i>ingl Anoctamin 9</i> ‘anoktamiin 9’
<i>CHD1</i>	<i>ingl Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1</i>
<i>CTCF</i>	<i>ingl 11 Zinc Finger Transcriptional Repressor</i>
<i>daSTR</i>	<i>ingl disease associated STR</i> ‘haigustega seotud lühikesed kordusjärjestused’
<i>DMSO</i>	<i>ingl dimethyl sulfoxide</i> ‘dimetüülsulfoksiid’
<i>EGFR</i>	<i>ingl Epidermal Growth Factor Receptor</i> ‘epidermaalse kasvufaktori retseptor’
<i>ENG</i>	<i>ingl Endoglin</i> ‘endogliin’
<i>ESC</i>	<i>ingl European Society of Cardiology</i> ‘Euroopa Kardioloogide Selts’
<i>ESRRG</i>	<i>ingl Estrogen Related Receptor Gamma</i>
<i>EZH2</i>	<i>ingl Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
<i>FC</i>	<i>ingl fold change</i> ‘ekspressiooni muutus kordades’
<i>FGR</i>	<i>ingl Fetal Growth Restriction</i> ‘loote kasvupeetus’
<i>FLT1</i>	<i>ingl Fms-like Tyrosine Kinase 1</i> ‘fms-moodi türosiinkinaas 1’
<i>FRDA</i>	<i>ingl Friedreich’s Ataxia</i> ‘Friedreichi ataksia’
<i>FTO</i>	<i>ingl Alpha-ketoglutarate Dependent Dioxygenase</i> ‘alfa-ketoglutaraadist sõltuv dioksügenaas’
<i>FXN</i>	<i>ingl Frataxin</i> ‘frataksiin’
<i>FXS</i>	<i>ingl Fragile X Syndrome</i> ‘fragiilse X-i sündroom’
<i>GWAS</i>	<i>ingl Genome-Wide Association Study</i> ‘ülegenoomne assotsiatsiooniuuring’
<i>HELLP</i>	<i>ingl hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i> ‘hemolüüs, maksaensüümide suurenenud aktiivsus, madal vereliistakute tase veres’
<i>HMOX1</i>	<i>ingl Heme Oxygenase 1</i> ‘heem oksügenaas 1’
<i>HO</i>	<i>ingl Heme Oxygenase 1</i> ‘heem oksügenaas’
<i>INHA</i>	<i>ingl Inhibin Subunit Alpha</i> ‘Inhibiini subühik $\alpha$ ’
<i>INHBA</i>	<i>ingl Inhibin Subunit Beta A</i> ‘Inhibiini subühik $\beta$ A’
<i>INHBB</i>	<i>ingl Inhibin Subunit <math>\beta</math> B</i> ‘Inhibiini subühik $\beta$ B’
<i>ISSHP</i>	<i>ingl International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy</i>
<i>NWD2</i>	<i>ingl NACHT And WD Repeat Domain Containing 2</i>

KMI	kehamassi indeks
LD	ingl linkage disequilibrium 'aheldustasakaalutus'
LEP	ingl <i>Leptin</i> 'leptiin'
LMCD1	ingl <i>LIM And Cysteine Rich Domains 1</i>
LMNTD1	ingl <i>Lamin Tail Domain Containing 1</i>
MAF	ingl <i>Minor allele frequency</i> 'minoorse alleeli sagedus'
MS	ingl <i>microsatellite</i> 'mikrosatelliit'
MgSO <sub>4</sub>	magneesiumsulfaat
NR1P1	ingl <i>Nuclear Receptor Interacting Protein 1</i>
NR2C2	ingl <i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group C Member 2</i> 'tuumaretseptori 2. alamperekonna C-grupi liige 2'
PAPPA2	ingl <i>Pappalysin 2</i> 'pappalüsiin 2'
PE	ingl <i>preeclampsia</i> 'preeklampsia'
PIGF	ingl <i>Placental Growth Factor</i> 'platsenta kasvufaktor'
POLR2A	ingl <i>RNA Polymerase II Subunit A</i> 'RNA polümeraasi II alamühik A'
SASH1	ingl <i>SAM And SH3 Domain Containing 1</i>
sEng	ingl <i>soluble Endoglobin</i> 'lahustuv endoglobiin'
sFlt-1	ingl <i>soluble Fms-like tyrosine kinase-1</i> 'lahustuv fms-taoline türosiinkinaas-1'
SGA	ingl <i>small for gestational age</i> 'gestatsiooniaja kohta väikesed vastündinu'
SNP	ingl <i>single nucleotide polymorphism</i> 'ühe nukleotiidi polümorfism'
STB	ingl <i>syncytiotrophoblast</i> 'süntsüüsiotrofoblast'
STR	ingl <i>short tandemic repeats</i> 'lühikesed kordusjärjestused'
SUZ12	ingl <i>Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
TGFβ	ingl <i>Transforming Growth Factor-β</i> 'transformeeriv kasvufaktor β'
TMTC1	ingl <i>Transmembrane O-mannosyltransferase Targeting Cadherins 1</i> 'transmembraanset O-mannosüültransferaasi sihtiv kadheriin 1'
T <sub>m</sub>	ingl <i>primer melting temperature</i> 'praimerite sulamistemperatuur'
TP53BP1	ingl <i>Tumor Protein P53 Binding Protein 1</i> 'kasvaja suppressorvalku p53 siduv valk 1'
VEGF	ingl <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> 'vaskulaarne endoteeli kasvufaktor'
VEGFA	ingl <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> 'vaskulaarne endoteeli kasvufaktor'

A'

*ZNF831*      *ingl Zinc Finger Protein 831* 'tsink sõrme valk 831'

*ZFR2*      *ingl Zinc Finger RNA Binding Protein 2* 'RNA-d siduv tsink sõrme valk 2'

# SISSEJUHATUS

Preeklampsia on raseduskomplikatsioon, mille tüüpilisteks kliinilisteks nähtudeks on kõrge vererõhk ja proteiinuuria ehk kõrge valgusisaldus uriinis. Kliiniliste nähtude põhjustajaks on antiangiogeensete faktorite taseme tõus ema veres platsenta süntsüüsiotrofoblastide (STB) stressi tõttu. (Burton *et al.*, 2019) Preeklamptilistest rasedustest sünnivad lapsed tihti enneaegselt ning väikese kasvuga, samuti suureneb sünnitusjärgselt ema ja loote tõenäosus saada kardiovaskulaarhaiguseid (Rana *et al.*, 2019). 2019. aastal sündis Eestis ligikaudu 1,64% lastest preeklamptilistest rasedustest (Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas, 2019).

*FLT1* (fms-moodi türosiinkinaas 1) geenilt kodeeritakse VEGF (vaskulaarne endoteeli kasvufaktor) retseptorit. VEGF on vajalik angiogeneesi soodustamiseks ja endoteeli normaalseks funktsioneerimiseks. *FLT1* geenilt kodeeritakse ka lahustuvat isovorni sFlt-1, mis omab antiangiogeenset mõju. Preeklamptiliste patsientide veres on märgatud sFlt-1 taseme tõusu. (Ashar-Patel *et al.*, 2017)

*FLT1* geeni ülesvoolu asvas reglaatoralas on hulgaliselt dinukleotiidi korduste rikkaid variante, nt mikrosatelliit rs149427560. Mikrosatelliidid on oma rohkete korduste tõttu polümorfsed ning olenevalt asukohast võivad muutused nende järjestustes mõjutada geenide transkriptsioonitaset. Näiteks varasemalt on näidatud, et dinukleotiidse mikrosatelliidi pikkus *HMOX-1* (heem oksügenaas 1) geeni promootoralas mõjutab selle ekspressioonitaset, pikem variant suurendab riski preeklampsiale (Kaartokallio *et al.*, 2014).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on anda ülevaade preeklampsia patofüsioloogiast ning selle geneetikast. Samuti töötada välja töövoog, et tuvastada *FLT1* geeni regulatoorses alas paiknevaid dinukleotiidsete kordusjärjestuste allelele. Peamiselt keskendus antud töö variandile rs149427560, sest hiljuti läbiviidud ülegenoomses assotsiatsiooniuringus saavutas see statistilise olulisuse seoses preeklampsia riskiga (McGinnis *et al.*, 2017).

Töö teostati Bio- ja SiirdemeditSiini instituudi inimese geneetika õppetoolis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Preeklampsia

### 1.1.1. Preeklampsia iseloomustus

Eklampsiat on dokumenteeritud rohkem kui 2400 aastat ja preeklampsiat (PE) peaaegu 200 aastat. Nende haiguste patofüsioloogiast ei ole senini täielikult aru saadud, mis piirab ka nende ravimist. Praeguseks on tuvastatud, et PE väljakujunemiseks on vajalik platsenta olemasolu ning platsenta eemaldamisel kaovad ka PE kliinilised nähud (Burton *et al.*, 2019). Tervise Arengu Instituudi andmete põhjal oli 2019. aastal Eestis PE esinemissagedus 1,64% ehk 13 953 sünni kohta oli 229 PE juhtu (Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas, 2019).

PE ajalooliselt aktsepteeritud definitsioon on raseduse teises osas kujunev hüpertensioon ja proteiinuuria ehk kõrge valgusisaldus uriinis, mis laheneb pärast sünnitust. PE definitsioonile tehakse kogu aeg täpsustusi ja uuendusi, kuid hüpertensioon on siiani olnud läbiv PE tunnusmärk kõikides definitsioonides. (Burton *et al.*, 2019) Viimastes juhistes ei ole enam proteiinuuria esinemine PE diagnoosiks kohustuslik. Pigem diagnoositakse PE *de novo* hüpertensiooni (süstoolne > 140 mmHg ja diastoolne > 90 mmHg) olemasolul pärast 20 rasedusnädalat, millega kaasneb vähemalt üks järgnevatest sümptomitest: proteiinuuria ja/või ema neeru, maksa või neuroloogiline düsfunktsioon, hemolüüs, trombotsütopeenia või loote kasvupeetus. (Brown *et al.*, 2018)

PE saab klassifitseerida varajaseks (< 34 rasedusnädalat) ja hiliseks (> 34 rasedusnädalat). Varajane PE mõjutab 12–15% kõikidest preeklampsiatilistest rasedustest. Varajast PE-d seostatakse suurema ema/loote suremusega kui hilist PE-d. Arvatakse, et hiline PE tuleneb pigem ema halvast kohanemisest raseduse füsioloogiliste stressidega ning varajane PE on peamiselt platsenta vigase implantatsiooni tulemus, mille tõttu suureneb antiangiogeensete faktorite kogus ema vereringes. Varajane PE on seotud ka SGA-ga (gestatsiooniaja kohta väikesed vastsündinud), mille tulemuseks on imikud sünnikaaluga alla kasvukõvera 10. protsentiili. (Brown *et al.*, 2018).

Tõsine PE võib edasi areneda eklampsiaks, mida iseloomustavad epileptilised krambihood (Chaiworapongsa *et al.*, 2014) või HELLP sündroomiks (hemolüüs, maksaensüümide suurenenud aktiivsus ja madal vereliistakute tase veres), mida iseloomustab komplementvalkude düsregulatsioon (Rana *et al.*, 2019).

### 1.1.2. Riskifaktorid

PE on ettearvamatu sündroom, mis ei ole emale ja lootele suureks terviseohuks ainult raseduse ajal, vaid suurendab mõlemal ka südameveresoonkonna haiguste pikaajalist riski. Tuntud PE riskifaktorid (Tabel 1) on esimene sünnitus, neerupuudulikkus, krooniline hüpertensioon, ülekaalulisus, ema kõrge vanus, geneetiline eelsoodumus ja raseduseelne- või rasedusdiabeet. (Staff 2019)

PE esineb sageli noortel naistel esimese rasedusega. Arvatakse, et see on ema immuunsusmehhanismi tõttu, mis kujundab tolerantsi isa alloantigeenide vastu pärast seemnevedelikuga või spermaga kokkupuutumist. Arvatakse, et pikaajaline kokkupuude seemnevedelikuga vähendab PE saamise riski, mis võib ka seletada, miks PE-d esineb rohkem naistel, kellel on väike ajavahe esimese vahekorra ja viljastumise vahel. PE riskile on pakutud välja ka isaline komponent, mida kutsutakse “ohtliku isa” hüpoteesiks, mille kohaselt mehed, kes on varasemalt isaks olnud PE rasedusele, suurendavad ka uue partneri PE riski. (Chaiworapongsa *et al.*, 2014)

**Tabel 1.** Preeklampsia riskifaktorid

<b>Kaasumise aeg</b>	<b>Riskifaktor</b>
<b>Enne rasedumist</b>	Esimene rasedus
	Ema kõrge vanus (> 40 aastat)
	Ema ülekaalulisus (risk kasvab lineaarselt pärast KMI= 28)
	Krooniline hüpertensioon
	Raseduseelne diabeet
	Neerupuudulikkus
	Autoimmuunhaigused
	Väike ajavahe esimese vahekorra ja sünnituse vahel, uus seksuaalpartner, suur ajavahe kahe raseduse vahel
	Eelnev ajalugu PE-ga endal või lähisugulastel
	Viljatusravi
<b>Raseduse ajal</b>	Suur platsenta
	Loote kasvupeetus (FGR)
	rasedusdiabeet
	Angiogeensete faktorite düsregulatsioon
	Emakaarteri sälk

Kohandatud Staff 2019 alusel.

KMI – kehamassiindeks

### 1.1.3. Preeklampsia prognoos, diagnoos ja ravi

ASPRE (Kombineeritud multimarkeri uuring ja pisteline patsientide ravi aspiriiniga preeklampsia ennetamiseks) uuringus kasutatav algoritm on paljutöötav PE prognoosiks ja raviks esimesel trimestril. Algoritm kombineerib emapoolsed faktorid, keskmise arteriaalse vererõhu, emakaarterite pulsatiilsusindeksi ja ema seerumi rasedusega seotud plasma valk-A (PAPP-A) ning platsenta kasvufaktori (PIGF) taseme 11–13 rasedusnädalal. Selle abil suudeti tuvastada 76,6% varajase PE ja 38,3% hilise PE juhtudest, valepositiivsete määr oli 10%. Samas uuringus raviti naisi, kelle risk varajaseks PE-ks oli > 1 100-st, aspiriiniga (150 mg päevas), kontrollgrupile manustati platseebot. Aspiriiniga ravitud naistel vähenes varajase PE esinemissagedus 62%. (Rolnik *et al.*, 2017)

Paljudes juhendites mainitakse angiogeensete biomarkerite kasutamist PE diagnoosil, näiteks ESC (Euroopa Kardioloogide Selts) 2018. aastal avaldatud juhendis soovitatakse sFlt-1/PIGF suhte kasutamist PE välistamiseks (Regitz-Zagrosek *et al.*, 2018). Selleks, et sFlt-1/PIGF suhte põhjal välistada varajase PE tekkimist, peab suhte väärtus olema teisel trimestril madalam kui 38 (Zeisler *et al.*, 2016). Hilise PE välistamiseks peab tegema sFlt-1/PIGF testi kolmandal trimestril (Birdir *et al.*, 2018). sEng ja sFlt-1 kombineeritud analüüs teisel trimestril on samuti hea viis varajase PE ennustamiseks (Stepan *et al.*, 2008). Antiangiogeensete faktorite kasutamine biomarkeritena hilise PE diagnoosiks ei ole nii tõhus (Redman ja Staff, 2015).

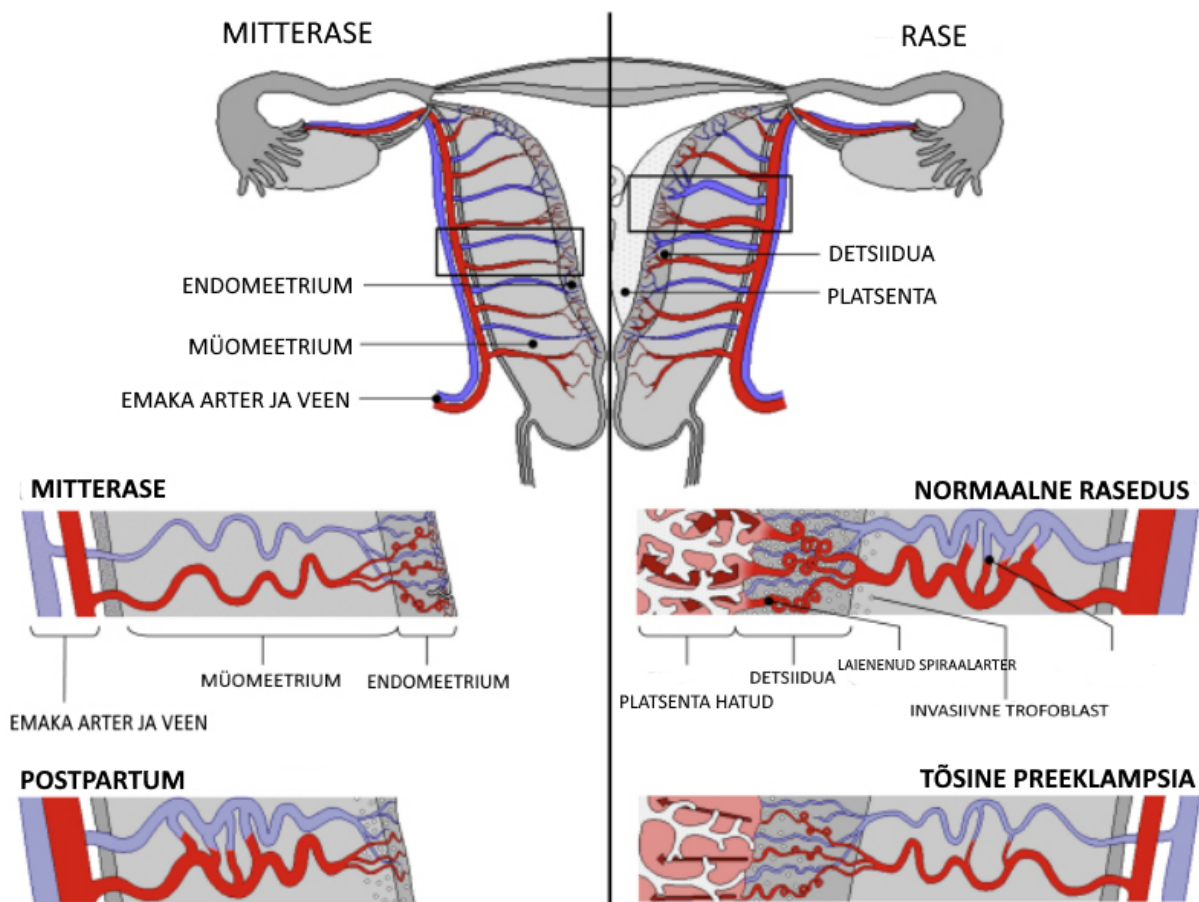
ISSHP (International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) soovitab ravida suure PE riskiga naisi aspiriiniga enne 20 rasedusnädalat (75–162 mg/d), samuti manustada kaltsiumipuuduse esinemisel kaltsiumit (1,2–2,5 g/d). Raseduse ajal peaks jätkama regulaarse trenniga, et hoida tervislikku kehakaalu ja langetada kõrge vererõhu tekkimise tõenäosust. (Brown *et al.*, 2018)

PE-ga patsientidel peaks toimuma pidev loote (loote biomeetria ja lootevedeliku hindamine, doppleruuringud ja ultraheliuuringud) ja ema püsikontroll (vererõhu-uuringud ja proteiinuuria korduv hindamine, kui proteiinuuriat pole veel täheldatud, ning vereproovid, et hinnata trombotsüütide ja maksa transaminaaside taset). PE-ga naistel on soovitatav sünnitada 37. rasedusnädalani jõudes, enne seda on soovitatav hoida PE sümptomeid kontrolli all, näiteks langetada vererõhku antihüpertensiivsete ravimitega. Naised, kellel esineb proteiinuuria ja

väga kõrge vererõhk ( $\geq 160/110$  mmHg), peaksid manustama  $MgSO_4$  konvulsioonide raviks. (Brown *et al.*, 2018)

#### 1.1.4. Platsenta roll preeklampsia patogeneesis

Emakat varustab verega kaks arterit, mis hargnevad mediaalselt mitu korda väiksemateks arteriteks ning läbivad emaka müomeetriumi ehk lihaskesta. Lõpuks moodustuvad tugevalt keerdunud arterid ehk spiraalarterid, mis paiknevad emaka endomeetriumis. (Burton *et al.*, 2009)



**Joonis 1.** Arterite paiknemine emakas, spiraalarterite võrdlus normaalses ja preeklamptilises raseduses, pärast rasedust ja mitterasedana (kohandatud Burton *et al.*, 2009 alusel).

Normaalsetes rasedustes edeneb trofoblastide invasioon müomeetriumi, mis viib spiraalarterite laienemiseni, et verevool saaks suureneada. Transformatsiooni käigus kaovad arterite seintest silelihas ja elastne laamina, selle tulemusel spiraalarterid laienevad. PE

patsientidel ei tunni piisavas koguses tsütotrofoblaste emaka müomeetriumi ning ei laienda sellepärast spiraalartereid nii nagu normaalses raseduses (Joonis 1). Selle tagajärjel tekib platsenta isheemia. (Burton *et al.*, 2009)

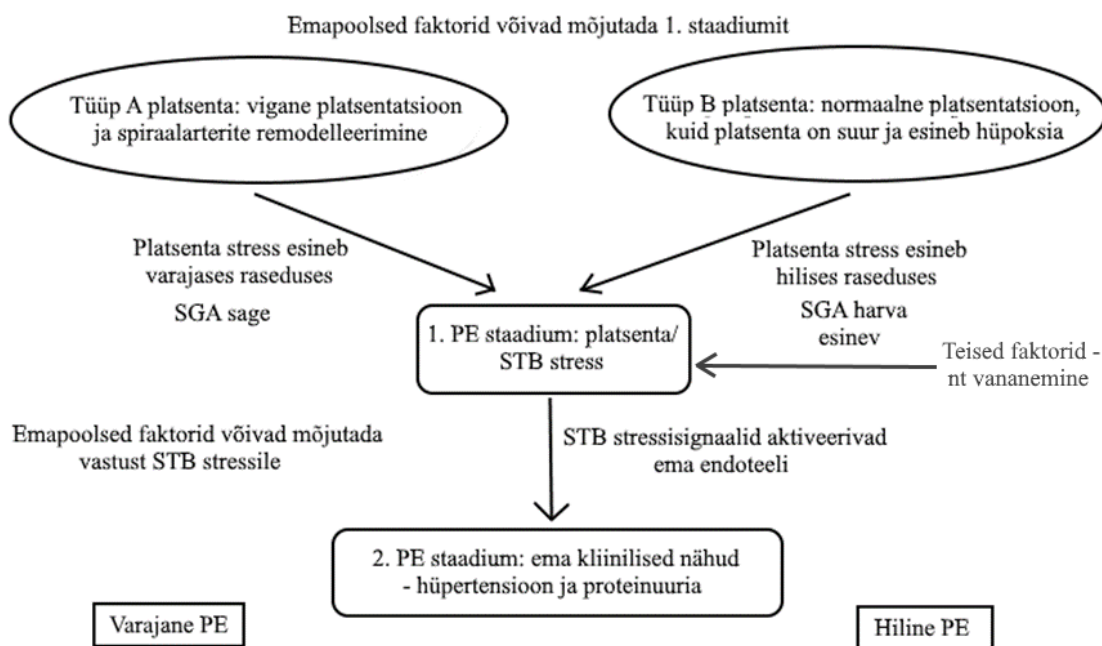
Spiraalarterite füsioloogilise transformatsiooni nurjumine pole iseloomulik ainult PE-le ning pole selle ainus tekkepõhjus, vaid seda on täheldatud ka spontaanses abordi, loote surma, platsenta abrupsiooni ja varajase sünnituse korral (Chaiworapongsa *et al.*, 2014).

1991. aastal töötas Redman välja PE kahe staadiumi mudeli, mille keskpunktiks oli platsenta. Enne kahe staadiumi mudeli välja töötamist vaadati PEd kui rasedate hüpertensiivset haigust, kus sekundaarseid sümptomeid, nt proteinuuriat ja kõrget vererõhku, peeti primaarseteks. Esmases kahe staadiumi mudelis oli esimene platsenta staadium, mis on tekitatud spiraalarterite vigasest remodelleerimisest. Teine on maternaalne staadium, mis on esimese staadiumi tagajärg ning kus avalduvad PE-le iseloomulikud sümptomid (Redman, 1991).

Alates PE kahe staadiumi mudeli väljatöötamisest on mudel oluliselt täienenud, näiteks 2003. aastal tehti avastus, mis parandas esimese ja teise staadiumi omavahelist seotust. Nimelt avastati, et mõned trofoblastidest tulenevad markerid on tugevalt seotud PE-ga, nendeks on antiangiogeensed faktorid sFlt-1 ning sEng (lahustuv endoglobiin) ja pro-angiogeensed faktorid VEGF ning PlGF. Faktorid sFlt-1 ja sEng on PE rasedustes võrreldes normaalsete rasedustega kõrgenenud tasemega ning PlGF kontsentratsioon on madalam. (Maynard *et al.*, 2003)

2014. aastal töötati välja täiendatud mudel, mis hõlmab ka hilises PE korral esinevat platsenta liigset suurenemist. See takistab hattudevahelist perfusiooni ning tekitab STB hüpoksiat ja stressi samamoodi nagu vigane platsentatsioon varajases PE-s. Seega hilisel ja varajasel PE-l on erinevad rajad, mis tekitavad emal samu kliinilisi sümptomeid. (Redman *et al.*, 2014)

Kõige hiljutisem PE kahe staadiumi mudel arendati välja 2019. aastal, see hõlmab ka emapoolseid ja platsenta faktoreid, mis mõjutavad PE mõlema staadiumi kulgu (Joonis 2) (Staff 2019).



**Joonis 2.** Uuendatud preeklampsia kahe staadiumi mudel kahe peamise rajaga kliinilise preeklampsiani (kohandatud Staff 2019 alusel)

Tüüp A platsenta – platsenta, mis esineb varajase PE-ga naistel; Tüüp B platsenta – platsenta, mis esineb hilise PE-ga naistel; STB – süntsüüsiotrofoblastid; SGA – gestatsiooniaja kohta väike vastündinu.

## 1.2. Preeklampsia geneetilised faktorid

PE perekondliku ajaloo ning selle taasesinemise seost on juba ammu täheldatud just selle varajase vormi korral, mis viitab, et PE-l on geneetiline eelsoodumus. PE päritavuse hinnang on umbes 31–54% vahel. Pool PE perekondlikust agregatsioonist on ema geneetiliste faktorite tõttu, ülejäänud osa moodustavad loote geneetilised faktorid ja keskkondlikud mõjud. (Yong *et al.*, 2018)

Selleks, et leida PE geneetilisi riskifaktoreid, tehakse kandidaatgeenide ja ülegenoomsed uuringud. Kandidaatgeenide uuringud on enamjaolt keskendunud geenidele, mis on seotud endoteeli funktsiooniga, hemodünaamikaga, immuunreaktsiooniga, lipiidide metabolismiga, oksüdatiivse stressiga ja trombofiliaga (Yong *et al.*, 2018). Tabel 2. on kujutatud levinumad preeklampsilistes platsentades ülesreguleeritud geenid.

**Tabel 2.** Platsentas ülesreguleeritud kandidaatgeenid

Geen	Ekspressiooni muutus kordades (FC)	Viide
<i>LEP</i>	↑2,7	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2015
	↑1,5	Söber <i>et al.</i> , 2015
<i>NRIP1</i>	↑1,3	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2015
	↑1,7	Söber <i>et al.</i> , 2015
<i>SASH1</i>	↑1,5	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2015
	↑1,6	Söber <i>et al.</i> , 2015
<i>FLT1</i>	↑4,3	Ashar-Patel <i>et al.</i> , 2017
	↑2,0	Söber <i>et al.</i> , 2015
<i>ENG</i>	↑3,0	Ashar-Patel <i>et al.</i> , 2017
<i>INHA</i>	↑2,8	Ashar-Patel <i>et al.</i> , 2017
<i>INHBA</i>	↑2,5	Ashar-Patel <i>et al.</i> , 2017
<i>VEGFA</i>	↑2,2	Ashar-Patel <i>et al.</i> , 2017
<i>PAPPA2</i>	↑2,6	Ashar-Patel <i>et al.</i> , 2017

↑ – ülesreguleeritud; FC – ingl *fold change* ‘ekspressiooni muutus kordades’;

Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (GWAS) on aidanud mõista paljude levinud haiguste geneetilist tausta. Hiljutise GWAS-i käigus tuvastati oluline loote genoomi ala 13. kromosoomil *FLT1* geeni lähedal millel on seos preeklampsiaga (McGinnis *et al.*, 2017).

Sealses lookuses asuv rs4769613 oli PE-ga seotud ka replikatsioonialal (P =  $3.6 \times 10^{-4}$ ) ning GWAS ja replikatsioonandmete meta-analüüs näitas rs4769613 veelgi tugevamat seost (P =  $5.4 \times 10^{-11}$ ) (OR = 1,21, 95% CI). Leiti, et *FLT1* lookuses olevad assotsiatsioonisignaalid jäid alles ka siis, kui analüüs kohandati rs4769613 efektile. See näitab, et teised *FLT1* geeni lähedal olevad variandid on preeklampsiaga rs4769613 efektist sõltumatult seotud. Pärast 21 *FLT1* piirkonnas asuva variandi genotüpiseerimist täiendavates valimites, leiti, et rs12050029 ja rs149427560 on samuti PE-ga oluliselt seotud (Tabel 3). (McGinnis *et al.*, 2017)

2020. aastal tehtud suur GWAS metaanalüüs Kesk-Aasiast ja Euroopast pärit preeklampsiatilistest rasedustest sündinud patsientide peal oli tulemuslik. Leiti 3 varianti (rs4769612, rs9508092 ja rs71433277) 13. kromosoomil (Tabel 3), mis on seotud PE esinemisega ning mis asuvad *FLT1* geeni regulatoorses regioonis. rs4769612 on varasemalt avastatud rs4769613 variandiga tugevas aheldustasakaalutuses (LD) ( $r^2 = 0.99$ ). Samas uuringus leiti kaks ema genoomset varianti, mis on seotud PE-ga. Üks neist (rs259983) asub *FTO* (alfa-ketoglutaradiidist sõltuv dioksügenaas) geeni lookuses ja teine (rs1421085) *ZNF831* (tsink sõrme valk 831) geeni lookuses (Tabel 3). (Steinthorsdottir *et al.*, 2020)

McGinnis'e ja Steinthorsdottir'i GWA uuringud on PE-ga seotud genoomsete variantide leidmisel olnud seni kõige edukamad. PE-ga seotud variantide leidmiseks on tehtud palju GWAS-e, kuid kõikidest pole olulisi tulemusi leitud. Tabel 4 on näha statistilise olulisuse piirist alla jäänud SNP-id, mis võivad olla potentsiaalsed PE-ga seotud riskivariandid, kuid selle tõestamiseks peab tegema rohkem uuringuid.

**Tabel 3.** Ülegenoomsetes uuringutes avastatud preeklampsiaga seotud loote ja ema genoomsed variandid

Variant	Positsioon chr;pos	Lähim geen	P-väärtus	Viide
rs4769613	13: 28564472	<i>FLT1</i>	$5.4 \times 10^{-11}$	McGinnis <i>et al.</i> , 2017
rs12050029	13: 28653382	<i>FLT1</i>	$3.0 \times 10^{-6}$	McGinnis <i>et al.</i> , 2017
rs149427560	13: 28531734–28531746	<i>FLT1</i>	$4.1 \times 10^{-5}$	McGinnis <i>et al.</i> , 2017
rs4769612	13: 28564361	<i>FLT1</i>	$3.0 \times 10^{-11}$	Steinhorsdottir <i>et al.</i> , 2020
rs9508092	13: 28612025	<i>FLT1</i>	$3.0 \times 10^{-9}$	Steinhorsdottir <i>et al.</i> , 2020
rs71433277	13: 28644830	<i>FLT1</i>	$6.6 \times 10^{-6}$	Steinhorsdottir <i>et al.</i> , 2020
rs259983	20: 59160402	<i>FTO</i>	$2,9 \times 10^{-10}$	Steinhorsdottir <i>et al.</i> , 2020
rs1421085	16: 53767042	<i>ZNF831</i>	$1,2 \times 10^{-9}$	Steinhorsdottir <i>et al.</i> , 2020

chr – kromosoom; pos – positsioon

**Tabel 4.** Ülegenoomsetes uuringutes avastatud võimalikud PE-ga seotud ema genoomsed variandid

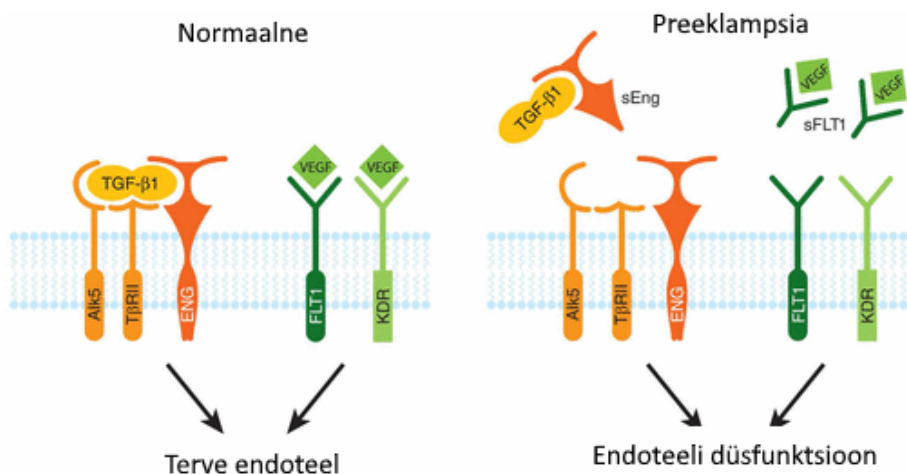
Variant	Positsioon chr:pos	Lähim geen	P-väärtus	Viide
rs1426409	4: 36850339	<i>NWD2</i>	$3,1 \times 10^{-6}$	Zhao <i>et al.</i> , 2012
rs17686866	1: 215251888	<i>ESRRG</i>	$3,8 \times 10^{-6}$	Zhao <i>et al.</i> , 2012
rs9831647	3: 8546110	<i>LMCD1</i>	$9,4 \times 10^{-6}$	Zhao <i>et al.</i> , 2012
rs10743565	12: 25551846	<i>LMNTD1</i>	$1,6 \times 10^{-5}$	Zhao <i>et al.</i> , 2012
rs3803339	15: 43432334	<i>TP53BP1</i>	$5,8 \times 10^{-3}$	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2016
rs61747120	19: 3834865	<i>ZFR2</i>	$2,4 \times 10^{-2}$	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2016
rs113926353	11: 430339	<i>ANO9</i>	$4,8 \times 10^{-2}$	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2016
rs142394560	12: 29633193	<i>TMTC1</i>	$4,8 \times 10^{-2}$	Kaartokallio <i>et al.</i> , 2016
rs7579169	2: 120360548	<i>INHBB</i>	$3,6 \times 10^{-7}$	Johnson <i>et al.</i> , 2012
rs12711941	2: 120365807	<i>INHBB</i>	$4,3 \times 10^{-7}$	Johnson <i>et al.</i> , 2012

chr – kromosoom; pos – positsioon

### 1.2.1. *FLT1*

FLT1 rajal on keskne roll PE patogeneesis. PE kliinilised nähud tulenevad liigsetest antiangiogeensetest valkudest, peamiselt sFlt-1-st, ema vereringes. sFlt-1 on kärbitud versioon membraanile kinnitunud VEGF retseptorist FLT1 (ehk VEGFR1). sFlt-1 sisaldab rakuvälist seondumiskohta, mis on ka VEGF retseptorites, kuid sFlt-1 molekule eritatakse, sest neil puuduvad transmembraanne ja rakusisene türosiinkinaasi domeen. Kui sFlt-1 on ema vereringes ebanormaalselt kõrge kontsentratsiooniga, siis see takistab keha reageerimist VEGF molekulidele, s.t takistab VEGF molekulide seondumist retseptoritele (Joonis 3).

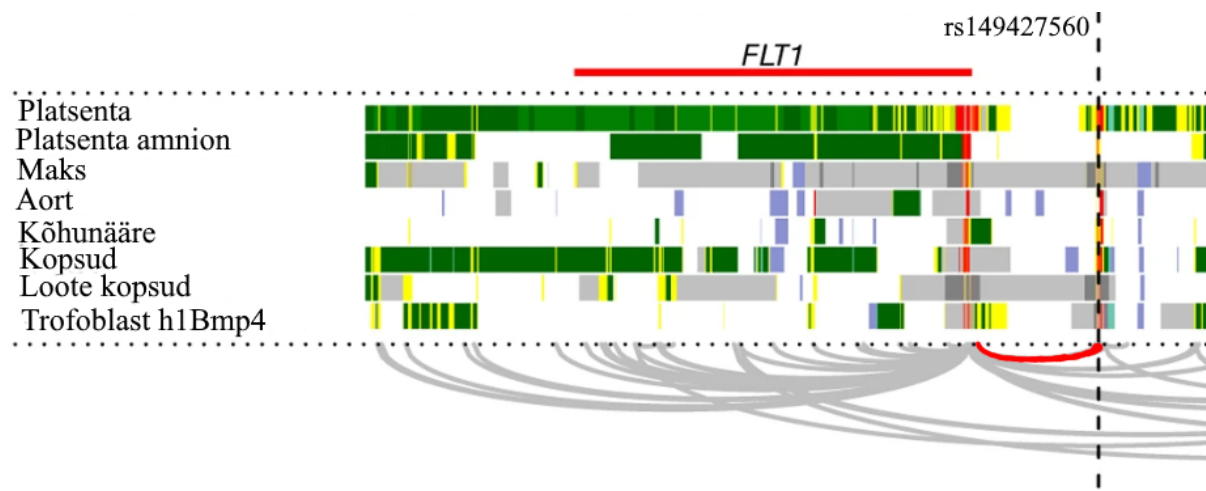
(Ashar-Patel *et al.*, 2017) Lisaks angiogeneesi soodustamisele on need faktorid veel vajalikud endoteeli normaalse struktuuri ja funktsiooni tagamiseks (Redman ja Staff 2015).



**Joonis 3.** Sekreteeritavate antiangiogeensete faktorite mõju endoteelile preeklampsias võrrelduna normaalse platsentaga (kohandatud Rana *et al.* 2019 alusel)

#### 1.2.1.1. rs149427560

On ennustatud, et rs149427560 asub TssA alas, mis on aktiivne transkriptsiooni alguspunkt ning kromatiini interaktsioonid selles regioonis viitavad sellele, et rs149427560 interakteerub *FLT1* geeni alguspiirkonnaga (Joonis 4) (McGinnis *et al.*, 2017).



**Joonis 4.** *FLT1* transkriptsiooni aktiivsus ja rs149427560 aktiivsus erinevates kudedes ning kromatiini interaktsioonid. rs149427560 on märgitud punktiirjoonega; roheliselt on märgitud transkriptsiooniliselt aktiivsed alad; punased alad on aktiivsed transkriptsiooni alguspunktid; kollased alad on enhaanseralad; lillaga on märgitud heterokromatiinsed alad; kromatiini

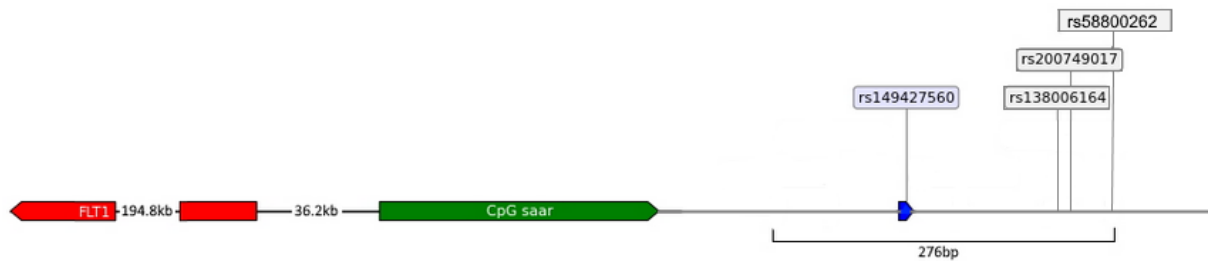
interaktsioonid on märgitud hallide joontega; punase joonega on märgitud interaktsioon rs149427560 ja *FLT1* vahel (kohandatud McGinnis *et al.*, 2017 alusel)

rs149427560 on intergeenne variant, mis asub 13. kromosoomil ning *FLT1* geenist 36 589 aluspaari kaugusel. rs149427560 läheduses on ka teisi levinumaid kordusjärjestusi (Tabel 5, Joonis 5) (minoorse alleeli sagedus  $\geq 0,01$ ), milleks on rs138006164, rs200749017 ja rs58800262.

**Tabel 5.** Levinumad mikrosatelliidid ja teised piirkonna pikkust mõjutavad variandid rs149427560 läheduses, nende positsioon ja minoorse alleeli sagedus.

Variant	Alleelid	Positsioon chr:pos	MAF
rs149427560	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G/[(GT) <sub>5</sub> G] <sub>M</sub> / (GT) <sub>7</sub> G	13: 28531734–28531746	0,061
rs138006164	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>3</sub> G/[(GT) <sub>4</sub> G] <sub>M</sub> / (GT) <sub>6</sub> G	13:28531858–28531868	0,035
rs200749017	(GT) <sub>4</sub> G/[(GT) <sub>3</sub> G] <sub>M</sub>	13:28531869–28531877	0,025
rs58800262	(GT) <sub>9</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>7</sub> G/ [(GT) <sub>8</sub> G] <sub>M</sub> /(GT) <sub>10</sub> G/(GT) <sub>11</sub> G/ (GT) <sub>12</sub> G/(GT) <sub>13</sub> G/(GT) <sub>15</sub> G/ (GT) <sub>16</sub> G	13:28531923–28531941	0,086

[ ]<sub>M</sub> – minoorne alleel; MAF – minoorse alleeli sagedus; chr – kromosoom; pos – positsioon; minoorse alleeli sagedusena on kasutatud CEU (Utah elanikud, kes põlvnevad Põhja- ja Lääne-Euroopast) populatsiooni. Andmed on võetud Ensembl andmebaasist, versioon 103 (Howe *et al.*, 2021)



**Joonis 5.** *FLT1* variandi rs149427560 läheduses paiknevad teised piirkonna pikkust mõjutavad variandid

Andmed on võetud Ensembl andmebaasist, versioon 103 (Howe *et al.*, 2021)

### 1.3. Mikrosatelliidid

Mikrosatelliidid (MS) on lühikesed kordusjärjestused (STR) DNA-s, mille baasühiku suurus võib varieeruda vahemikus 1–6 aluspaari (bp) ning mille alleelid on väga polümorfseid. MS-e on rohkesti nii intra- ja intergeensetes genoomi osades. Umbes 17% inimgeniidest sisaldab mikrosatelliite intergeensetes osades, intrageensed MS-id mängivad suurt rolli geeniekspressiooni reguleerimisel. (Baptiste *et al.*, 2013)

Enamik MS-e on neutraalsed, kuid mõned neist mõjutavad geeniekspressiooni, splaissingut või valgu järjestust. Kõige levinum MS-de mutatsioonimudel on DNA sünteesi ajal toimuv ahela libisemine, kus MS-de tõttu toimub suurema tõenäosusega DNA ahelate valepaardumine. DNA ahela valepaardumise tagajärjel võib kordusühik deleteeruda või duplikeeruda. MS-de mutatsioonikiirus võib tuleneda mikrosatelliidi omadustest, näiteks korduse arv ja järjestus. (Kelkar *et al.*, 2010)

Tervetel inimestel on üle genoomi jaotatud kümneid tuhandeid STR-e. Normaalse pikkusega STR-id on tavaliselt stabiilsed somaatilistes kudedes ning gameetides. Mõned STR-id läbivad pikenemise nii keha- kui sugurakkudes ning muutuvad mutatsioonilisteks kordusjärjestusteks, mis viivad haigusteni. Haigustega seotud STR-id (daSTR) varieeruvad pikkuselt, asukohalt ja järjestuselt. Peamiselt koosnevad daSTR-id trinukleotiidsetest ühikutest, kuid on ka leitud suuremaid (tetra-, penta-, heksanukleotiidseid). (Sun *et al.*, 2018)

### 1.3.1. Dinukleotiidsed mikrosatelliidid

Mitmed uuringud on näidanud, et kordusjärjestused võivad olla mittekorduvatest lookustest suurema mutatsioonikiirusega alates mingist kindlast kordusarvust. Sellised vaatlused on andnud aluse lävendi hüpoteesile, mis ütleb, et on olemas kriitiline kordusarv või pikkus, mille ületamisel STR muutub MS-iks (Ananda *et al.*, 2013). Dinukleotiidsetele kordusjärjestustele on lävendiks 5 ühikut ehk 10 bp-d (Baptiste *et al.*, 2013).

Uuringud inimeste idutee mutatsioonidest dinukleotiidsetes MS-ides näitasid, et pigem toimub MS-i pikenemine kui lühenemine. Selliseid mustreid on leitud ka tetranukleotiidsetes MS-ides, mis näitab, et tendents pikenemise või lühenemise poole sõltub MS-i pikkusest (Baptiste *et al.*, 2013).

Alleelipikkuse variandid kindlates dinukleotiidsetes MS-i lookustes on paljude haiguste geneetilised riskifaktorid. Näiteks rinnavähi puhul polümorfse alleeli [GT/CA] pikkus EGFR (epidermaalse kasvufaktori retseptor) geenis korreleerub transkriptsiooniga ehk EGFR geeni ekspressioon on kõrgem [GT/CA]<sub>15</sub> alleelides kui [GT/CA]<sub>18</sub> alleelides. Mutatsioonid eksonite dinukleotiidides võivad mõjutada valgusjärjestust ja funktsiooni. Näiteks vähipatsientidel tuvastati pea- ja kaelakasvajates eksonite dinukleotiidide ebastabiilsus 14s vähiga seotud geenis. (Baptiste *et al.*, 2013)

### 1.3.2. Haigustega seotud lühikesed kordusjärjestused

Ebastabiilne STR-ide laienemine põhjustab muuseas fragiilse X-i sündroomi (FXS), Huntingtoni tõbe, amüotroofset lateraalskleroosi ja Friedrichi ataksiat (FRDA). Sellised mutatsioonid algavad umbes 35–40 kordusest ning võivad jõuda sadade kordusteni. (Bagshaw 2017)

FXS on geneetiline haigus, mis kandub edasi X-kromosoomiga. See on põhjustatud trinukleotiidi CGG ebanormaalsest laienemisest FMR1 (FMRP translatsiooniline regulaator 1) geeni 5' mittetransleerivas osas. Tegemist on dünaamilise mutatsiooniga – CGG laieneb igas põlvkonnas eelmutatsioonilisest vahemikust (55–200 kordust) täieliku mutatsioonini, kui ema annab selle edasi oma lastele. Isikud, kellel on FXS, omavad rohkem kui 200 CGG trinukleotiidi kordust (Saldarriaga *et al.*, 2014). FMR1 geen on vaigistatud, sest toimub DNA-RNA hübridisatsioon mRNAs oleva korduse ja geeni enda vahel (Colak *et al.*, 2014).

Premutatsiooni (55–200 kordust) kandjad ei oma klassikalist FXS fenotüüpi, kuid neil võib esineda teisi meditsiinilisi, psühhiaatrilisi ja neuroloogilisi probleeme. (Saldarriaga *et al.*, 2014)

FRDA on autosomaalne retsessiivne degeneratiivne haigus, mis peamiselt mõjutab närvisüsteemi ja südant. FRDA on kõige levinum pärilik ataksia Euroopas. FRDA on põhjustatud valgu frataxin (FXN) puudusest, FXN on vajalik mitokondri raua metabolismis ning selle puudumisel areneb patsientidel välja neurodegeneratiivsus sensoorsetel ja spinotserebellumi neuronitel, samuti kardiomiopaatia ja diabeet. Enamikul FRDA patsientidel esineb GAA korduse patogeeniline laienemine esimese *FXN* introni sees. Normaalsetel isikutel on umbes 38 GAA kordust, FRDA patsientidel esineb umbes 70. FXN valgu puudus tuleneb *FXN* geeni vähenenud transkriptsioonist, mille põhjuseks on pakutud mitmeid mudeleid, kuid siiani on kõige püsivam mudel GAA kordustest tingitud DNA struktuuri muutus, mis takistab RNA polümeraasi tööd. (Punga *et al.*, 2010)

Heem-oksügenaas (HO) on ensüüm, mis vastutab heemi lagunemise eest. HO isovorm HO-1, mida kodeeritakse *HMOX1* (heem-oksügenaas 1) geenilt, reguleerib antioksidantide, põletikuvastaseid, vasodilatsiooni ja angiogeenseid funktsioone. Platsenta HO-1 ekspressioon suureneb raseduse ajal, kuid HO-1 roll raseduses pole kindlaks tehtud. PE rasedustes on dokumenteeritud vähenenud *HMOX-1* ekspressiooni ja HO-1 valgu taset. HO-1 inhibeerib antiangiogeensete faktorite avaldumist, mille ekspressioon PE rasedustes suureneb. (Kaartokallio *et al.*, 2014)

*HMOX-1* geeni promootoralas on cis-regulaatorsed mikrosatelliitvariandid. (GT)<sub>n</sub> lühem alleel ( $\leq 25$  kordust) on seotud suurema *HMOX1* ekspressiooniga kui pikem alleel ( $> 25$  kordust). 2014 aastal tehtud uuring Kaartokallio ja tema meeskonna poolt näitas, et pikk (GT)<sub>n</sub> mikrosatelliidi variant *HMOX1* geeni promootoralal on seotud suurenenud riskiga hilisele PE-le ja PE-le, mis ei ole seotud FGR-iga. (Kaartokallio *et al.*, 2014)

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid ja hüpotees

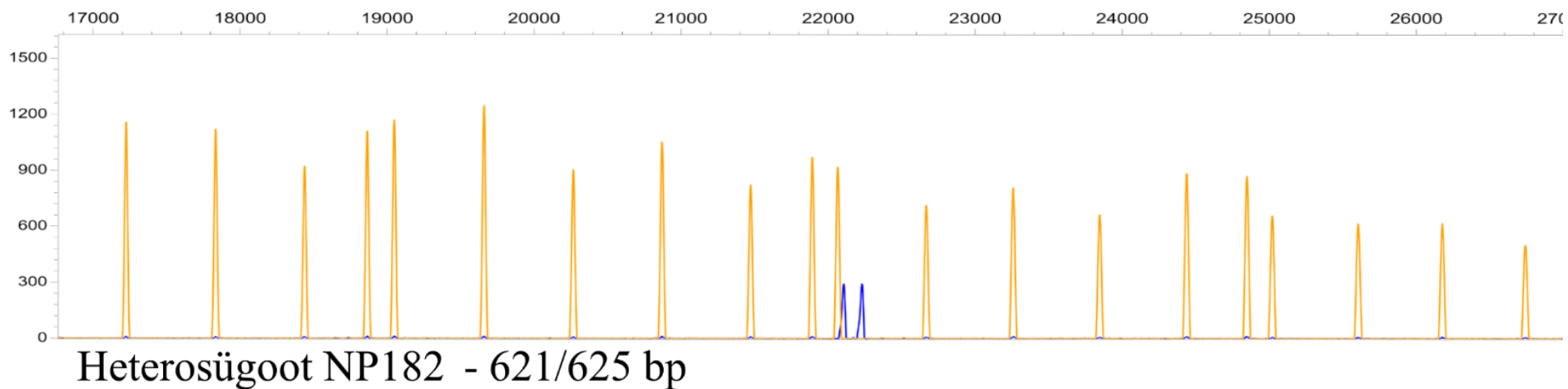
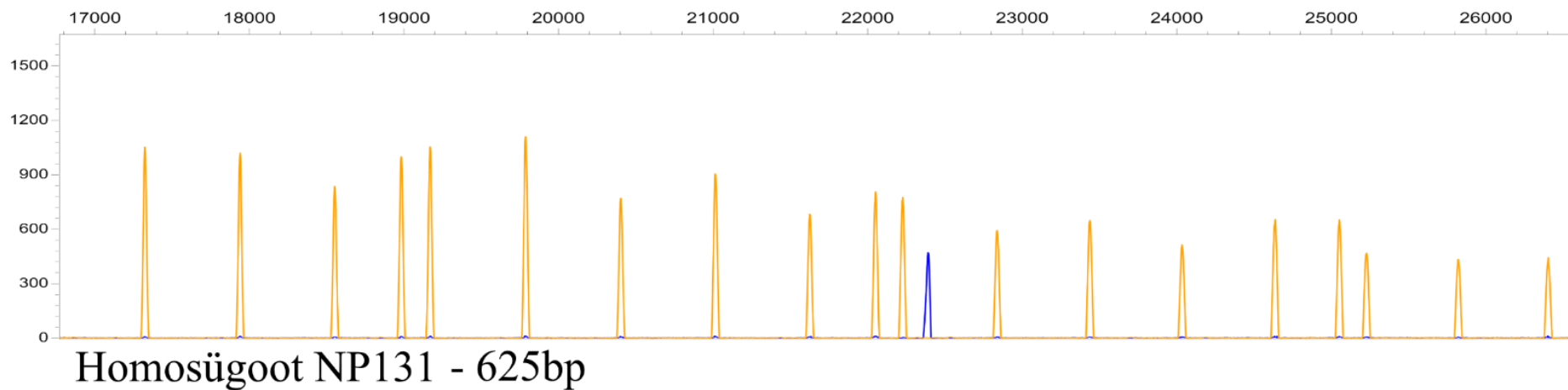
Käesoleva töö eesmärgiks on:

- a) anda teaduskirjanduse alusel ülevaade preeklampsiast ja *FLT1* geeni mõjust preeklampsia riskile;
- b) töötada välja töövoog, et tuvastada *FLT1* geeni regulaatoralas paiknevaid dinukleotiidseid variatsioone;
- c) disainida PCR-i praimerid, mis võimaldavad amplifitseerida kõige tugevama PCR produkti ja saavutada parima sekveneerimistulemuse;
- d) sekveneerimistulemuste põhjal hinnata, kas fragmentanalüüsist tuvastatud pikkuste arv vastab tegelikule alleelide arvule.

Meie uurimirühmas varasemalt läbi viidud *FLT1* geeni regulaatorala fragmentanalüüsis tuvastati neli erinevat fragmendipikkust. Hüpoteesiks on, et fragmentanalüüsist tuvastatud *FLT1* regulaatorala neli fragmendipikkust vastavad alleelide arvule.

### 2.2. Disain

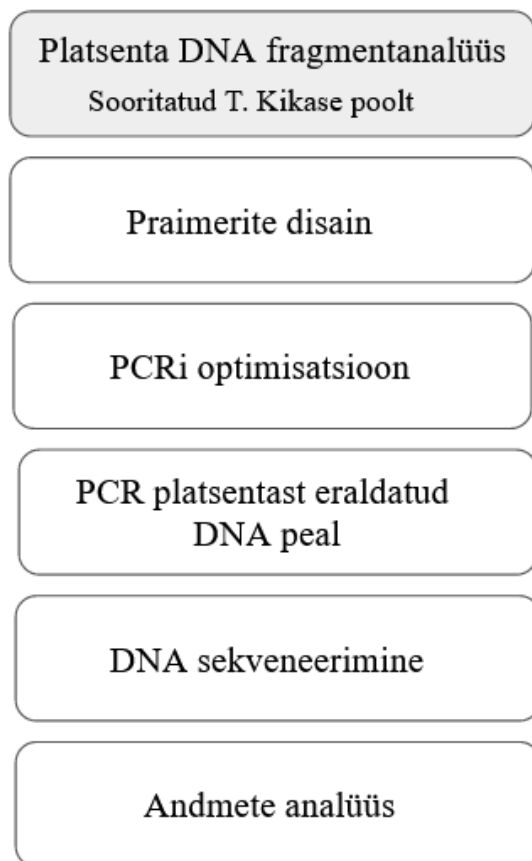
Varasemalt viis minu juhendaja doktorant Triin Kikas oma doktoritöö raames läbi fragmentanalüüsi REPROMETA platsenta proovidest eraldatud DNA peal. Kokku analüüsiti 43 indiviidi, tuvastati neli erineva pikkusega fragmenti (625, 623, 627 ja 621), mis viitavad, et dinukleotiidi korduste rikkas piirkonnas esineb neli erinevat alleeli. Indiviid, kellel esineb kaks erineva pikkusega fragmenti on arvatavasti heterosügoot, ühe fragmendipikkusega indiviidid on tõenäoliselt homosügootid (Joonis 6). Käesolevas töös käsitletakse neist 12 indiviidi. Töösse valiti erinevate fragmendipikkustega indiviide ja lisaks grupp sama fragmendipikkuste kombinatsiooniga indiviide, et tuvastada, kas pikkus vastab ühele kindlale deletsioonile või insertioonile. Kokku on 9 heterosügootset indiviidi – viiel indiviidil esineb fragmendipikkus 623/625, kahel 625/627, ühel 623/627 ning ühel 621/625. Homosügootseid indiviide on kolm, nendel on fragmendipikkusteks 623, 625 ja 627.



**Joonis 6.** Fragmentanalüüsis tuvastatud homosügooti ja heterosügooti näide.

Sinine joon tähistab uuritud fragmendi signaali, kollased jooned on pikkusmarkeri fragmendid; pikkusmarker – LIZ1200

Alleelide lähemaks tuvastamiseks koostasime tööplaani (Joonis 7).



**Joonis 7.** Skeem väljatöötatud töövoe etappidest

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon; DNA – desoksüribonukleinhape; halliga on märgitud etapp, mida selle töö raames ei tehtud

## 2.3. Materjal ja metoodika

### 2.3.1. Valim

REPROMETA ehk “REPROgrammeeritud loote ja/või ema METAbolismi” valim sisaldab kliinilist informatsiooni ning bioloogilist materjali tähtaegsetest üksikrasedustest gestatsiooniajaga 36–42 nädalat. Valim koguti aastatel 2006–2011 ning kogumist koordineeris professor Maris Laan (TÜMRI) koostöös SA TÜK Naistekliiniku dr. Kristiina Rulliga. Osalejatelt võeti informeeritud nõusolek. Uuring on üle vaadatud ja aktsepteeritud Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee poolt (volitus no. 146/18, 27. veebruar, 2006; 150/33, 18. juuni, 2006; 158/80, 26. märts, 2007; 221/T-6, 17. detsember, 2012; 286/M-18, 15. oktoober, 2018). Uuring vastas Helsinki deklaratsiooni juhiste. Hiljuti on antud valimit kirjeldatud järgnevates töödes: Kikas jt, 2019; Pilvar jt, 2019; Reiman jt, 2017.

REPROMETA valim sisaldab perekondade (ema, isa ja laps) (n=366) bioloogilist materjali, kellel esinesid tõsised rasedustüsistused, näiteks PE, gestatsioonidiabeet ja gestatsiooniaja kohta väikesed või suured vastsündinud. Lisaks koguti normaalraseduste bioloogilist materjali, kus eelmainitud komplikatsioone ei esinenud. Käesolevas bakalauresetöös käsitlesin osa fragmentanalüüsis kasutatud indiviide (n=12, mediaan gestatsiooniaeg päevades = 251,5).

### 2.3.2. Praimerite disain

Praimerite disainimiseks kasutasin Primer3web-i (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) versioon 4.1.0 ning Primer-BLAST-i (Ye *et al.*, 2012). Disainisin kokku kuus praimeripaari. Kolm paari andsid 2000–4000 bp suurusjärgus produkti ning kaks paari 600bp suurusjärgus, üks paar oli mõeldud sekveneerimise jaoks. Praimerite disainimisel olid tingimused järgmised: pikkus 18–20 nukleotiidi, G/C sisaldus 40–60% vahel, T<sub>m</sub> ehk praimerite sulamistemperatuur 50–60 °C vahel ja praimeripaaride T<sub>m</sub> vahe kuni 5 °C. Märklaud-DNA järjestuse võtsin *UCSC Genome Browser*’ist, inimese genoomi versiooniks on hg38. Tabel 7 on kujutatud praimerite järjestused.

### 2.3.3. PCR-i optimeerimine

Alustasin NESTED1 praimerite optimeerimisest. Tegin katsed erinevate  $MgCl_2$  kontsentratsioonidega (0,5 mM, 1,5 mM, 2,5 mM ja 3,5 mM), tõstsin dNTP kontsentratsiooni 5 mM peale ning DNA kontsentratsiooni 200 ng/ $\mu$ l peale. Proovisin samu katseid nii tavalise kui ka *touchdown* programmiga. Tegin seeria PCR-e, kus kasutasin eraldi Solis Biodyne 5x *HOT FIREPol Blend Master Mix*'i, Thermo Scientific pika PCR ensüümisegu koos 10x pika PCR puhvriga ning Solis Biodyne 10x PCR reaktsioonipuhvrit  $(NH_4)SO_2$ -ga. Hiljem tein seeria PCR-e betaiini või Fermentas DMSO-ga (dimetüülsulfoksiid).

Tegin analoogse seeria kasutades NESTED2 ja NESTED3 primereid ning DMSO-t või betaiini. Tõstsin DNA kontsentratsiooni 300 ng/ $\mu$ l juurde. Viisin läbi PCR-i tavalise ja *touchdown* programmiga.

Katsetasin PCR1 ja PCR2 primereid. Tõstsin DNA kontsentratsiooni 200 ng/ $\mu$ l peale, ning  $MgCl_2$  ja dNTP kontsentratsioon jäid 2,5 mM juurde. DMSO ja betaiin ei olnud vajalikud.

Viisin läbi *nested* PCR-i NESTED3 ja PCR2 praimeritega. PCR2 praimerite märklaud-DNA-ks kasutasin NESTED3 praimeritega tehtud PCR produkti. Valmistasin mitu erineva DNA sisaldusega segu (0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 1,5  $\mu$ l). Segavate faktorite vähendamiseks produktis viisin läbi puhastamise, selleks kasutasin *Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit*'i ja protokollit. Eraldas geelist *nested* PCR lõppprodukti, selleks kasutasin *ThermoScientific GeneJET Gel Extraction Kit*'i ja protokollit.

Sünteesireaktsiooni viisin läbi *Veriti 96-Well Thermal Cycler* masinaga. PCR produkti olemasolu kontrollisin 1% agarosgeelil (0,5x TBE).

### 2.3.4. Sekveneerimine

Proove sekveneeriti TÜ genoomika instituudi tuumiklaboris Sangeri meetodil kasutades keerulise matriitsi protokollit. Sekventside töötlemiseks kasutasin *BioEdit Sequence Alignment Editor*'i (versioon 7.2.5) ja sekveneerimisandmeid vaatasin ThermoFisher'i pilves *Analysis Module Variant Analysis* tarkvaraga.

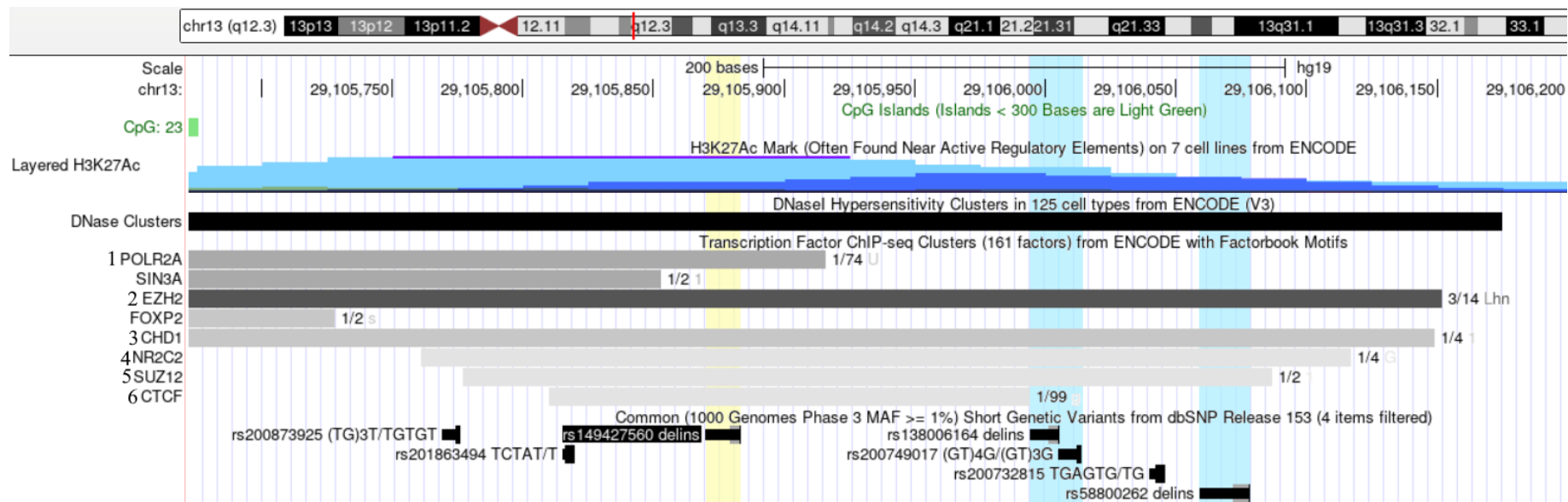
## 2.4. Tulemused

### 2.4.1. Dinukleotiidi korduste rikka piirkonna iseloomustus

rs149427560 läheduses (195 bp kaugusel) asub CpG saar, mis on levinud promootorpiirkondades. Samuti asub piirkonnas histooni atsetüleerimissait H3K27Ac, DNAasi hüpersensitiivsusregioon ja mitmed transkriptsioonifaktorite seondumissaidid. rs149427560 mikrosatelliiti läbivad NR2C2 (ingl *Nuclear Receptor Subfamily 2 Group C Member 2*), POLR2A (ingl *RNA Polymerase II Subunit A*), SUZ12 (ingl *SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*), EZH2 (ingl *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*), CTCF (ingl *Transcriptional Repressor CTCF*) ja CHD1 (ingl *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*) transkriptsioonifaktorite seondumissaidid. Teisi vaadelduid variante (rs138006164, rs200749017 ja rs58800262) läbivad samad transkriptsioonifaktorite seondumissaidid, välja arvatud CTCF ja POLR2A. (*UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu>*, kasutatud on inimgenoomi versiooni hg19). (Joonis 8)

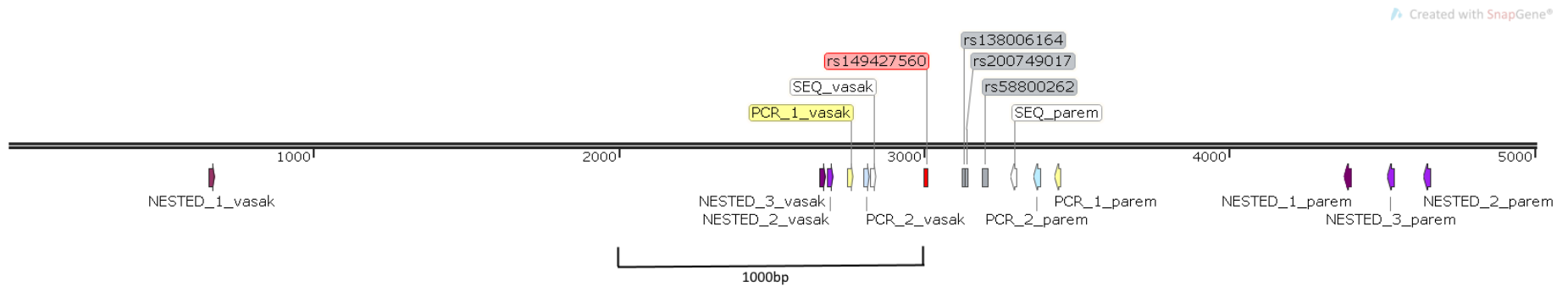
### 2.4.2. Praimerite disain

Piirkonnas rohkelt esinevate dinukleotiidi korduste tõttu on sinna unikaalsete praimerite disainimine keeruline. Sihtmärkala lähedale ei olnud võimalik unikaalseid primereid disainida, PCR1 ja PCR2 praimeritele oli veel teisi produkte ennustatud (Tabel 6). Selle tõttu kasutasin *nested* PCR lähenemist. *Nested* PCR sisaldab kahte järjestikust reaktsiooni erinevate praimeripaaridega. Esimese reaktsiooni produkt on teise märklaud-DNA. Selline meetod suurendab praimerite spetsiifilisust. Selleks disainisime ka kaugemal paiknevad praimerid, mis võimaldasid unikaalse produkti amplifitseerimist (Tabel 7, Joonis 9).



**Joonis 8.** rs149427560 mikrosatelliidi läheduses paiknevad regulatoorsed elemendid

rs149427560 on märgitud kollasega; sinisega on märgitud teised töö raames vaadeldud variandid (rs138006164, rs200749017 ja rs58800262); roheline kast märgistab CpG saart; sinine piklik ala märgistab H3K27Ac ehk histooni atsetüleerimissaiti; must riba märgistab DNaasi hüpersensitiivsust; 1 – POLR2A seondumisala; 2 – EZH2 seondumisala; 3 – CHD1 seondumisala; 4 – NR2C2 seondumisala; 5 – SUZ12 seondumisala; 6 – CTCF seondumisala (UCSC genome browser <http://genome.ucsc.edu>, inimgenoomi versioon hg19)



**Joonis 9.** Praimerite paiknemine rs149427560 ja teiste läheduses asuvate mikrosatelliitide ja piirkonna pikkust mõjutavate variantide suhtes. Tabel 7 on kujutatud praimerite järjestused; punaselt on märgitud rs149427560 mikrosatelliit; hallides kastides on teised piirkonna pikkust mõjutavad variandid (rs138006164, rs200749017 ja rs58800262). (Joonis on tehtud kasutades SnapGene programmi versioon 5.2.4)

**Tabel 6.** Sisemiste praimerite alternatiivsed produktid

Praimerid	Produkt chr:pos/pikkus (bp)
PCR1	6:43967995–43967296/700
	8:10918903–10918352/522
	8:2428880–2428329/522
PCR2	18:14961788–14962397/610
	4:41292940–41292439/502
	4:41292935–41292439/497
	1:237786010–237785321/690

chr – kromosoom; pos – positsioon; bp – aluspaar

**Tabel 7.** Dinukleotiidi korduste rikka piirkonna amplifitseerimiseks kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestused (5'–3')		Produkti pikkus (bp)
	Vasak	Parem	
<i>Sekveneerimise praimerid</i>			
SEQ	ATAGGGTTGTGTGAGGTGTG	ACAGCTAGGTCTCTTTTGCC	480
<i>Sisemised nested PCR praimerid</i>			
PCR1	CAATGTGGCGATGGGGAAG	CTGGGGAGACTTTGGGGAG	698
PCR2	GCGTTTGTTTGATCCTTCCC	CTCTTCTGTTCCATGCTTTTCTT	578
<i>Välimised nested PCR praimerid</i>			
NESTED1	CTGCTGCCCTAACTCTCACT	CATCTGATTTTCTCCGCCGG	3741
NESTED2	GCTGTTTCCTGCATCGTACA	CTGCCTGCTCTAATCCCAAG	1974
NESTED3	TAATTTTCCAGCGCCGACAG	GAAATGCGCCTCTTACCCAG	1880

*Nested* PCR – meetod, kus viiakse läbi kaks järjestikust PCR-i kahe praimeripaariga, teise PCR-i DNA-ks kasutatakse esimese PCR-i produkti

### 2.4.3. Parimate praimerite valik

NESTED1 praimerid töötasid kõige optimaalsemalt kasutades DMSO-t ja pika PCR-i ensüümisegu koos 10x pika PCR puhvriga. PCR-i reagentide segu ja programm on detailsemalt kujutatud Tabel 8, Joonis 10 . NESTED1 praimerite produkt on kujutatud Joonis 12.

**Tabel 8.** PCR NESTED1 praimeritega

Reagentid	kogus ( $\mu$ l) 25 $\mu$ l kohta
DNA	4 (200 ng/ $\mu$ l)
Pika PCR-i ensüümisegu	0,2 (0,04U/ $\mu$ l)
DMSO	0,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 (2,5 mM)
dNTP	5 (1,6 mM)
10x pika PCR-i puhver	2,5 (1x)
Vasak praimer	1
Parem praimer	1
Vesi	8,3

Thermo Scientific MgCl<sub>2</sub>; Solis Biodyne dNTP ; Thermo Scientific pika PCR-i ensüümisegu; Thermo Scientific 10x pika PCR puhvriga; Fermentas DMSO

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

**Joonis 10.** NESTED1 praimerite PCR programm

NESTED2 ja NESTED3 praimereid optimeerides selgus, et NESTED2 praimerid pole piisavalt spetsiifilised. Edasi kasutasin reaktsioonides ainult NESTED3 praimereid. Kõige parema produkti andis NESTED3 praimerite ja DMSO kombinatsioon (Joonis 12). Täpne PCR-i segu ja programm on kujutatud Tabel 9, Joonis 11. NESTED1 praimeri produkt oli väga pikk ning kontsentratsioon väike mille tõttu edaspidi kasutasime platsenta DNA peal ainult NESTED3 praimereid, mille produkt oli 1861bp võrra lühem.

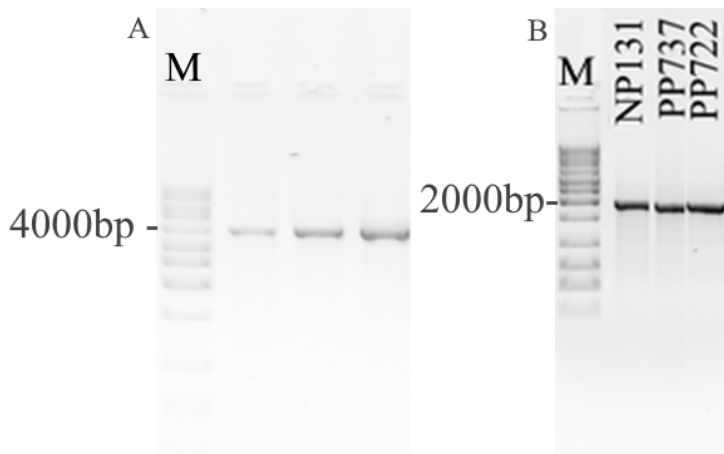
**Tabel 9.** PCR NESTED3 praimeritega

Reagentid	kogus ( $\mu$ l) 25 $\mu$ l kohta
DNA	2 (300 ng/ $\mu$ l)
DNA polümeraas	0,2 (0,04 U/ $\mu$ l)
DMSO	0,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 (2,5 mM)
dNTP	5 (1,6 mM)
10x PCR reaktsioonipuhver (NH <sub>4</sub> )SO <sub>2</sub> -ga	2,5 (1x)
Vasak praimer	1
Parem praimer	1
vesi	10,3

Thermo Scientific MgCl<sub>2</sub>; Solis Biodyne dNTP ; Solis Biodyne HOT FIREPol TAQ DNA polümeraas; Fermentas DMSO; Solis Biodyne 10x PCR reaktsioonipuhver (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub>-ga

Algne			
denaturatsioon	97 °C	15 min	
Denaturatsioon	97 °C	20 sek	} 10 tsüklit
Praimerite seondumine	60 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	2 min	
Denaturatsioon	97 °C	20 sek	} 25 tsüklit
Praimerite seondumine	50 °C	30 sek	
Ekstensioon	72 °C	2 min	
Inkubatsioon	72 °C	10 min	
Säilitamine	4 °C		

**Joonis 11.** NESTED3 praimerite PCR programm



**Joonis 12.** Välimiste praimerite PCR produktide võrdlus

A – NESTED1 praimeritega amplifitseeritud produkt - kasutatud on mitterasedate indiviidide DNAd; B – NESTED3 praimeritega amplifitseeritud produkt; M– Solis Biodyne *1kb DNA Ladder*;

PCR1 praimerid ei olnud piisavalt spetsiifilised, mistõttu optimeerisin edasi ainult PCR2 praimereid. Tegin PCR-i nii genoomse DNA peal kui ka NESTED3 praimeritega amplifitseeritud produkti peal. *Nested* PCR ei olnud tulemuslik, produkti oli liiga vähe ja reaktsioon ei olnud piisavalt spetsiifiline. Segavate faktorite eemaldamiseks viisin läbi puhastamise ning puhastatud produkti peal *nested* PCR-i, seejärel geelist eraldamise (Joonis 14). Katse käigus amplifitseeriti vajalik fragment, kuid ebapiisava kontsentratsiooniga, puhastamine ja geelist eraldamise protsess vähendas produkti kontsentratsiooni veelgi. Lõplik PCR2 praimerite PCR programm ja segu on kujutatud Tabel 10 ja Joonis 13.

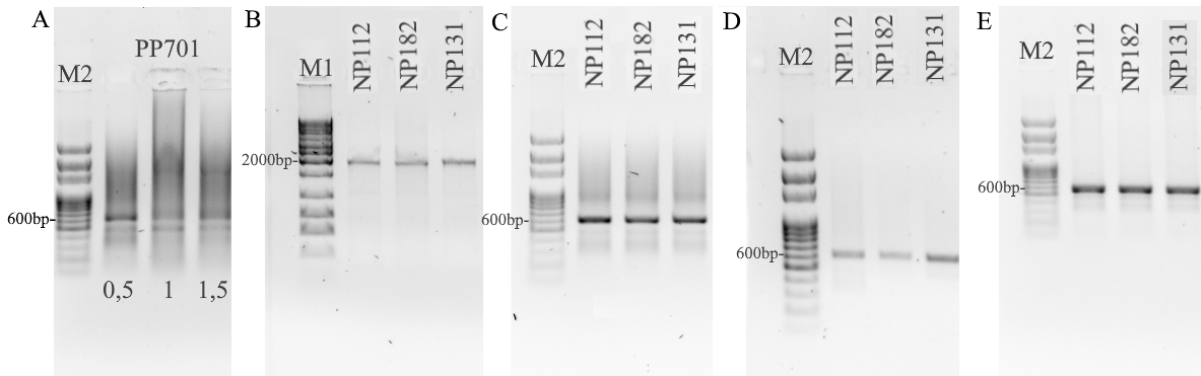
**Tabel 10.** PCR PCR2 praimeritega

Reagendid	kogus ( $\mu\text{l}$ ) 25 $\mu\text{l}$ kohta
DNA	1 (200 ng/ $\mu\text{l}$ )
DNA polümeraas	0,2 (0,04 U/ $\mu\text{l}$ )
MgCl <sub>2</sub>	2,5 (2,5 mM)
dNTP	2,5 (0,8 mM)
10x PCR reaktsioonipuhver (NH <sub>4</sub> )SO <sub>2</sub> -ga	2,5 (1x)
Vasak praimer	1
Parem praimer	1
Vesi	14,3

Thermo Scientific MgCl<sub>2</sub>; Solis Biodyne dNTP; Solis Biodyne HOT FIREPol TAQ DNA polümeraas; Solis Biodyne 10x PCR reaktsioonipuhver (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub>-ga

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

**Joonis 13.** PCR2 praimerite PCR programm



**Joonis 14.** Sisemiste praimeritega amplifitseeritud produktide võrdlus

A – puhastamata nested PCR NESTED3 ja PCR2 praimeritega; B – puhastatud NESTED3 praimerite produkt; C – puhastatud produktiga nested PCR PCR2 praimeritega; D – nested PCR fragment pärast geelist eraldamist; E – PCR2 praimerite amplifitseeritud produkt otse platsenta DNA pealt; M1 – Solis Biodyne *1kb DNA Ladder*; M2 – Solis Biodyne *100bp DNA Ladder*

Kokkuvõttes töötasid kõige paremini NESTED3 ja PCR2 praimerid otse genoomse DNA peal, nende produkte kasutasin sekveneerimiseks.

#### 2.4.4. Sekveneerimise kvaliteedinäitajad

Sekveneeriti kokku 21 proovi, nendest 12 PCR2 praimeritega amplifitseeritud produkti ja 9 NESTED3 praimeritega amplifitseeritud produkti. Mõned DNA-d ei saavutanud NESTED3 praimeritega piisavalt suurt kontsentratsiooni, seetõttu ei saanud neid sekveneerida. Sekveneeriti kahe praimeriga, SEQ parema ja SEQ vasaku. Sekveneerimisandmeid vaatasin ThermoFisher'i pilves *Analysis Module Variant Analysis* tarkvara vaikeseadetega. Kvaliteediskoorina kasutasin QV20+, mille hindamiskriteerium on see, mitu aluspaari saavutas kvaliteediväärtuse  $\geq 20$ . Kvaliteediväärtus näitab tõenäosust, et aluspaar on valesti tuvastatud, mida kõrgem skoor, seda väiksem tõenäosus. Kvaliteet väärtusega 20 tähendab, et vea tõenäosus on 1 100-st. Parima keskmise kvaliteediskooriga olid NESTED3 produktiga sekveneeritud proovid. PCR2 praimerite produktiga sekveneeritud proovide keskmine kvaliteediskoor oli 110 võrra madalam (Tabel 11).

**Tabel 11.** Sekveneerimise kvaliteedimõõdikud

Produkt	Katsete arv	Õnnestumiste arv	Keskmine QV20+
PCR2	24	22 (92%)	273
NESTED3	18	18 (100 %)	383
Homosügoidid	12	12 (100 %)	512
Heterosügoidid	30	28 (93 %)	238
PCR2 homosügoidid	6	6 (100 %)	431
NESTED3 homosügoidid	6	6 (100%)	592

QV20+ - näitab mitu aluspaari said kvaliteediväärtuse  $\geq 20$

#### 2.4.5. Piirkonna alleelne kompositsioon

Sekveneerimisandmetest tuvastasin peale mažoorsete alleelide veel 4 erinevat varieeruvust, üks deletsioon rs149427560, üks deletsioon rs200749017 ja üks deletsioon ning insertioon rs58800262 variandis. rs138006164 variandis ei esinenud varieeruvusi (Tabel 12, Joonis 16, Joonis 17). Sekventsidest tuvastatud deletsioonid ja insertioonid vastasid fragmendipikkustele, kuid fragmendipikkused ei vastanud kindlatele alleelidele. Indiviididel, kellel fragmentanalüüsis tuvastati kaks eri pikkusega fragmenti on sekveneerimistulemustes tuvastatud nihkumist, mis tähendab, et esineb rohkem kui üks alleel. Piirkonna järjestus on kujutatud Joonis 15.

>13 dna:chromosome chromosome:GRCh38:13:28531334-28532146

CTTGGGTTTCCCGGGGTGTGTGCGGATTCTCAATAAAAAGGGAAAAGCACGATCCAAGTT  
AATTTTCCAGCGCCGACAGGAAATGCTGTTTCCTGCATCGTACAACGCTGGTGCCAACAA  
GACTGACACAGGAGCCCATTGTCCCGCAACAATGTGGCGATGGGGAAGGACGCCTGAGA  
AAACAGACCCCGGCCCGTGAGCGCGTTTGTGGATCCTTCCCATAGGGTTGTGTGAGG  
TGTGTGTCTGTGTGGGTGGGTGTATTTGTGCATGTGTGGTGTACGTCTGTGTGTGAGATT  
GTGTGTTGGGGGTGTGTATATGTGTGGTGTGTGTGGGAGTGTGTCTATGTGTGTCTCC  
rs149427560  
GTAGTATGTGTATCTGTGTGGGTAGGTATGTGCATGTGTG**GTGTGTGTGTG**GAG  
AGTGTGTATGTGTGTGTGTCTCTGTGGTGTGTGTGTCTGTGTGTGTCTGCATGTGTGTCT  
rs138006164  
CTGTAGTGTGTTTGTGTCTGTGTGAGTAGGTGTGTTTGTGCATGAGTG**GTGTGTGTGTG**  
rs200749017  
**GTGTGTGTG**CGTGTGTGTATGAGTGCGTGAGTGTATGAGTGCCTGAGTGTGAAA  
rs58800262  
**GTGTGTGTGTGTGTGTGTG**AGGCTGAATAGGCTGGTAAAGGCAGGGCACTGTCCCTTCCTGCCCTGC  
CTCTGCTCCCCTGGCGGGCTCCCAAAGTGGCAAAGAGACCTAGCTGTCTAAAACGTTCA  
AAAGAAAAAAGAGAAAAGAAAAGAAAAGGGGGAAAACGGGGGAAAAGAAAAGCATGGAACAG  
AAGAGGAAATTTTTTAAAAGAAAGGA

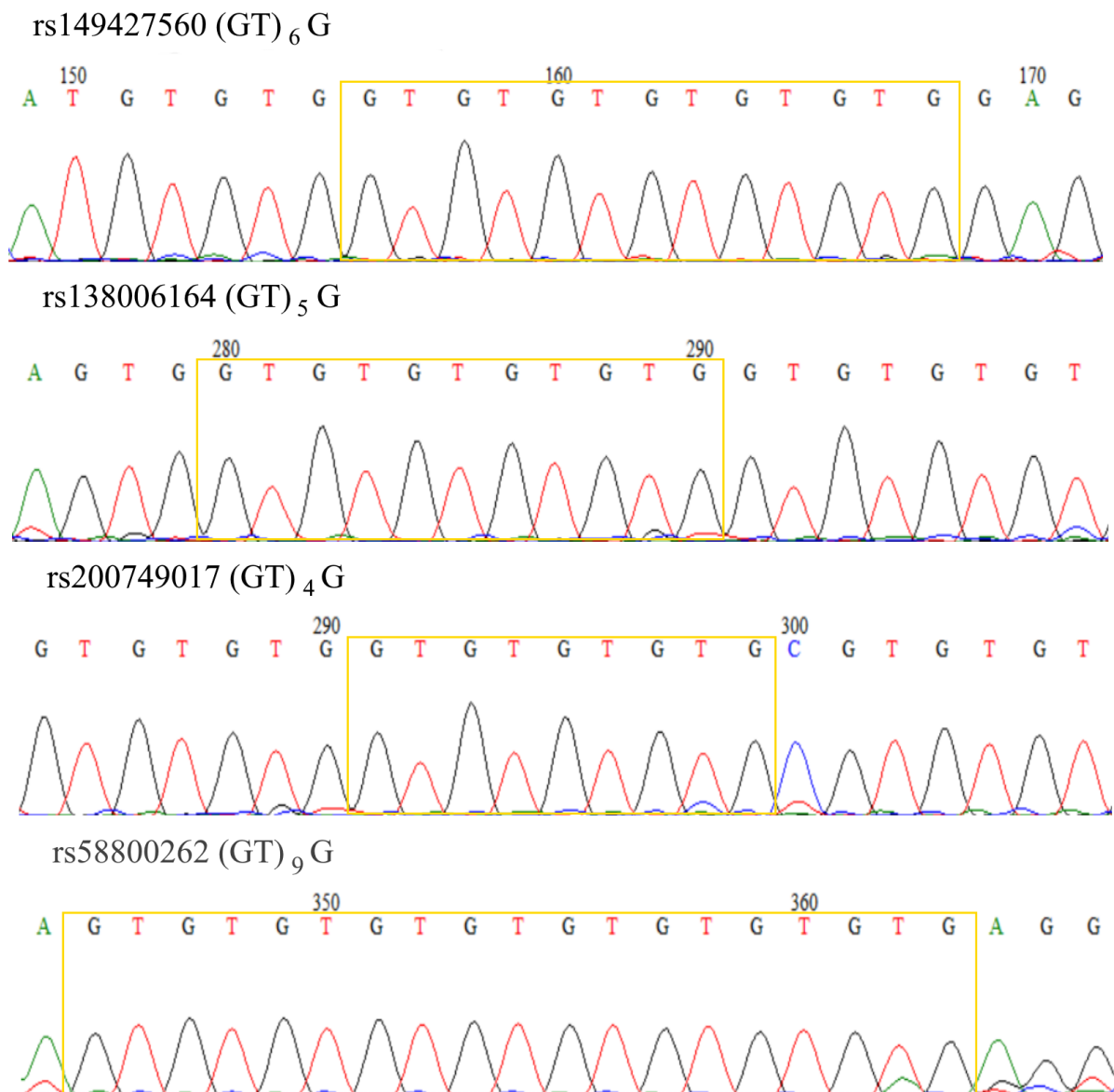
### Joonis 15. Piirkonna järjestus

Antud töös uuritud variandid on tähistatud kollaselt: joonisel on kasutatud variantide mažoorsete alleelide järjestusi

**Tabel 12.** Sekveneerimise kromatogrammideelt visuaalselt tuvastatud alleelid

ID	Piirkonna pikkus fragmentanalüüsis (bp)	rs149427560	rs138006164	rs200749017	rs58800262
NP131	625	(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G	(GT) <sub>9</sub> G
PP737	623	<b>(GT)<sub>5</sub>G</b>	(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G	(GT) <sub>9</sub> G
PP707	627	(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G	<b>(GT)<sub>10</sub>G</b>
PP708	623, 627	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	<b>(GT)<sub>8</sub>G/(GT)<sub>10</sub>G</b>
NP112	623, 625	<b>(GT)<sub>5</sub>G/(GT)<sub>6</sub>G</b>	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	(GT) <sub>9</sub> G/(GT) <sub>9</sub> G
PP701	623, 625	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	<b>(GT)<sub>8</sub>G/(GT)<sub>9</sub>G</b>
PP703	623, 625	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	<b>(GT)<sub>8</sub>G/(GT)<sub>9</sub>G</b>
PP720	623, 625	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	<b>(GT)<sub>8</sub>G/(GT)<sub>9</sub>G</b>
PP722	623, 625	<b>(GT)<sub>5</sub>G/(GT)<sub>6</sub>G</b>	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	(GT) <sub>9</sub> G/(GT) <sub>9</sub> G
NP182	621, 625	<b>(GT)<sub>5</sub>G/(GT)<sub>6</sub>G</b>	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	<b>(GT)<sub>3</sub>G/(GT)<sub>4</sub>G</b>	(GT) <sub>9</sub> G/(GT) <sub>9</sub> G
NP208	625, 627	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	(GT) <sub>9</sub> G/ <b>(GT)<sub>10</sub>G</b>
PP711	625, 627	(GT) <sub>6</sub> G/(GT) <sub>6</sub> G	(GT) <sub>5</sub> G/(GT) <sub>5</sub> G	(GT) <sub>4</sub> G/(GT) <sub>4</sub> G	(GT) <sub>9</sub> G/ <b>(GT)<sub>10</sub>G</b>

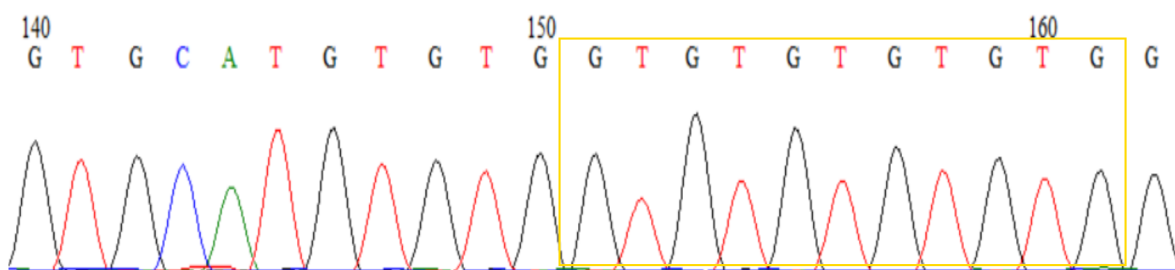
Paksu kirjaga on märgitud alternatiivsed alleelid, peene kirjaga mažorsed alleelid



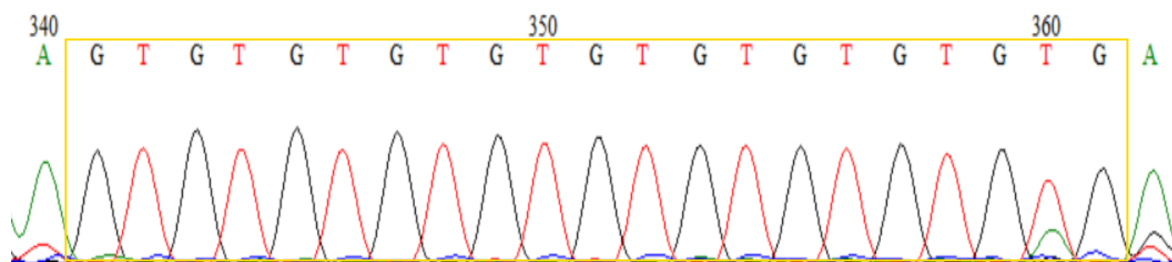
**Joonis 16.** Näited sekveneeritud piirkonna mažoorsetest alleelidest

Kollane kast – alleel; joonisel on kasutatud homosügootsete patsientide allele

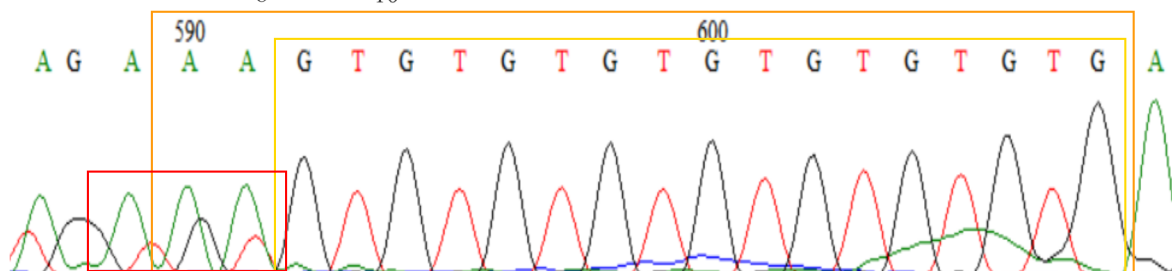
rs149427560 (GT)<sub>5</sub>G



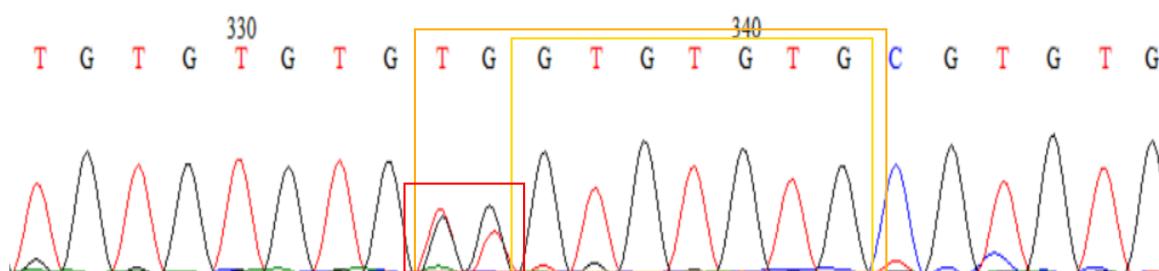
rs58800262 (GT)<sub>10</sub>G



rs58800262 (GT)<sub>8</sub>G/(GT)<sub>10</sub>G



rs200749017 (GT)<sub>3</sub>G/(GT)<sub>4</sub>G



**Joonis 17.** Näited sekveeritud piirkonna alternatiivsetest alleelidest

rs149427560 (GT)G ning rs58800262 (GT)G puhul on kasutatud homosügootsete indiviidide alleele, rs200749017 (GT)3G/(GT)4G ja rs58800262 (GT)8G/(GT)10) puhul homosügootte ei esinenud; kollane kast – alleel; punane kast – näited sekvensi nihkumisest, mis tuleneb heterosügootsusest

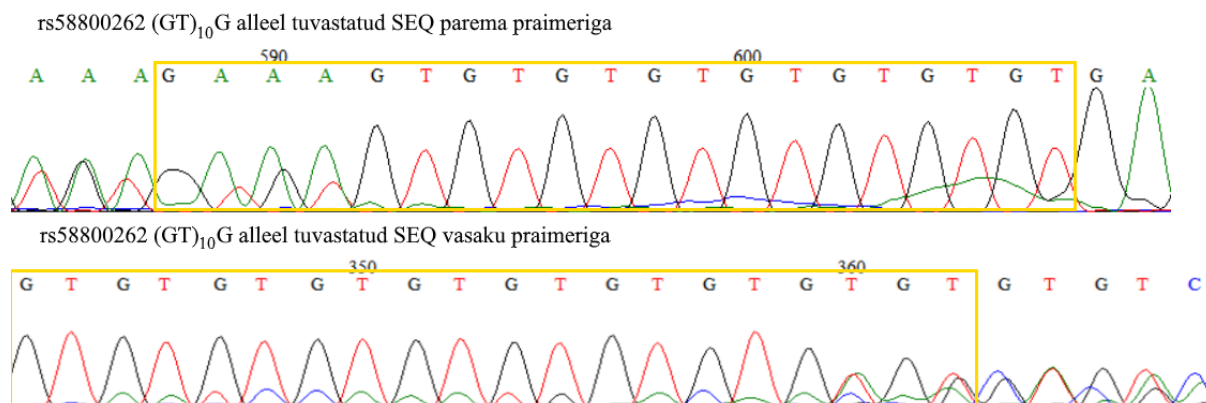
## 2.5. Arutelu

### 2.5.1. Väljatöötatud töövoog ja piirkonna varieeruvus

Käesoleva töö eesmärk oli töötada välja protokoll, et tuvastada *FLT1* geeni regulaatoralas olevaid dinukleotiidi korduseid. Selleks disainisin piirkonda praimerid, viisin läbi PCR-i ning saatsin proovid sekveneerimisele. Töö põhineb Triin Kikase läbiviidud platsenta DNA *FLT1* geeni regulaatorala fragmentanalüüsil, kus tuvastati neli erineva pikkusega fragmenti. Sekveneerimise kvaliteedinäitajatest oli näha, et kõige parema kvaliteediskoori saavutasid homosügootsed DNA-d ehk need, millel tuvastati fragmentanalüüsis ainult üks pikkus. Nende keskmine QV20+ oli 512, heterosügootidel oli 238. Eriti madala skoori sai NP182 patsiendi sekvents SEQ vasak praimeriga (QV20+ = 33). Selle indiviidi fragmentanalüüsist tuvastatud regulaatorala pikkus on 621/625, mis tähendab, et ühel alleelil võib esineda kahekordne dinukleotiidi deletsioon, mis võib olla madala skoori põhjuseks.

Kvaliteediskooride järgi on NESTED3 praimerite produkt parem sekveneerimiseks, kuid mõned nende praimeritega amplifitseeritud DNA-d ei saavutanud piisavalt suurt kontsentratsiooni, arvatavasti produkti suure pikkuse tõttu, selle pärast ei saanud neid sekveneerida. Üks nendest oli NP182 indiviid, mis andis PCR2 praimeriga produktiga sekveneeritud järjestusele väga madala skoori, kui eelnevalt mainitud indiviidi oleks sekveneeritud ka NESTED3 praimerite produktiga pealt, oleks see arvatavasti selle produkti keskmist skoori langetanud. Vaadates ainult NESTED3 ja PCR2 praimerite produktiga sekveneeritud homosügoote on siiski NESTED3 produktiga sekveneeritud järjestused kõige parema kvaliteediga, kuid mõlema produktiga õnnestus sekveneerida 100% proovidest. Pigem määras skoori see, kas piirkond oli hetero- või homosügootne. Edaspidi eelistan PCR2 primereid, kuna nendega saavutasid kõik DNA-d piisava kontsentratsiooni. Kuigi PCR2 praimeritele oli ennustatud ka teisi produkte (Tabel 6), siis tundus, et need sekveneerimist ei seganud. Samuti peaks töövoogu lisama kloneerimise etapi, et heterosügootsete indiviidide alleelid oleks selgelt eristatavad.

Üks tähtsamaid erinevusi sekveneerimispraimerite kvaliteedis oli rs58800262 variandi järjestuse tuvastamine. SEQ vasaku praimeriga tuli sekvents tagasi ebaselgena, eelnevalt mainitud variandi korrektseks määramiseks on kindlasti vaja SEQ paremat praimerit, kus oli selgelt näha kahe erineva alleeli kattuvust. (Joonis 18).



**Joonis 18.** Näide rs58800262 sekventsist SEQ parema ja vasaku praimeriga kollasega kastiga on märgitud (GT)<sub>10</sub>G alleel

Püstitasin hüpoteesi, et iga unikaalne fragmendipikkus vastab ühele alleelile ehk kindlatele deletsioonidele või insertioonidele. Sekveneerimistulemustest selgus, et see ei vasta tõele. Sekveneerimiskromatogrammidele näeb, et näiteks fragmendipikkus 623 võib tähendada deletsiooni nii rs149427560 kui ka rs58800262 variandis. Nende varieeruvuste tõttu on sekveneerimine parem viis, et tuvastada dinukleotiidi korduste alleele *FLT1* regulaatoralas.

## 2.5.2. Piirkonna mõju *FLT1* geeni ekspressioonile

Varem on ennustatud rs149427560 variandi genoomse piirkonna interaktsiooni *FLT1* geeni alguspiirkonnaga (Joonis 4) (McGinnis *et al.*, 2017). Vaadates reguloorseid elemente rs149427560 dinukleotiidi mikrosatelliidi juures (Joonis 8) on võimalik, et varieeruvused selles variandis võivad mõjutada lähedal oleva geeni ekspressiooni. Muutused transkriptsioonifaktorite seondumissaitides võivad häirida nende seondumist ja selle kaudu mõjutada *FLT1* transkriptsioonitaset. Nt. deletsioonid või insertioonid POLR2A seondumissaidis, kuhu seondub RNA polümeraasi subühik, võivad muuta RNA polümeraasi seondumisafiinsust ja selle kaudu suurendada *FLT1* ekspressioonitaset. Teisi töö raames vaadeldud variante läbivad kõik peale kahe sama transkriptsioonifaktori seondumissaidi. See võib tähendada, et ka muutused nende järjestustes võivad mõjutada faktorite seondumisafiinsust ning *FLT1* ekspressioonitaset. Dinukleotiidi korduste regioon on ka H3K27Ac märges, mis on histooni atsetüleerimissait. Histoonide modifitseerimine muudab

transkriptsioonilist aktiivsust kromatiini struktuuri muutmise kaudu, atsetüleerimine suurendab transkriptsioonilist aktiivsust, mis viitab sellele, et rs149427560 asub reguleerivas alas. Samuti esineb seal DNAasi hüpersensitiivsusalal, mis annab märku, et tegemist on transkriptsiooniliselt aktiivse alaga, sest need on eriti tundlikud DNAasi suhtes.

### 2.5.3. Piirkonna mõju preeklampsiale

PE-d on tuntud peaaegu 200 aastat ning nüüdseks on välja kujunenud arusaam, et selle tekkimiseks on vajalik platsenta. On täheldatud, et preeklampsilise raseduse ajal vabaneb platsentast palju antiangiogeenseid faktoreid nagu sFlt1-1. (Burton *et al.*, 2019) Kandidaatgeene uurides ja ülegenoomsete uuringute abil on proovitud selgitada PE tekkepõhjuseid.

Käesolevas töös uuritud mikrosatelliiti on seostatud PE-ga 2017. aastal tehtud ülegenoomses uuringus, kus näidati, et *FLT1* lookuses asuv rs149427560 oli PE-ga oluliselt seotud (McGinnis *et al.*, 2017). 2020. aastal Jaapanis tehtud uuringus rs4769613, rs12050029 ja rs149427560 genotüüpe uurides leiti neli fragmendipikkuse variatsiooni (472, 474, 476 ja 478) preeklampsiliste ja tervete naiste platsenta DNA *FLT1* reguleerivas alas. Uuringust ei leitud rs149427560 alleelitüübi sageduste erinevusi preeklampsiliste ja normaalsete raseduste vahel. Genotüüpe analüüsides leiti, et 474/476 heterosügooti esineb preeklampsia korral vähem, kuid ükski alleel ega genotüüp ei olnud korrelatsioonis *FLT1* geeniekspressiooni tasemega (Ohwaki *et al.*, 2020).

Peale kahe eelneva uuringu ei ole rs149427560 mikrosatelliidist palju teada, mistõttu saab ainult oletada selle mõjust *FLT1* geeni ekspressioonile ja PE-le. On ka võimalik, et hoopis eelmainitud mikrosatelliidiga LD-s olev variant on tegelik põhjuslik variant PE riskile. rs149427560 mikrosatelliidiga on LDs kuus varianti. Nendest kaks asuvad *FLT1* intronites, teised neli on intergeensed variandid. Edaspidi on oluline uurida kas *FLT1* ekspressioonitaset mõjutavad pigem kindlad variatsioonid eelmainitud variantides või piirkonna pikkus tervikuna, selleks oleks vajalik valimit suurendada ning rakendada käesolevas töös väljatöötatud protokolle, et tuvastata regulaatoralas paiknevaid dinukletotiidi korduseid. Seejärel tuleks uurida variantide alleelitüüpide ning fragmendipikkuste seost *FLT1 mRNA* tasemega või vereseerumi sFlt-1 tasemega nii preeklampsilistes kui ka tervetes rasedustes.

# KOKKUVÕTE

Käesolevas töös annan ülevaate preeklampsia patofüsioloogiast ja geneetikast. Samuti teen kokkuvõtte *FLT1* geeni mõjust preeklampsiale ja selle reguleerivates regioonides paiknevatest dinukleotiidsetest kordusjärjestusest, peamiselt rs149427560 mikrosatelliidist.

Töö põhineb Triin Kikase tehtud *FLT1* regulaatorala fragmentanalüüsil, kus tuvastati 4 erinevat fragmendi pikkust. Praktilise osa eesmärk on töötada välja protokoll, et tuvastada *FLT1* geeni regulaatoralas paiknevaid dinukleotiidseid kordusjärjestusi (rs149427560, rs138006164, rs200749017 ja rs58800262); täpsemalt teha selgeks, millised PCR-i praimerid amplifitseerivad parima produkti; kas fragmentanalüüsist tuvastatud pikkused vastavad alleelide arvule ning otsustada, kas fragmentanalüüs või sekveneerimine on parem viis tuvastada alleele *FLT1* regulaatoralas. Selleks disainisin praimerid ning viisin läbi PCR-i REPROMETA valimist saadud platsenta DNA-de peal. PCR-i produkt sekveneeriti.

Võrdlesin sekveneerimistulemusi fragmentanalüüsiga, et tuvastada, kas unikaalsed fragmendipikkused vastavad kindlatele alleelidele. Vaadeldavates kordusjärjestustes tuvastasin lisaks mažoorsetele alleelidele veel 4 erinevat variatsiooni. Fragmendipikkused ei vastanud kindlatele deletsioonidele või insertioonidele ehk sama pikkusega fragmentidel võisid esineda deletsioonid erinevates dinukleotiidsetes kordusjärjestustes. Nende andmete põhjal otsustasin, et sekveneerimine on parem viis tuvastamiseks alleele *FLT1* geeni regulaatoralas.

Järgnevalt võib uurida, kas *FLT1* transkriptsioonitaset mõjutab dinukleotiidi korduste rikka piirkonna pikkus tervikuna või kindlad variatsioonid dinukleotiidsetes variantides.

## **Developing a protocol for detecting allelic variation in the dinucleotide rich regulatory region of the *FLT1* gene**

Annette Oder

### **SUMMARY**

Preeclampsia is a pregnancy complication with the main symptoms being *de novo* hypertension and proteinuria. The clinical symptoms of preeclampsia are primarily caused by excess levels of circulating antiangiogenic factors in the mother's blood, such as sFlt-1, which are secreted from the placenta when it's under stress. sFlt-1 is coded from the *FLT1* gene.

This study is based on a fragment analysis of the *FLT1* gene regulatory region done by my supervisor MSc Triin Kikas, where they detected four different fragment lengths. The purpose of this study was to develop a protocol for detecting dinucleotide rich variants in the regulatory region of *FLT1* - design primers for PCR and establish the best product for sequencing, also determine whether unique fragment lengths correspond to the number of alleles and which of the two methods (fragment analysis or sequencing) is best to determine alleles in the regulatory region of *FLT1*.

In addition to major alleles, I found four variations in the observed variants (rs149427560, rs138006164, rs200749017 ja rs58800262). Unique fragment lengths did not correspond to the number of alleles - fragments of equal lengths sometimes had deletions in different variants. Based on this it can be concluded that sequencing is a better method to detect different alleles in the regulatory region of *FLT1*.

Further research is needed to establish whether specific variations in the dinucleotide variants or the length of the dinucleotide rich region affects the risk of preeclampsia by influencing the transcription levels of *FLT1*.

# KIRJANDUSE LOETELU

- Ananda, G., Walsh, E., Jacob, K. D., Krasilnikova, M., Eckert, K. A., Chiaromonte, F., Makova, K. D.** (2013) Distinct mutational behaviors differentiate short tandem repeats from microsatellites in the human genome. *Genome biology and evolution*. 5(3): 606–620.
- Ashar-Patel, A., Kaymaz, Y., Rajakumar, Bailey, J. A., Karumanchi, S. A., Moorecorresponding M. J.** (2017) FLT1 and transcriptome-wide polyadenylation site (PAS) analysis in preeclampsia. *Scientific Reports*, 7(1): 12139.
- Bagshaw A. T. M.** (2017) Functional Mechanisms of Microsatellite DNA in Eukaryotic Genomes. *Genome Biol Evol*, 9(9): 2428–2443.
- Baptiste, B. A., Ananda, G., Strubczewski, N., Lutzkanin, A., Khoo, S. J., Srikanth, A., Kim, N., Makova, K. D., Krasilnikova, M. M., Eckert, K. A.** (2013) Mature microsatellites: mechanisms underlying dinucleotide microsatellite mutational biases in human cells. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(3): 451–463.
- Birdir, C., Droste, L., Fox, L., Frank, M., Fryze, J., Enekwe, A., Köninger, A., Kimmig, R., Schmidt, B., & Gellhaus, A.** (2018). Predictive value of sFlt-1, PlGF, sFlt-1/PlGF ratio and PAPP-A for late-onset preeclampsia and IUGR between 32 and 37 weeks of pregnancy. *Pregnancy Hypertension*, 12: 124–128.
- Burton, G., Woods, A., Jauniaux, E., & Kingdom, J.** (2009). Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 30(6): 473–482.
- Burton, G. J., Redman C. W., Roberts, J. M., Moffett, A.** (2019) *Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications*. *BMJ*, 366: I2381.
- Brown, M. A., Magee, L. A., Kenny, L. C., Karumanchi, S. A., McCarthy, F. P., Saito, S., Hall, D. R., Warren C. E., Adayi, G., Ishaku, S.** (2018) ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension*, 72: 24-43
- Chaiworapongsa, T., Chaemsaitong, P., Yeo, L., Romero, R.** (2014) Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology*, 10(8): 466-480

**Colak, D., Zaninovic, N., Cohen, M. S., Rosenwaks, Z., Yang, W.-Y., Gerhardt, J., Disney, M. D., & Jaffrey, S. R.** (2014). Promoter-bound trinucleotide repeat mRNA drives epigenetic silencing in fragile X syndrome. *Science*, *343*(6174): 1002–1005.

**Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J. ja teised.** (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1): D884–D891.

**Johnson, M. P., Brennecke, S. P., East, C. E., Göring, H. H., Kent Jr, J. W., Dyer, T. D., Said, J. M., Roten, L. T., Iversen, A.-C., Abraham, L. J. ja teised** (2012). Genome-wide association scan identifies a risk locus for preeclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene. *PLoS One*, *7*(3): e33666.

**Kaartokallio, T., Klemetti, M. M., Timonen, A., Uotila, J., Heinonen, S., Kajantie, E., Kere, J., Kivinen, K., Pouta, A., Lakkisto, P., Laivuori, H.** (2014) Microsatellite Polymorphism in the Heme Oxygenase-1 Promoter Is Associated With Nonsevere and Late-Onset Preeclampsia. *Hypertension*, *64*: 172–177

**Kaartokallio, T., Wang, J., Heinonen, S., Kajantie, E., Kivinen, K., Pouta, A., Gerdhem, P., Jiao, H., Kere, J., Laivuori, H.** (2016). Exome sequencing in pooled DNA samples to identify maternal pre-eclampsia risk variants. *Scientific Reports*, *6*(1): 1–9.

**Kaartokallio, T., Cervera, A., Kyllönen, A., Laivuori, K., Kere, J., Laivuori, H.** (2015). Gene expression profiling of pre-eclamptic placentae by RNA sequencing. *Scientific Reports*, *5*(1): 1–16.

**Kelkar, Y. D., Strubczewski, N., Hile, S. E., Chiaromonte, F., Eckert, K. A., Makova, K. D.** (2010) What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome biology and evolution*, *2*: 620–635.

**Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A.** (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*, *111*(5): 649–658.

- McGinnis R., Steinhorsdottir V., Williams N. O., et al.** (2017) *Variants in the fetal genome near FLT1 are associated with risk of preeclampsia.* *Nature Genetics*, 49(8): 1255-1260
- Ohwaki, A., Nishizawa, H., Kato, A., Kato, T., Miyazaki, J., Yoshizawa, H., Noda, Y., Sakabe, Y., Ichikawa, R., Sekiya, T., & others.** (2020). Placental Genetic Variants in the Upstream Region of the FLT1 Gene in Pre-eclampsia. *Journal of Reproduction & Infertility*, 21(4): 240.
- Punga, T., Bühler, M.** (2010) Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO molecular medicine*, 2(4): 120–129.
- Rana, S., Lemoine, E., Granger J. P., Karumanchi, S. Ananth.** (2019) Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circulation Research*, 124: 1094–1112.
- Redman, CW, Sargent, I., Staff, A.** (2014). IFPA Senior Award Lecture: Making sense of pre-eclampsia—two placental causes of preeclampsia? *Placenta*, 35: S20–S25.
- Redman, C. W. ja Staff, A. C.** (2015). Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4): S9-e1.
- Redman, C.** (1991). Pre-eclampsia and the placenta. *Placenta*, 12(4): 301–308.
- Regitz-Zagrosek, V., Roos-Hesselink, J. W., Bauersachs, J., Blomström-Lundqvist, C., Cifkova, R., De Bonis, M., Iung, B., Johnson, M. R., Kintscher, U., Kranke, P., & others.** (2018). 2018 ESC guidelines for the management of cardiovascular diseases during pregnancy: The task force for the management of cardiovascular diseases during pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 39(34): 3165–3241.
- Rolnik, D.L., Wright, D., Poon, L.C.Y., Syngelaki, A., O'Gorman, N., de Paco Matallana, C., Akolekar, R., Cicero, S., Janga, D., Singh, M., Molina, F.S., Persico, N., Jani, J.C., Plasencia, W., Papaioannou, G., Tenenbaum-Gavish, K., Nicolaides, K.H.** (2017) ASPRE trial: performance of screening for preterm pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 50: 492-495.
- Saldarriaga, W., Tassone, F., González-Teshima, L. Y., Forero-Forero, J. V., Ayala-Zapata, S., Hagerman, R.** (2014) Fragile X syndrome. *Colombia medica*, 45(4): 190–198.
- Staff, A. C.** (2019). The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology*, 134: 1–10.

- Steinthorsdottir, V., McGinnis, R., Williams, N. O., Stefansdottir, L., Thorleifsson, G., Shooter, S., Fadista, J., Sigurdsson, J. K., Auro, K. M., Berezina, G., & others.** (2020). Genetic predisposition to hypertension is associated with preeclampsia in European and Central Asian women. *Nature Communications*, *11*(1): 1–14.
- Stepan, H., Geipel, A., Schwarz, F., Krämer, T., Wessel, N., & Faber, R.** (2008). Circulatory soluble endoglin and its predictive value for preeclampsia in second-trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *198* (2): 175.
- Sun, J. H., Zhou, L., Emerson, D. J., Phyto, S. A., Titus, K. R., Gong, W., Gilgenast, T. G., Beagan, J. A., Davidson, B. L., Tassone, F., Phillips-Cremins, J. E.** (2018). Disease-Associated Short Tandem Repeats Co-localize with Chromatin Domain Boundaries. *Cell*, *175*(1): 224–238.
- Söber, S., Reiman, M., Kikas, T., Rull, K., Inno, R., Vaas, P., Teesalu, P., Marti, J. M. L., Mattila, P., & Laan, M.** (2015). Extensive shift in placental transcriptome profile in preeclampsia and placental origin of adverse pregnancy outcomes. *Scientific Reports*, *5*(1): 1–17.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.** (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. *13*:134.
- Yong, H. E., Murthi, P., Brennecke, S. P., Moses, E. K.** (2018). Genetic approaches in preeclampsia. *Preeclampsia*, *53–72*.
- Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A. C., Sennström, M., Olovsson, M., Brennecke, S. P., Stepan, H., Allegranza, D., & others.** (2016). Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med*, *374*: 13–22.
- Zhao, L., Triche, E. W., Walsh, K. M., Bracken, M. B., Saftlas, A. F., Hoh, J., Dewan, A. T.** (2012). Genome-wide association study identifies a maternal copy-number deletion in PSG11 enriched among preeclampsia patients. *BMC Pregnancy and Childbirth*, *12*(1): 1–10.

# KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Primer3web versioon 4.1.0 <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Tervisestatistika ja terviseuuringute andmebaas. SR42: Rasedusaegsed riskitegurid ja tuisistused.(2019)

[https://statistika.tai.ee/pxweb/et/Andmebaas/Andmebaas\\_01Rahvastik\\_02Synnid/SR42.px/table/tableViewLayout2/](https://statistika.tai.ee/pxweb/et/Andmebaas/Andmebaas_01Rahvastik_02Synnid/SR42.px/table/tableViewLayout2/)

UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu>

# LIHTLITSENTS

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

Mina, Annette Oder

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „FLT1 geeni regulaatoralas paiknevate dinukleotiidi korduste rikka piirkonna alleelse varieeruvuse tuvastamise protokollil väljatöötamine“, mille juhendaja on MSc Triin Kikas ja PhD Triin Laisk, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 31.05.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Annette Oder

**27.05.2021**