

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

MARGUS PUTKU

UUS POLÜMORFNE *ALUYB8* HÜPERTENSIOONI KANDIDAATGEENIS *WNK1*:
LEVIK NING MÕJU GEENI FUNKTSIOONILE

Magistritöö

Juhendaja prof. Maris Laan Ph.D.

TARTU 2008

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Essentsiaalne hüpertensioon (EHT).....	7
1.1.1 Hüpertensiooni (HT) monogeensed pärilikud vormid	8
1.1.2 Essentsiaalne hüpertensioon kui komplekshaigus	8
1.1.3 Essentsiaalse hüpertensiooni kandidaatgeenide tuvastamine.....	10
1.2 <i>WNKI</i> kui essentsiaalse hüpertensiooni kandidaatgeen.....	12
1.2.1 WNK geeniperekonna üldisloomustus.....	12
1.2.2 <i>WNKI</i> geeni funktsioonid	14
1.2.3 Pärilik hüpertensiooni vorm pseudohüpoaldosteronism tüüp II (PHAI).....	17
1.2.4 <i>WNKI</i> ja essentsiaalne hüpertensioon.....	18
2. TÖÖ EESMÄRGID JA ÜLESEHITUS	20
3. MATERJAL JA METOODIKA	21
3.1 <i>Alu</i> insertiooni sisaldava piirkonna amplifikatsioon	21
3.2 <i>Alu</i> insertiooni tuvastamine primaatidel ja <i>WNKI</i> 10.-11. eksoni resekveneerimine inimesel ja šimpansil.....	22
3.2.1 Ekson 10-11 amplifikatsioon ja resekveneerimine	22
3.3 <i>AluYb8</i> insertiooni jaotuvus erinevates populatsioonides	25
3.4 Assotsiatsiooniuringud.....	26
3.4.1 Assotsiatsiooniuringusse kaasatud indiviidid	26
3.4.2 Statistiline analüüs	28
3.5 <i>Alu</i> insertiooni funktsionaalsed uuringud.....	29
3.5.1 RNA eraldamine ja cDNA süntees	29
3.5.2 Funktsionaalseteks uuringuteks kasutatud praimerite disain	30
3.5.3 Erinevate splaissvormide ja referentsgeenide amplifikatsioon.....	30
3.5.4 Ekspressiooniuring GeneScan meetodiga.....	32

4. TULEMUSED	33
4.1 <i>Alu</i> insertiooni inimesespetsiifilisus ja <i>WNKI</i> 10.-11. eksoni konserveeritus	33
4.2 <i>AluYb8</i> insertiooni jaotuvus erinevates populatsioonides	34
4.3 <i>AluYb8</i> assotsiatsioonianalüüs vererõhu ja biokeemia markeritega ning juht- kontroll uuring.....	36
4.4 <i>AluYb8</i> insertiooni mõju geeniekspressioonile.....	40
5. ARUTELU	44
5.1 <i>Alu</i> elemendid ja polümorfseid <i>Alu</i> -d populatsioonigeneetikas.....	44
5.2 <i>Alu</i> insertiooni mõju genoomi funktsioonile ja seos komplekshaigustega.....	45
5.3 <i>WNKI</i> variantide assotsiatsioon vererõhu taseme ja essentsiaalse hüpertensiooniga	46
5.4 Alternatiivse splaissingu roll geeniekspressioonis.....	47
KOKKUVÕTE.....	49
SUMMARY	50
TÄNUAVALDUSED	51
KASUTATUD KIRJANDUS	52
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	60
LISAD	61

KASUTATUD LÜHENDID

6-FAM – 6-karboksüfluorestiin

ATP – adenosiintrifosfaat

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BMI – kehamassi indeks (*Body Mass Index*)

bp – aluspaar (*base pair*)

DEPC – dietüülpürokarbonaat

DMSO – dimetüül sulfoksiid

dNTP – desoksünukleosiidtrifosfaat

dT – desoksütümidiiin

DTT – ditiotreitool

DVR – diastoolne vererõhk

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

EHT – essentsiaalne hüpertensioon

ENaC – epiteliaalne Na⁺ kanal

ExoI – eksaonukleas I

F – *Forward*

GAPDH – glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas

GFR – glomerulaarse filtratsiooni tase (*Glomerular Filtration Rate*)

HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin (*High-Density Lipoprotein*)

HEX – 6-karboksüheksafluorestiin

HT – hüpertensioon

kb – tuhat aluspaari

KCC3 – K-Cl-kotransporter 3

kDa – tuhat Daltonit

KS-WNK1 – neeruspetsiifiline lühike *WNK1* vorm

LDL – madala tihedusega lipoproteiin (*Low-Density Lipoprotein*)

LRT – tõepära suhte test (*Likelihood Ratio Test*)

L-WNK1 – pikk *WNK1* vorm

M-MuLV – moloney murine leukemia virus
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NCC – Na⁺ - Cl⁻ kotransporter
NKCC – Na-K-2Cl-kotransporter
OSR1 – (*Oxidative Stress Response kinase 1*)
PHAI – pseudohüpoaldosteronism tüüp 2
R – *Reverse*
rcf – (*relative centrifugal force*)
RAAS – reniin-angiotensiin-aldosteroon-süsteem
RFLP – restriksioonifragmendi pikkuse polümorfism (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)
RPII – RNA polümeraas II
sAP – krevetil aluseline fosfataas (*shrimp Alkine Phosphatase*)
SNP – ühenukleotiidne polümorfism (*Single Nucleotide Polymorphism*)
SPAK – (*STE20/SPS1-related Proline/Alanine-rich Kinase*)
STE20 – stressiga seotud kinaasid (*stress-related kinases*)
SVR – süstoolne vererõhk
TBE – Tris-boorhape-EDTA
TET – 5' tetraklorofluorestsiiin
Tris – trishüdrosümetüülaminometaan
U – ühik (*Unit*)
WNK – ilma lüsiinita (K) (*With No K*)

SISSEJUHATUS

Hüpertensioon ja sellega kaasnevate paljude haiguste riski suurenemine on tänapäeval laialt levinud probleem, mõjutades industrialiseerunud ühiskondades 25% elanikkonnast. Progress geneetikas ja meditsiinis on avanud ukse uutele teadmistele haiguse põhjuste paremaks mõistmiseks ning andnud efektiivsemad vahendid probleemiga võitlemiseks. Lisaks keskkonnast lähtuvatele vererõhu regulatsioonis osalevatele paljudele faktoritele on haiguse tekkes ja kulus oluline roll täita ka geenidel. Hüpertensiooni geneetilise komponendi väljaselgitamine aitab mõista haiguse olemust molekulaarsel tasemel ja loob suurepärased eeldused tõhusamate ravimite väljatöötamiseks.

Antud töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida inimese hüpertensiooni geneetilist tausta.

Kirjanduse ülevaate esimese osas tutvustatakse hüpertensiooni olemust ja klassifitseerimist, loetletakse seni tuntud kõrgvererõhutõve monogeensed pärilikud vormid ning kirjeldatakse hüpertensiooni kui komplekshaigust. Samuti antakse lühiülevaade erinevatest lähenemisviisidest haiguse kandidaatgeenide tuvastamiseks ning tuuakse välja siiani tehtud olulisemad avastused. Kirjanduse ülevaate teises osas tutvustatakse *WNK* geeniperekonda, antakse põhjalik ülevaade siiani tuvastatud *WNK1* geeni funktsioonide kohta ning selgitatakse *WNK1* seost vererõhu regulatsiooni ja hüpertensiooniga.

Töö praktilise osa eesmärgiks oli välja selgitada *WNK1* 10. intronis paikneva uue polümorfse *AluYb8* seos vererõhuga ja võimalik mõju geeni alternatiivsete vormide ekspressioonile. Samuti tehti kindlaks *WNK1* 10. introni ja sellega piirnevate eksonite konserveeritus inimese ja šimpansi vahel ning uuriti konkreetse *AluYb8* elemendi jaotuvust erinevates Euroopa, Aasia ja Aafrika populatsioonides.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Essentsiaalne hüpertensioon (EHT)

Hüpertensiooni määratletakse kui haiguslikku seisundit, kus inimese süstoolne ja diastoolne vererõhk püsivad puhkeseisundis järjepidevalt kõrgemal kui 140 mmHg ja 90 mmHg. Vastavalt vererõhu väärtustele jagatakse uuema klassifikatsiooni järgi seisund nelja klassi (tabel 1) (VII JNC raport, 2004).

Kõrgenenud vererõhk mõjutab kaasaegses ühiskonnas umbes 25% elanikkonnast ja on peamine riskifaktor paljudele laialt levinud haigustele nagu südame isheemiatõbi, infarkt, kongestiivne südamepuudulikkus ning neerude funktsiooni kahjustus (Lifton jt., 2001). Vastavalt VII JNC raportile (2004) on maailmas 1 miljard inimest, keda vaevab hüpertensioon ning on pakutud, et haigus on otseselt seotud 7,1 miljoni inimese surmaga aastas.

Olenevalt haiguse tekkepõhjusest võib hüpertensiooni jagada kaheks. EHT peetakse hüpertensiooni vormiks, millel puudub selgelt määratletud põhjus. See tähendab, et haiguslikud nähud ei kaasne koos mõne teise haigusega. EHT moodustab 90-95% kõigist hüpertensiooni juhtudest. Sekundaarse hüpertensiooni puhul on kõrgenenud vererõhk tingitud mõnest muust haigusest nagu primaarne hüperaldosteronism, Cushing'i sündroom, neuroendokriinne kasvaja ja neeruhaigus või kaasneb kõrgem vererõhk mõne ravimi kõrvalmõjuna (Binder, 2006).

Tabel 1. Hüpertensiooni klassifikatsioon vererõhu väärtuste alusel (VII JNC raport, 2004).

Klass	SVR (mmHg)	DVR (mmHg)
Normaalne	<120	<80
Prehüpertensioon	120-139	80-89
I astme hüpertensioon	140-159	90-99
II astme hüpertensioon	≥160	≥100

SVR – süstoolne vererõhk; DVR – diastoolne vererõhk

1.1.1 Hüpertensiooni (HT) monogeensed pärilikud vormid

Tänu viimase 15 aasta jooksul toimunud progressile genoomikas ja proteoomikas on kindlaks tehtud paljude pärilike hüpertensiooni vormide geneetiline taust (tabel 2) (Staessen jt., 2003). Praeguseks väljaselgitatud mehhanismiga monogeenseid HT vorme iseloomustavad kaks tunnust: esiteks kõigi vormide funktsionaalseks tagajärjeks on suurenenud Na⁺ ionide reabsorptsioon distaalses nefronis, teiseks plasma reniini aktiivsus on alati supresseeritud (Vehaskari, 2007). Kuigi monogeensed HT vormid moodustavad vaid 0,5% kõigist HT juhtudest (Kristjansson jt., 2002) on nendega seotud geenide uurimine tähtis avastamiseks uusi vererõhu kontrolli eest vastutavaid gene ja regulatsioonimehhanisme (Garcia jt., 2003).

1.1.2 Essentsiaalne hüpertensioon kui komplekshaigus

Essentsiaalset hüpertensiooni käsitletakse enamasti kui kompleksset kvantitatiivset tunnust, mis allub paljude geneetiliste ja keskkonnast lähtuvate faktorite koosmõjule. Perekondadega läbiviidud uuringud on näidanud, et vererõhu pärilikkus on 20% ümber, ulatudes 60%-ni kaksikutega tehtud töödes. Vererõhule kui multigeensele tunnusele viitab ka asjaolu, et siiani ei ole geneetikud suutnud tuvastada üksikuid gene, millel oleks EHT seisukohast suur efekt. Ilmselt osalevad vererõhu regulatsioonis paljud geenid, millest igaüks panustab tervikusse väikese osaga (Staessen jt., 2003).

Keskkonnafaktoritest panustavad vererõhu reguleerimisse enim inimese elustiil, toitumine, liigne soola, loomsete rasvade ja alkoholi tarbimine, suitsetamine ning stress (Gong ja Hubner, 2006). Elustiili muutmisel on võimalik saavutada positiivne mõju vererõhu alanemisele ja kardiovaskulaarse riski vähenemisele (Staessen jt., 2003). Graudal jt., 1998 on näidanud, et langetades päevast soola tarbimist kuue grammi võrra alandab hüpertoonikutel süstoolset vererõhku 3,7 mmHg ja diastoolset 0,9 mmHg võrra. Staessen jt., 1989 omakorda on näidanud, et kehakaalu langetamine ühe kilogrammi võrra alandab süstoolset rõhku 1,6 ja diastoolset 1,3 mmHg võrra.

Tabel 2. Hüpertensiooni pärilikud monogeensed vormid.

Sündroom	Geen	Haiguse mehhanism
1. Liddle sündroom (Shimkets jt., 1994)	<i>SCNN1β</i> <i>SCNN1γ</i>	ENaC aktiivsuse tõus
2. Gordoni sündroom e. PHAII (Wilson jt., 2001)	<i>WNK1</i> <i>WNK4</i>	NCC ja ENaC aktivatsioon
3. Mineraalkortikoidide liig (Wilson jt., 1995)	<i>HSD11β2</i>	Kortisooli konverteerimine kortisooniks on rikunud
4. Rasedusega ägenev hüpertensioon (Geller jt., 2000)	<i>NR3C2</i>	Mineraalkortikoidi retseptori aktiveerumine, mis põhjustab pidevalt stimuleeritud Na reabsorbtsiooni
5. Glükokortikoididega ravitav aldosteronism e. perekondlik hüperaldosteronism tüüp I (Lifton jt., 1992)	<i>CYP11B1</i> <i>CYP11B2</i>	CYP11B1 ja CYP11B2 geenide kimäär põhjustab ACTH stimuleeritud aldosterooni produksiooni
6. Perekondlik hüperaldosteronism tüüp II (Lafferty jt., 2000)	kromosoom 7p22	Liigne mineraalkortikoidide produksioon
7. Perekondlik glükokortikoidide resistentsus (Hurley jt., 1991)	<i>NR3C1</i>	Kortisooli ja androgeenide üleproduksioon, mis viib mineraalkortikoidi retseptori aktiveerumiseni
8. Hüpertensioon brahhüdaktüüliaga (Schuster jt., 1996)	kromosoom 12p11.2-12.2	Mehhanism teadmata

1.1.3 Essentsiaalse hüpertensiooni kandidaatgeenide tuvastamine

EHT kandidaatgeenide tuvastamiseks on peamisteks meetoditeks aheldusanalüüs ja assotsiatsiooniuuringud (Agarwal jt., 2005). Lisaks on oluliseks vahendiks kandidaatgeenide tuvastamisel loomudelid, milleks hüpertensiooni puhul kasutatakse enamasti rott (Mein jt., 2004).

Aheldusanalüüsi eelduseks on uuritava geneetilise markeri aheldus geeniga, mis põhjustab konkreetset fenotüüpi. Selleks uuritakse geneetiliste markerite lahknemist sugupuus ehk vaadatakse, kas kaks lookust lahknevad koos sagedamini, kui nad peaksid, arvestades, et nad ei ole kromosoomil füüsiliselt lähestikku (Agarwal jt., 2005). Binder'i, 2006 järgi on aastate jooksul vererõhu kui kvantitatiivse ja hüpertensiooni kui kvalitatiivse tunnuse vahel 19 uurimust tuvastanud statistiliselt olulise või sellele vihjavat aheldust kõikide kromosoomidega välja arvatud kromosoomidega 13, 14 ja 22. Siiski ühtegi tulemust ei ole suudetud korrata ning ühegi aheldusanalüüsiga pole tuvastatud aheldust teadaolevate EHT kandidaatgeenidega (Binder, 2006). Suurimaks aheldusanalüüsi uurimuseks on seni olnud BRIGHT (*British Genetics of Hypertension*), kus vaadeldi 3599 hüpertensiivset patsienti, kuid statistiliselt oluline tulemus suudeti tuvastada vaid ühe lookusega kuuendas kromosoomis (Caulfield jt., 2003) ning FBPP (*Family Blood Pressure Program*) uurimus, kus rohkem kui 6000 indiviidi kasutades statistiliselt olulisi tulemusi ei saadud (Province jt., 2003).

Komplekshaiguste nagu EHT geneetilise komponendi uurimiseks on sobivamaks meetodiks assotsiatsiooniuuringud, kus võrreldakse geneetiliste markerite (peamiselt SNP-de) sagedusi patsientide ja tervete kontrollide vahel. Selle meetodi puhul on oluline patsiendi- ja kontrollgrupi täpne määratlemine (Cardon ja Bell, 2001). Assotsiatsioon alleeli ja fenotüübi vahel võib esineda kolmel juhul: uuritav marker on ise otseselt seotud fenotüübiga; marker on ahelduse tasakaalustamatuse tõttu seotud fenotüüpi põhjustava SNP-ga; seos fenotüübi ja genotüübi vahel on juhuslik (Agarwal jt., 2005). Viimastel aastatel on tänu täiustunud genotüpiseerimismeetoditele läbi viidud suur hulk assotsiatsiooniuuringuid, mille tulemusena on näidatud rohkem kui 60 geeni seos vererõhuga (Binder, 2006). Paljud uurimused on tuvastanud seoseid reniin-angiotensiin-aldosteroon-süsteemi (RAAS) ja EHT vahel (Gong ja Hubner, 2006). *ACE* (kodeerib angiotensiini konverteerivat ensüümi) ja *AGT* (kodeerib angiotensinogeeni)

geenivariantidel on tuvastatud paljudes töödes nii positiivseid kui negatiivseid assotsiatsioone vererõhu regulatsiooni ja HT-ga. Tänu assotsiatsiooniuringutele on tuvastatud seoseid kandidaatgeenide ja vererõhu vahel ka väljaspool RAAS-i (Gong ja Hubner, 2006). Kamide jt., 2005 näitasid, et polümorfismid närvisüsteemi regulatsioonis osalevates geenides *GREB1* ja *HPCAL1* on seotud HT-ga. Oksüdatiivsetes protsessides osalevate geenide *CAT* (Zhou jt., 2005) ja *BDKRB1* ning *BDKRB2* (Cui jt., 2005) polümorfismidel on samuti tuvastatud seos HT-ga.

Näriliste abil EHT kandidaatgeenide tuvastamiseks aheldusanalüüsiga kasutatakse traditsiooniliselt hüpertensiivsete ja normaalse vererõhuga liinide ristandeid, et leida vererõhu kontrolliga seotud lookusi (Mein jt., 2004). Aheldusanalüüsiga on selliseid lookusi tuvastatud enamikest roti kromosoomidest, kuid probleemiks sellise meetodi puhul on leitud lookuste suur ulatus, mis raskendab konkreetsete geenide täpsemat identifitseerimist (Rapp, 2000).

1.2 *WNK1* kui essentsiaalse hüpertensiooni kandidaatgeen

1.2.1 *WNK* geeniperekonna üldiseloomustus

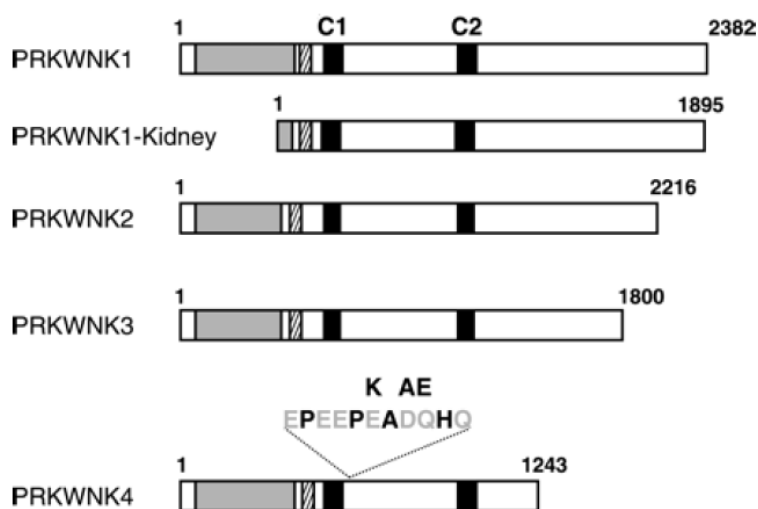
Esimene *WNK* geen (*WNK1*) isoleeriti 2000. aastal roti aju cDNA raamatukogust (Xu jt., 2000). Wilson jt., 2001 otsisid genoomi ja EST andmebaasidest inimese 12. kromosoomis paikneva *WNK1* paralooge ja leidsid lisaks kolm geeni, mis kodeerisid *WNK* isovorme. *WNK2* tuvastati inimese 9. kromosoomist, *WNK3* X kromosoomist ja *WNK4* 17. kromosoomist.

WNK1 katab genoomis 150 kb ala ja koosneb 28 eksonist, millest transkribeeritakse erinevates kudedes erineva pikkusega transkripte (Verissimo ja Jordan, 2001; Wilson jt., 2001). Geenil on mitu transkriptsiooni alguspunkti, millest esimene annab pikema, 12 kb transkripti. Teiselt promootorilt alustatud transkriptsiooni tulemuseks on lühem, umbes 10 kb transkript. Mõlemad transkriptid võivad varieeruda veel tänu kahe polüadenülatsiooni järjestuse kasutamisele ja koespetsiifilisele splaissingule. Mõlemad *WNK1* vormid ekspresseeruvad paljudes kudedes, kuid peamiselt südames, skeletilihastes, neerudes ja testistes. Tuvastatud on ka kolmas promootor neljandas intronis, mille transkript ekspresseerub vaid neerudes ja millel puudub kinaasset aktiivsust kodeeriv osa (Xu jt., 2002; Delaloy jt., 2003).

Inimese geenid *WNK2* ja *WNK3* on tekkinud arvatavasti *WNK1* duplitseerumise tagajärjel (Holden jt., 2004). *WNK3* katab genoomis 165 kb ja koosneb 24 eksonist. *WNK3*-l esineb kaks isovormi tänu 18. ja 22. eksoni alternatiivsele splaissingule. *WNK3* ekspresseerub väga madalal tasemel paljudes, eriti lootelistes kudedes, kuid 18. eksoni splaissingu vormi on tuvastatud vaid ajus.

WNK4 hõlmab inimese genoomis 16 kb ja koosneb 19 eksonist. Tuvastatud ei ole ühtegi erinevat splaissingu varianti ja esialgsed analüüsid oletasid, et geen ekspresseerub vaid neerudes (Wilson jt., 2001). Nüüdseks on selgunud, et *WNK4* on esindatud enamates kudedes, sealhulgas paljudes sekretoorse epiteeli rakkudes väljaspool neerusid, ajus, käärsooles, kõhunäärmes, sapijuhas ja munandimanuses (Kahle jt., 2004).

Wnk geenide poolt kodeeritud valgud kuuluvad proteiinkinaaside perekonda (joonis 1). Wnk kinaasidel on erinevalt kõigist teistest kinaasidest katalüütiline konserveerunud lüsiini jääk, mis tagab seondumise ATP-ga, II subdomeenis asendunud tsüsteiiniga. Wnk-de kinaasse aktiivsuse tagab lüsiini jääk I subdomeenis (Xu jt., 2000). Aminohappelise järjestuse põhjal on Wnk kinaaside omavaheline sarnasus 40%. Rohkem on konserveerunud kinaasest aktiivsust omav osa, autoinhibitoorne domeen ja kaks keerd-keerd domeeni. Wnk1 valgul on tuvastatud ka autofosforülatsiooni võime (Xu jt., 2002).



Joonis 1. Gamba, 2005 järgi. Wnk valkude lineaarne strukturealne organisatsioon. Hallid ristkülikud kujutavad valgu kinaasest domeeni, viirutatud ristkülikud autoinhibitoorset ja mustad (C1 ja C2) keerd-keerd domeene. Joonisel on kujutatud ka Wnk1 neeruspetsiifiline vorm, millel puudub kinaasne aktiivsus. Wnk4-l on näidatud muutused aminohappelises järjestuses, mis põhjustavad pseudohüpoaldosteronism II.

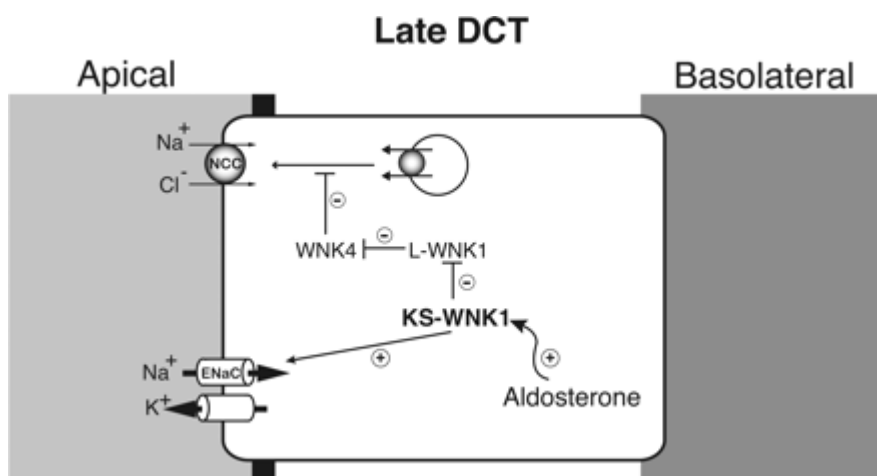
1.2.2 WNK1 geeni funktsioonid

Inimese *WNK1* geeni täispikk valk koosneb 2382 aminohappe jäägist (Verissimo ja Jordan, 2001) ning selle suurusest (251 kDa) lähtuvalt on ennustatud, et see võib seonduda kuni 50 valguga. Seega *WNK1* geenil võib olla väga palju funktsioone, millest siiani on kindlaks tehtud vaid väikene osa (Xu jt., 2005).

Kuna teatud mutatsioonid *WNK1* geenis põhjustavad hüpertensiooni monogeenset vormi PHAI (vt. peatükk 1.2.3), on siiani rohkem tähelepanu pööratud geeni nendele funktsioonidele, mille kaudu toimub soolade transpordi reguleerimine rakus ja läbi selle vererõhu regulatsioon. Enamus funktsionaalsetest uuringutest põhinevad *Xenopus laevis* ootsüütide või epiteelrakkude näitel (Zagorska jt., 2007).

Xenopus laevis ootsüütides on täheldatud, et WNK1 suurendab kaudselt tiasiid tundliku Na-Cl kotranspordi (NCC) aktiivsust. Otseselt seondub WNK1 WNK4-ga, inhibeerib seda ja WNK4 omakorda surub maha NCC aktiivsust, takistades NCC transpordi plasmamembraanile (Yang jt., 2003). Subramanya jt., 2006 uurisid WNK1 ja WNK4 seoseid täpsemalt ning näitasid, et neeruspetsiifiline lühike WNK1 vorm (KS-WNK1), mis on alternatiivsest eksonist 4a algava transkripti produkt, ei oma otsest efekti WNK4-le, vaid toimib kui dominantne negatiivne regulaator pikale WNK1 vormile (L-WNK1). KS-WNK1 inhibeerib L-WNK1 kinaasest aktiivsust, mistõttu L-WNK1 kaotab võime inhibeerida WNK4, mis omakorda surub maha NCC tööd, viies NCC aktiivsuse suurenemiseni (joonis 2).

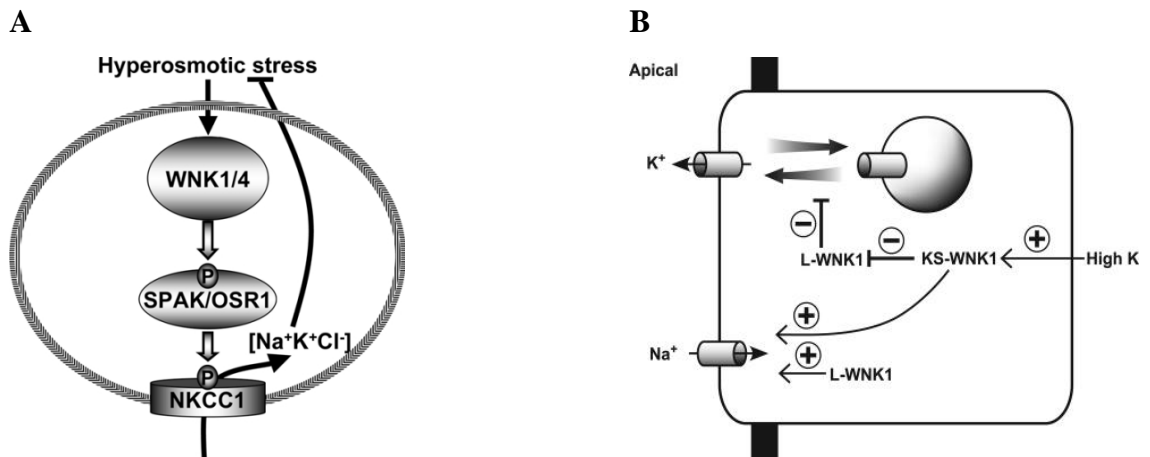
Naray-Fejes-Toth jt., 2004 näitasid *in vitro* katsetes hiire neerudest pärit kortikaalsete kogumistorukeste rakuliinis, et peamine Na^+ ja vee tasakaalu hormonaalne regulaator aldosteroon suurendab KS-WNK1 ekspressiooni ning KS-WNK1 vormil tõestati võime aktiveerida epiteeliaalset naatriumi kanalit ENaC võib mõjutada selle paiknemist rakus (joonis 2). Samas viidati, et aldosteroon pika WNK1 vormi ekspressiooni ei mõjuta. Xu jt., 2005 näitasid, et L-WNK1 aktiveerib seerum- ja glükokortikoid-indutseeritavat proteiinkinaasi SGK1, mis viib samuti ENaC aktiivsuse suurenemiseni (joonis 3 B).



Joonis 2. Subramanya jt., 2005 järgi. Joonis kujutab nefroni distaalse vääntorukese rakku. Näidatud on peamiste sooli transportivate ionkanalite paiknemist raku apikaalsel membraanil ning nende töö reguleerimist WNK1 vormide, WNK4 ja aldosterooni poolt. Pluss märgiga tähistatud jooned viitavad substraadi aktiveerimisele ja miinus märgiga jooned inhibeerimisele.

L-WNK1 seondub ja fosforüleerib sünaptotagmin 2 (Syt2), mis mõjutab Ca²⁺ seoselist Syt2 ja fosfolipiidvesiikulite vahelist interaktsiooni. Sellise mehhanismi abil on WNK1 võimeline reguleerima proteiinide liikumist plasmamembraani ja vesiikulite vahel. Kui mõjutada selliste membraanivalkude liiklust plasmamembraanile, mis vastutavad ionide transpordi eest, võib see muuta raku ionset tasakaalu. (Lee jt., 2004).

L-WNK1 ja WNK4 fosforüleerivad ja aktiveerivad STE20 (stress-related kinases) perekonda kuuluvaid kinaase SPAK (STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase) ja OSR1 (Oxidative Stress Response kinase-1) (Vitari jt., 2005). Eelnevalt olid Piechotta jt., 2002 näidanud, et SPAK ja OSR1 interakteeruvad osmootse ja oksüdatiivse stressi mõjul aktiveeritavate kation-kloriid-kotransporteritega KCC3 (K-Cl-kotransporter 3), NKCC1 (Na-K-2Cl-kotransporter 1) ja NKCC2 (Na-K-2Cl-kotransporter 2). Nüüdseks on näidatud, et ka WNK1 ise aktiveeritakse või autoaktiveerub epiteeliaalsetes rakkudes hüperosmootse stressi tõttu (Lenertz jt., 2005) ning ilmselt toimub SPAK ja OSR1 aktivatsioon L-WNK1 poolt osmootse stressi tingimustes ka *in vivo* (Zagorska jt., 2007) (joonis 3 A).



Joonis 3. (A) Vitari jt., 2005 järgi. Kujutatud on mehhanism, mille järgi hüperosmootne stress mõjutab läbi WNK1/WNK4 – SPAK/OSR1 signaaliraja NKCC1 kotransporterite aktiivsust. (B) Wade jt., 2006 järgi. Joonisel on näidatud kuidas nefroni distaalses vääntorukeses WNK1 vormid reguleerivad Na^+ ja K^+ transporti. Na^+ kanal joonisel on ENaC, mida sõltumatult reguleerivad nii KS-WNK1 ja L-WNK1. Pluss märgiga jooned tähistavad sihtmärgi aktiveerimist ja miinusemärgiga jooned inhibeerimist.

Hiljuti on Richardson jt., 2008 näidanud, et SPAK ja OSR1 kinaasid fosforüleerivad ja aktiveerivad ka tiasiid tundlikku Na-Cl kotransporterit NCC, mis tähendab, et L-WNK1 võib ka WNK4-st sõltumata NCC-d aktiveerida.

Wade jt., 2006 näitasid, et L-WNK1 inhibeerib K^+ kanalit Kir1.1 (ROMK1), vähendades selle hulka rakumembraanis (joonis 3 B). He jt., 2007 kirjeldasid mehhanismi, kuidas L-WNK1 ja WNK4 stimuleerivad klatriin-sõltuvat ROMK1 endotsütoosi, mis on kooskõlas ka eelnevalt kirjeldatud Lee jt., 2004 hüpoteesidega.

PHAI haigetel esineva kloriidioonide suurenenud paratsellulaarse reabsorptsiooni põhjuste uurimisega tegelenud Ohta jt., 2006, näitasid, et WNK1 üleekspressioon suurendab Cl^- rakkudevahelist läbilaskvust ning fosforüleerib tiheliidustes esinevaid claudin-4 valke MDCKII rakuliinis.

Sun jt., 2006 kirjeldasid WNK1 rolli hiire neuraalsetes tüvirakkudes (C17.2 rakuliin) ning näitasid, et L-WNK1 omab tähtsat rolli rakkude proliferatsioonil, migreerumisel ja diferentseerumisel. WNK1 ekspressiooni blokeerimine muudab nimetatud rakuliini morfoloogiat, takistades rakkude küpsemist, migreerumist ja pidurdab kasvu.

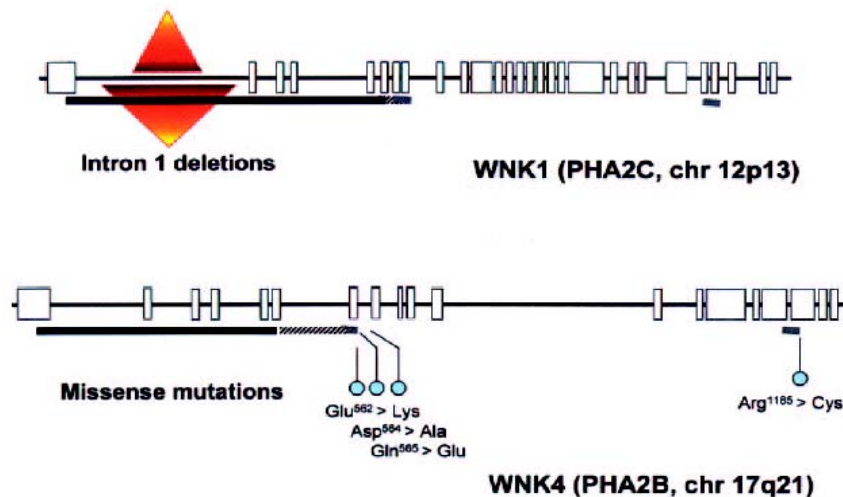
WNK1 rolli embrüonaalses arengus on näidanud ka Zambrowicz jt., 2003, kes „gene trapping“ meetodiga konstrueerisid *Wnk1* mutatsiooniga hiireliini. Hiired, kes olid homosügootsed tekitatud mutatsiooni suhtes surid embrüonaalse arengu käigus enne 13 päeva vanuseks saamist. Heterosügootsetel hiirtel tuvastati madalam vererõhk (keskmiselt 12,2 mmHg) võrreldes metsiktüüpi hiirtega, mille arvatavasti põhjustas madalam *Wnk1* geeni mRNA tase neeru, südame ja tuumuse rakkudes, sest patoloogilisi muutusi neerudes ei tuvastatud.

1.2.3 Pärilik hüpertensiooni vorm pseudohüpoaldosteronism tüüp II (PHAII)

WNK1 ja *WNK4* on seotud harva esineva mendeliaalselt päranduva autosomaalse monogeense haiguse PHAII ehk Gordoni sündroomi tekkega. Haigust põdevatel inimestel esineb kõrge vererõhk ja hüperkaleemia ehk kõrge kaaliumi sisaldus vereseerumis (Wilson jt., 2001). Hüperkaleemiat PHAII patsientidel seletavad eelnevalt kirjeldatud Wade jt., 2006 ja He jt., 2007 avastused. Patsientide peal läbiviidud kliinilistele uuringutele põhinedes on PHAII peamiseks patofüsioloogilisteks mehhanismideks suurenenud naatriumi reabsorptsioon läbi tiasiid tundliku NCC, mis tõstab vererõhku; suurenenud Cl⁻ ionide paratsellulaarne reabsorptsioon; metaboolne atsidoos, mida põhjustab H⁺ ionide sekretsiooni oluline vähenemine (Gamba, 2005).

WNK1 ja *WNK4* poolt kodeeritavad valgud lokaliseeruvad neerus distaalsete nefronite kortikaalsetes kogumistorukestes ja distaalsetes vääntorukestes, mis mängivad olulist rolli Na⁺, Cl⁻, K⁺, vee ja pH homeostaasis. PHAII-te põhjustavad mutatsioonid *WNK1* ja *WNK4* geenis. *WNK1* esimeses intronis olevad suured (21 ja 42 kb) deletsioonid (joonis 4) põhjustavad geeniekspressiooni viiekordset tõusu. *WNK4*-s on

tuvastatud neli koodonit muutvat mutatsiooni (joonis 4), mis asuvad geeni konserveerunud alades (Wilson jt., 2001).



Joonis 4. Faure jt., 2003 järgi. Joonisel on toodud inimese *WNK1* ja *WNK4* genoomne struktuur, kromosomaalne lokalisatsioon ja neis geenides esinevad mutatsioonid, mis põhjustavad PHAII vorme C ja B. Valged ristkülikud kujutavad eksoneid. Must jämedam joon mõlema geeni puhul viitab olulisematele domeenidele valgus. Oranžid kolmnurgad *WNK1* puhul esimeses intronis näitavad suuri deletsioone (21 ja 42 kb) *WNK4* puhul osutavad helesinised täpid nelja koodonit muutvat mutatsiooni.

1.2.4 *WNK1* ja essentsiaalne hüpertensioon

Mutatsioonid *WNK1* geenis põhjustavad HT monogeenset vormi PHAII, mistõttu on see sobilik ka EHT kandidaatgeeniks. Funktsionaalsed *WNK1* geenivariandid, mis muudavad geeniekspressiooni, võivad läbi erinevate funktsioonide mõjutada vererõhku. Siiski arvatakse, et üldlevinud *WNK1* variandid ei muuda inimese vererõhku rohkem kui mõne millimeetri võrra elavhõbeda sambal (Newhouse jt., 2005).

Kokubo jt., 2004 tuvastasid *WNK1*, *WNK4* ja *NCC* kodeerivatest aladest 108 ühenukleotiidset polümorfismi (SNP), millest 21 genotüpiseeriti 1818 jaapanlasel (771 hüpertensiooni patsienti ja 1047 kontrolli). Assotsiatsioon vererõhuga näidati ühe *WNK4* SNP-ga, mille puhul meestel, kes kandsid minoorset alleeli oli süstoolne

vererõhk 3,1 mmHg võrra kõrgem. *WNK1* ja *NCC* SNP-de ja vererõhu vahelist assotsiatsiooni ei tuvastatud.

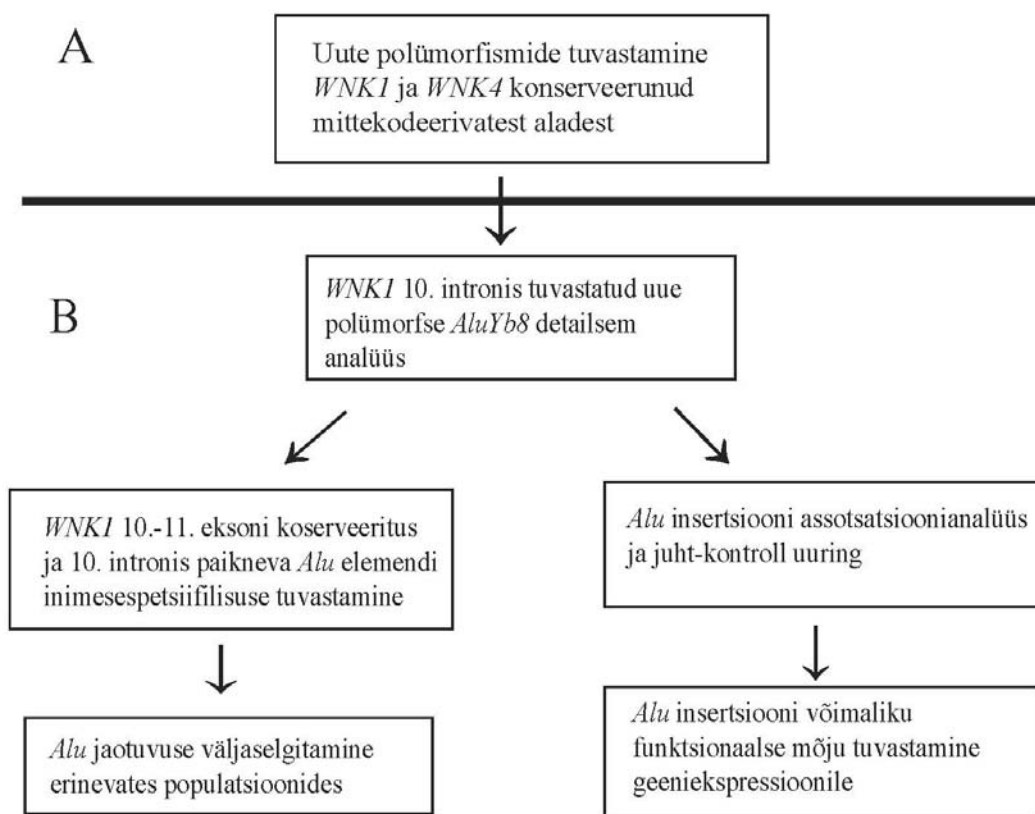
Uuritud on ka *WNK1* variantide ja tiasiiddiureetikumide ravi seost 585 (291 Atlanta mustanahalist ja 294 Rochesteri valgenahalist) hüdroklorotiasiidi saaval essentsiaalse hüpertensiooni patsiendil. Tuvastati kolm polümorfismi, mille abil oli ravi saanud indiviididel võimalik 2-4% varieeruvusega ennustada ravi mõju süstoolse ja diastoolse vererõhu väärtustele. SNP-d paiknesid geeni esimeses ja teises intronis ning kaheksandas eksonis (Turner jt., 2005).

Newhouse jt., 2005 viisid läbi assotsiatsiooniuringu, kasutades 712 BRIGHT (*British Genetics of Hypertension*) uuringu hüpertensiivset perekonda. Assotsiatsiooni hüpertensiooni ja 19 *WNK1* polümorfismi ning kaheksast tagSNP-st moodustatud haplotüübi vahel ei leitud. Siiski näidati *WNK1* promootori lähedal paikneva SNP seos süstoolse ja diastoolse vererõhuga ning ühe üldlevinud haplotüübi (sagedus 0,108) ja süstoolse vererõhu vahel.

Tobin jt., 2005 uurisid assotsiatsiooni *WNK1* variantide ja vererõhu vahel, kasutades üheksat SNP-d, millest kaheksa kattusid Newhouse jt., 2005 töös vaatluse all olnud tagSNP-dega. Nad kasutasid täpsemaid vererõhu andmeid, mis võimaldas neil eraldi analüüsida 24 tunni, öö ja päeva keskmisi süstoolse ja diastoolse vererõhu väärtusi. Uurimus viidi läbi 252-st perekonnast pärit 1005 indiviidiga, kes kõik olid valgenahalised eurooplased. Töö tulemusena näidati kuue polümorfismi ja erinevatel aegadel mõõdetud keskmiste vererõhu süstoolsete ja/või diastoolsete või mõlemate näitute vahelist statistiliselt olulist assotsiatsiooni. Samuti näidati kaheksast SNP-st moodustatud viieteistkümnest haplotüübist seitsmel olevat statistiliselt tähendusrikas seos ühe või rohkema eri ajal mõõdetud vererõhu näiduga.

2. TÖÖ EESMÄRGID JA ÜLESEHITUS

Magistritöö eesmärgiks oli viia läbi bakalaureuse astmes *WNK1* 10. intronis tuvastatud uue polümorfse *AluYb8* insertiooni detailsem analüüs, selgitada välja *Alu* jaotuvus erinevates populatsioonides ja teha kindlaks selle võimalik seos vererõhuga ning mõju geeni funktsioonile. Töö ülesehitus on esitatud skeemina joonisel 5.



Joonis 5. Töö skeem. A osa viidi läbi bakalaureuse õppeastmes. B osa etapid teostati käesoleva magistritöö raames.

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1 *Alu insertiooni sisaldava piirkonna amplifikatsioon*

WNK1 genoomne järjestus saadi Ensembl andmebaasist (<http://www.ensembl.org/index.html>). *AluYb8* insertiooni tuvastamiseks disainiti praimerid geeni 10. introni vastava piirkonna amplifitseerimiseks, kasutades veebiaadressil <http://frodo.wi.mit.edu/> vabalt kasutatavat programmi Primer3 (Rozen ja Skaletsky, 2000). Praimerite järjestused on toodud lisas 1 osas A. Disainitud praimerite unikaalsuse kontrolliks kasutati NCBI (National Center for Biotechnology Information) programmi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

PCR reaktsioonisegu lõppmahus 15 µl sisaldas 1,5 µl 10X reaktsioonipuhvrit [750 mM Tris-HCl (pH 8,8 25° juures), 200mM (NH₄)₂SO₄ ja 0,1% Tween 20], 1,5 µl 25 mM MgCl₂, ja 1,5 µl 2,5 mM dNTP segu (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Leedu) 0,375 U FIREPol® Taq DNA polümeraasi (Solis BioDyne, Tartu, Eesti) 0,4 µl 10 pmol/µl F ja R praimereid (Metabion) ja 30 ng genoomset DNA-d.

Sünteesireaktsioonid viidi läbi GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) masinatega järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	4 min	}	10 tsükli, temperatuuri langus 1°C tsükli kohta
Denaturatsioon	95°C	20 sek		
Praimerite seondumine	68°C	30 sek		
Ekstensioon	72°C	1 min 20 sek		
Denaturatsioon	95°C	20 sek	}	12 tsükli
Praimerite seondumine	60°C	30 sek		
Ekstensioon	72°C	1 min 20 sek		

Denaturatsioon	95°C	20 sek	} 12 tsükli
Praimerite seondumine	58°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min 20 sek	
Inkubatsioon	72°C	7 min	
Säilitamine	4°C		

Alu insertiooni olemasolu kontrolliti 1% agarosgeelil TBE-s.

3.2 Alu insertiooni tuvastamine primaatidel ja WNK1 10.-11. eksoni resekveerimine inimesel ja šimpansil

AluYb8 insertiooni olemasolu uuriti üheteistkümnel šimpansil (*Pan troglodytes*), ühel gorillal (*Gorilla gorilla*) ja ühel orangutanil (*Pongo pygmaeus*). Kümne šimpansi DNA proovid saadi koostöös Svante Pääboga (Max-Planck-Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Saksamaa) ning ühe šimpansi DNA saadi Tallinna Loomaaia isaselt isendilt Pinolt. Orangutani (rakuliin AG12256) ja gorilla (rakuliin AG05251B) DNA osteti <http://locus.umdj.edu> veebilehe kaudu. Insertiooni tuvastamiseks primaatidel kasutati samu praimereid, millega tehti *Alu* olemasolu kindlaks ka inimesel.

Alu insertiooni sisaldava DNA piirkonna konserveerituse tuvastamiseks sekveeriti šimpansi, inimese *Alu* insertiooniga homosügoodi ja *Alu* insertioonita homosügoodi *WNK1* genoomne ala, mis kattis eksoni 10 kuni 11 (kaasa arvatud). Nii inimese kui šimpansi vastavate alade sekveerimiseks kasutati samasid praimereid. Konserveerituse väljaselgitamiseks joondati saadud järjestused programmiga ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).

3.2.1 Ekson 10-11 amplifikatsioon ja resekveerimine

PCR ja sekveerimispraimerid disainiti programmiga Primer3 (Rozen ja Skaletsky, 2000). Praimerite järjestused on toodud lisas 1 osas B.

Esmalt amplifitseeriti *WNK1* genoomne piirkond, mis sisaldas eksoneid 10-11, kasutades praimereid WNK1_seq1_F (kasutati ka sekveneerimisel) ja WNK1_Seq_R. PCR reaktsioonisegu lõppmahus 30 µl sisaldas 3 µl 10X Long reaktsioonipuhvrit koos 15 mM MgCl₂, 3 µl 2,5 mM dNTP segu, 0,9 µl DMSO ja 1,25 U DNA polümeraasi Long PCR Enzyme Mix (Fermentas), 1 µl 10 pmol/µl F ja R praimereid (Metabion) ja 150 ng genoomset DNA-d. PCR viidi läbi GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) masinatega järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	3 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} 10 tsüklit
Praimerite seondumine	58°C	30 sek	
Ekstensioon	68°C	2 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	
Praimerite seondumine	56°C	30 sek	
Ekstensioon	68°C	2 min	
Inkubatsioon	68°C	10 min	
Säilitamine	4°C		

Kasutamata jäänud praimerite ja desoksünukleotiidide eemaldamiseks teostati PCR produktide töötlus. Selleks kasutati eksonukleas I-te (ExoI) ja krevetil aluselist fosfataasi (sAP). Reaktsioonisegu valmistati suhtes 0,5 osa ExoI-te (20U/µl, MBI Fermentas) ja 9,5 osa sAP-i (1U/µl, MBI Fermentas). Olemasolevatele PCR produktidele lisati 1,5 µl ensüümide segu ning ensüümtöötuse reaktsioonid viidi läbi GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) masinatega järgmistel tingimustel:

Inkubatsioon	37°C	20 min
Inaktiveerimine	80°C	15 min
Säilitamine	4°C	

Puhastatud PCR proovidega teostati sekveneerimisreaktsioonid. Selleks kasutati BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'i (Applied Biosystems). Reaktsioonisegu lõppmahus 10 µl sisaldas 1,3 µl puhastatud PCR produkti, 1,8 µl 5X BigDye Terminator v3.1 lahjenduspuhvrit, 0,4 µl sekveneerimise premix'i BigDye RR-100 mix v3.1, 1 µl 5 pmol/µl praimerit ja 5,5 µl ddH₂O. Reaktsioonid viidi läbi ABI PCR (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700) masinatega järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	96°C	1 min	} 25 tsüklit
Denaturatsioon	96°C	10 sek	
Praimerite seondumine	50°C	5 sek	
Ekstensioon	60°C	4 min	
Inkubatsioon	10°C	7 min	
Säilitamine	10°C		

Järgnevalt PCR produktid sadestati. Igale proovile (10µl) lisati 1,5 µl ammooniumatsetaadi ja dekstraani segu (1 µl ammooniumatsetaadi puhvrit [10M (pH>8)/EDTA (250mM)] ja 0,5 µl dekstraani). Produktid segati hoolikalt läbi ning igale proovile lisati 30 µl 96% külma etanooli ja asetati 15 minutiks -20°C juurde sadenema. Proovid tsentrifugeeriti 20 min. 16100 rcf (*relative centrifugal force*) juures peale mida eemaldati supernatant. Igale proovile lisati 200 µl külma 70% etanooli ning tsentrifugeeriti 10 min. 16100 rcf juures. Eemaldati hoolikalt supernatant ja proove kuivatati 10-15 minutit 37°C juures. Peale etanooli aurustumist lahustati proovid 10 µl 70% formamiidis (AppliChem GmbH, Saksamaa).

Proovid sekveneeriti Applied BioSystems 3730xl DNA Analyser kapillaarsekvenaatoriga. Sekveneeritud järjestuste kvaliteeti kontrolliti programmiga BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall T., Department of Microbiology, North Carolina State University).

3.3 AluYb8 insertiooni jaotuvus erinevates populatsioonides

Alu insertiooni jaotuvus tehti kindlaks viies Euroopa, viies Aasia ja kaheksas Aafrika populatsioonis.

Euroopast olid esindatud eestlased (n=1140) [prof. Maris Laane eestvedamisel kogutud DNA proovid koostöös Põhja-Eesti Verekeskusega ja Tartu Ülikooli (TÜ) Kliinikumi Verekeskusega ning TÜ Kliinikumi (dots. Tiina Ristimäe, dr. Gudrun Veldre ja dots. Mai Rosenberg) ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglaga (prof. Margus Viigimaa ja dr. Aleksei Teor)], tšehhid (n=383) [Dr. Viktor Kozich (Charles University First Faculty of Medicine, Institute of Metabolic Disease)], baskid (n=50), kataloonlased (n=41) [prof. David Comas ja prof. Jaume Pertranpetit (Universitat Pompeu Fabra, Unitat de Biologia Evolutiva)] ja CEPH/Utah perekondade proovid (n=30) (<http://ccr.coriell.org/>).

Aasia populatsioonide hulka kuulusid hannid (n=25) [HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel (<http://www.cephb.fr/HGDP-CEPH-Panel/>)], korealased (n=43) [Dr. Woo Chul Moon (Good-Gene Inc. Seoul, Korea)], tatarlased (n=47), baškiirid (n=47) [Elza Khusnudtinova (Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences)] ja Hispaanias elavad mustlased (n=50) (David Comas ja Jaume Pertranpetit).

Aafrikast kasutati töös mandenkaalude (n=24) (HGDP-CEPH), Lääne-Sahaara elanike saharaavide (n=50), tansaanlaste (n=17), bantu keelt rääkivad gabonlaste (n=50), pügmeede (n=50), tuneeslaste (n=48), alžeerlaste (n=48) ja viie erineva Maroko valimi (kokku n=84) DNA proove (David Comas ja Jaume Pertranpetit).

Statistilisi erinevusi alleelisagedustes populatsioonide vahel analüüsiti Fisher'i Exact testiga veebiadressil <http://www.langsrud.com/fisher.htm>.

3.4 Assotsiatsiooniuringud

Assotsiatsiooniuringu võib käesolevas töös jagada kolmeks:

1. vererõhu seos *Alu* insertiooniga
2. juht-kontroll uuring
3. Glomerulaarse filtratsiooni taseme (GFR) ja vere seerumi biokeemia markerite seos *Alu* insertiooniga

3.4.1 Assotsiatsiooniuringusse kaasatud indiviidid

Alu insertiooni seose väljaselgitamiseks vererõhuga koguti indiviide (tabel 3) koostöös Põhja-Eesti Verekeskusega ja TÜ Kliinikumi Verekeskusega. Lisaks kaasati uuritavaid, kes koguti koostöös TÜ Kliinikumi ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglaga. Verekeskuste kaudu uuringus osalejad (n=850) olid kas esmased või korduvad veredoonorid, kes ei olnud tarbinud vererõhuravimeid. Doonorite vererõhk mõõdeti vereloovutamisele eelnenud arstliku ülevaatuse käigus. TÜ Kliinikumist ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglast koguti hüpertensiooni patsiendid (n=290), kellel olid haigusloos olemas vererõhu näidud enne vererõhuravimite tarvitamise alustamist. Uuringus osalejate kehamassi indeksi (BMI) väärtus jäi alla 36.

Tabel 3. Vererõhu ja *Alu* insertiooni seose uurimiseks kasutatud indiviidide kirjeldus.

	Koos	Mehed	Naised
Indiviidide arv	1140	390	750
Vanus ¹	43,4 ± 12,1	41,1 ± 11,9	44,6 ± 12
BMI	26 ± 3,8	26,6 ± 3,4	25,7 ± 4
Süstoolne vererõhk (mmHg)	140,1 ± 18,4	143,5 ± 15,7	138,3 ± 19,4
Diastoolne vererõhk (mmHg)	86,6 ± 10,6	88,1 ± 10,4	85,8 ± 10,6

Keskmiised väärtused ± standardhälve. ¹ Keskmise vanuse vererõhu mõõtmise ajal

Juht-kontroll uuringus kasutatud indiviidid (tabel 4) olid samuti kogutud koostöös eespool nimetatud verekeskustega ja haiglatega. Antud uuringus olid kontrollid (n=362) määratletud kui isikud, kes ei olnud saanud antihüpertensiivseid ravimeid ning kelle süstoolse vererõhu (SVR) mediaanväärtus oli ≤ 130 ja diastoolse vererõhu (DVR) mediaanväärtus ≤ 80 . Isik määrati kontrolliks ka juhul, kui kriteeriumile vastas kas ainult SVR või ainult DVR mediaanväärtus. Patsientideks (n=414) loeti isikud, kellel oli diagnoositud essentsiaalne hüpertensioon ja kes tarbisid vererõhku alandavaid ravimeid. Lisaks kaasati patsientidena uuringusse indiviidid, kelle SVR ≥ 160 ja DVR ≥ 100 juhul, kui nad ei saanud antihüpertensiivseid ravimeid või oli neil mõõdetud vererõhu näidud enne ravi algust. Sarnaselt kontrollidega kaasati ka patsientide gruppi isikud, kes sobisid valimisse ainult SVR või DVR mediaanväärtuse järgi. Patsiendi grupist jäid välja need, kelle BMI > 35 , kes põdesid diabeeti, kannatasid neerupuudulikkuse all või kellel oli hüpertensioon diagnoositud hiljem kui 55 eluaastal meeste ja 65 eluaastal naiste puhul.

Tabel 4. Juht-kontroll uuringus kasutatud valimi kirjeldus.

	Kontrollid			Patsiendid		
	Mehed	Naised	Koos	Mehed	Naised	Koos
n	67	295	362	146	268	414
Vanus	35 ± 8	38,9 ± 8,7	38,2 ± 8,7	40,4 ± 11,5	47,6 ± 11,6	45,1 ± 12,
BMI	24,7 ± 2,7	23,7 ± 3	23,9 ± 3	28,2 ± 3,1	28,3 ± 3,9	28,5 ± 3,6

Keskmiised väärtused ± standardhälve; n – indiviidide arv; BMI – kehamassi indeks

Neerude töö efektiivsust iseloomustava suuruse GFR-i ja vere seerumi biomarkerite väärtuste seose uurimiseks *Alu* insertsiiooniga moodustati grupp (n=653), kuhu kaasati indiviidid, kes olid kogutud koostöös TÜ Kliinikumi ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglagaga. Verekeskuste kaudu saadud proove ei kasutatud, kuna nende isikute biokeemia andmed puudusid. Biokeemia väärtused olid mõõdetud TÜ Kliinikumi Ühendlaboris ja Põhja-Eesti Regionaalhaigla laboris. Analüüsis kasutati vere seerumist määratud üldkolesterooli, LDL, HDL, triglütseriidide, uurea, kusihappe, kreatiniini ja albumiini kontsentratsioone. GFR-i arvutamiseks kasutati Levey jt., 1999 välja töötatud

valemit, mis arvestas inimese vanust, sugu ja rassi ning vere seerumi kreatiniini (mg/dL), uurea (mg/dL) ja albumiini (g/dL) kontsentratsiooni:

$$\text{GFR}(\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2)=170 \times (\text{kreatiniin})^{-0,999} \times (\text{vanus})^{-0,176} \times (\text{uurea})^{-0,17} \times (\text{albumiin})^{0,318} \\ \times (0,762 \text{ kui naine}) \times (1,18 \text{ kui mustanahaline})$$

3.4.2 Statistiline analüüs

Assotsiatsiooniuringu statistiline analüüs viidi läbi käsurea programmiga PLINK (versioon 1.01), mis on vabalt kättesaadav internetiaadressilt <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>. PLINK on välja töötatud kogu genoomi assotsiatsiooniuringute analüüsides teostamiseks (Purcell jt., 2007) ning on fokuseeritud genotüübi ja fenotüübi andmete analüüsile. Vererõhu, biokeemia markerite ja GFR-i assotsiatsiooni hindamiseks *Alu* insertiooniga viidi läbi lineaarne regressioonanalüüs, kus kasutati aditiivset alleelidoosi mudelit. Andmeid analüüsiti ka tõepära suhte testiga (LRT). Juht-kontroll uuringus kasutati aditiivset mudelit logistilisel regressioonanalüüsil. Läbiviidud testides loeti statistiliselt tähendusrikkaks olulisustõenäosust $p < 0,05$.

Kvantitatiivne analüüs viidi läbi iga indiviidi vererõhunäitude mediaanväärtustega. Lineaarne ja logistiline regressioonanalüüs viidi läbi väärtustega, mis olid kohandatud isiku sooga, kehamassi indeksiga ja erinevate vererõhu mõõtmiste vanuse mediaanväärtusega. GFR-i andmeid nimetatud parameetritega ei korrigeeritud. Tõepära suhte test ei võimaldanud sellist väärtuste korrigeerimist.

Genotüüpide vererõhu väärtuste erinevuste visualiseerimiseks karp-vurrud diagrammil kasutati statistilise analüüsi paketti R, mis on vabavarana kättesaadav veebiaadressilt <http://www.r-project.org/>.

3.5 *Alu* insertiooni funktsionaalsed uuringud

3.5.1 RNA eraldamine ja cDNA süntees

Uuritavate indiviidide (tabel 5) veri koguti 9 ml katsutitesse (Vacuette® K₃EDTA, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria), mis koagulandina sisaldasid EDTA-d. RNA eraldamisega jätkati võimalikult kiiresti, et vähendada RNA lagunemise tõttu tingitud saagise kadu. On näidatud, et EDTA katsutites hoitud veres mRNA kontsentratsioon väheneb aja jooksul (Rainen jt., 2002).

Leukotsüütide RNA eraldati 9 ml verest, kasutades RNA eralduskomplekti LeukoLOCK™ Total RNA Isolation System (Ambion, Inc, Austin, Texas, USA). Vastavalt protokollile viidi läbi ka valikuline TURBO™ DNase töötlus, et degradeerida genoomne DNA. Eraldatud RNA kontsentratsioon mõõdeti aparaadiga NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, Delaware, USA).

cDNA süntees viidi läbi komplektiga First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Leedu). Reaktsioonisegu lõppmahus 20 µl sisaldas järgmisi komponente: 0,5 µg RNA-d, 4 µl 5X reaktsiooni puhvrit [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 25° juures), 250 mM KCl, 20mM MgCl₂, 50 mM DTT], 0,5 µg oligo(dT)₁₈ praimerit, 20 U ribonukleas A inhibiitorit RiboLock™ RNase Inhibitor, 2µl 10 mM dNTP segu 40 U M-MuLV pöördtranskriptaasi ja DEPC töödeldud vett. Proove inkubeeriti algselt 5 min 70° juures, pöördtranskriptsiooni reaktsioon toimus 60 min 37° juures ja reaktsioon peatati kuumutamise 70° juures 10 min jooksul, et inaktiveerida pöördtranskriptaas.

Tabel 5. Geeniekspressiooniuringusse kaasatud indiviidide iseloomustus.

	-/-			A/-			A/A		
	Ind 1	Ind 2	Ind 3	Ind 4	Ind 5	Ind 6	Ind 7	Ind 8	Ind 9
Sugu	M	M	N	M	M	M	M	N	N
Vanus	28	42	27	29	25	22	45	47	63

-/- ilma *Alu*-ta homosügoidid; A/- *Alu*-ga heterosügoidid; A/A *Alu*-ga homosügoidid.

3.5.2 Funktsionaalseteks uuringuteks kasutatud praimerite disain

Praimerid uuritavale genoomsele piirkonnale disainiti nii, et oleks võimalik amplifitseerida kõik teadaolevad splaissingu vormid, mis jäävad *WNKI* geeni 8 ja 13 eksoni vahele. Näidatud on, et *WNKI* geenis splaissitakse eksoneid 9, 11 ja 12 (Delaloy jt., 2003). Geeniekspressiooni semikvantitatiivseks uuringuks amplifitseeriti kolm piirkonda: ekson 8 kuni ekson 10, ekson 8-13 ja ekson 10-13. Välimised praimerid paigutusid eksonite piirile, et välistada võimaliku genoomse DNA kontaminatsiooni amplifitseerumist. Seega väline F (forward) praimer kattus osaliselt eksoniga 7 ja väline R (reverse) praimer kattus osaliselt eksoniga 14. F praimerite 5' otsad olid märgitud fluorestseeruva värviga 6-FAM (Metabion International AG, München, Saksamaa), et oleks võimalik detekteerida amplifitseeritudprodukte ABI PRISM 373 sekvenaatoriga (Applied Biosystems). Kirjeldatud praimerid disainiti programmi Primer3 modifitseeritud versiooni mPrimer3 abil, mis oli saadaval veebiaadressil <http://bioinfo.ebc.ee/mprimer3/>.

Ekspressiooniuuringus kasutati võrdlusena kahte geeni: glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas (*GAPDH*) ja RNA polümeraas II suurima subühiku geen (*RPII*). Sobilikud praimerite järjestused *GAPDH* ja *RPII* amplifitseerimiseks saadi varem avaldatud töödest vastavalt Miller-Lindholm jt., 1997 ja Radonic jt., 2004. *GAPDH*-i R praimer 5'ots oli märgitud fluorestseeruva värviga HEX ja *RPII*-e R praimer 5'ots värviga TET (Metabion). Praimerite järjestused on esitatud lisas 1 osas C.

3.5.3 Erinevate splaissvormide ja referentsgeenide amplifikatsioon

Uuritavate indiviidide cDNA-ga viidi läbi PCR lõppmahus 30 µl, mis sisaldas 3 µl 10X reaktsioonipuhvrit [750 mM Tris-HCl (pH 8,8 25° juures), 200mM (NH₄)₂SO₄ ja 0,1% Tween 20], 3 µl 25 mM MgCl₂, 3 µl 2,5 mM dNTP segu ja 0,75 U Taq (rekombinantne) DNA polümeraasi (Fermentas), 0,8 µl 10 pmol/µl F ja R praimereid (Metabion) ja 1 µl cDNA sünteesi produkti.

Amplifikatsioonid viidi läbi GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) masinatega. *WNKI* kolme piirkonna ja *RPII* järjestuse amplifitseerimiseks teostati PCR järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	2 min 30 sek	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} 10 tsüklit, temperatuuri langus 1°C tsükli kohta
Praimerite seondumine	64°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min 20 sek	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} <i>WNKI</i> 13 tsüklit
Praimerite seondumine	54°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min 20 sek	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} <i>RPII</i> 11 tsüklit
Praimerite seondumine	52°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min 20 sek	
Inkubatsioon	72°C	7 min	
Säilitamine	4°C		

GAPDH järjestus amplifitseeriti järgmistel tingimustel:

Algne denaturatsioon	95°C	2 min 30 sek	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} 10 tsüklit, temperatuuri langus 1°C tsükli kohta
Praimerite seondumine	61°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} 14 tsüklit
Praimerite seondumine	51°C	30 sek	
Ekstensioon	72°C	1 min	
Inkubatsioon	72°C	7 min	
Säilitamine	4°C		

PCR produktide olemasolu kontrolliti elektroforeesiga 3% agarosgeelil TBE-s.

3.5.4 Ekspressiooniuring GeneScan meetodiga

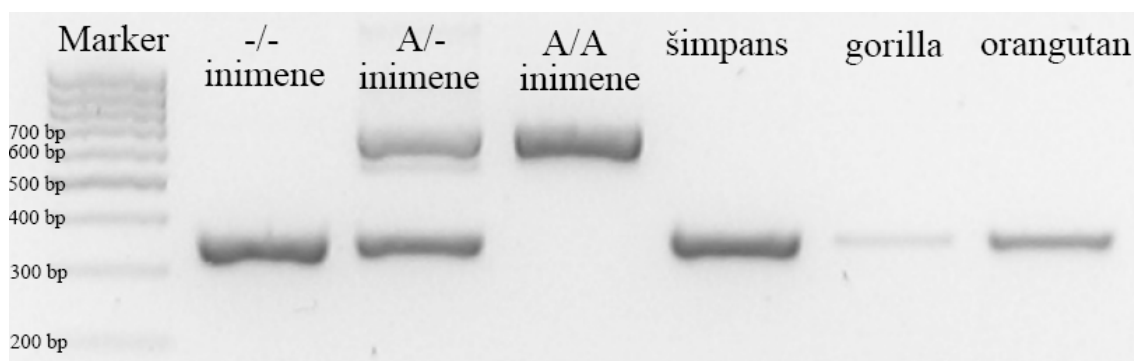
Erinevate splaissvormide ekspressiooniuringuks kasutati semikvantitatiivset meetodit GeneScan. Ühe *WNKI* uuritava piirkonna PCR produkt segati võrdses koguses (1 µl) kokku referentsgeenide *GAPDH* ja *RPII* PCR produktidega, lisati 0,25 µl fluorestseeruva märkega pikkusmarkerit GeneScan™ 2500 TAMRA™ Size Standard ja 0,75 µl pikkusmarkeriga kaasasolevat värvi (Applied Biosystems), 1 µl 70% formamiidi (AppliChem GmbH) ja 1 µl vett. Seega kolm uuritavat *WNKI* geeni piirkonda analüüsiti eraldi. Kokkusegatud ühendeid kuumutati 2 min 90° juures ja kanti 6% denatureerivale polüakrüülamiidgeelile 0,5X TBE puhvril. Elektroforees viidi läbi aparaadiga ABI PRISM 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Tulemusi analüüsiti GeneScan 2.1 tarkvaraga, mis eristas geelile kantud erinevad PCR produktid pikkuse järgi. Programm esitas vastava fluorestseeruva mägisega produkti graafikul piigina, tuues välja piigi kõrguse ja pindala, mille piik enda alla võtab. Antud töös võeti andmete analüüsil arvesse vaid piigi pindala. Iga splaissvormi suhteline ekspressioonitase arvutati kui splaissvormi piigi pindala suhe võrdlusgeeni piigi pindalasse.

4. TULEMUSED

4.1 *Alu* insertiooni inimesespetsiifilisus ja *WNKI* 10.-11. eksoni konserveeritus

Genotüpiseeritud gorillal, orangutanil ja üheteistkümnel šimpansil, *AluYb8* insertiooni *WNKI* 10. intronis ei tuvastatud (joonis 6). Insertiooni puudumine uuritud primaatidel viitab konkreetse *AluYb8* elemendi inimesespetsiifilisusele.



Joonis 6. Geelipilt inimesel ja primaatidel *Alu* insertiooni tuvastamisest. -/- ilma *Alu*-ta homosügoot; A/- *Alu*-ga heterosügoot; A/A *Alu*-ga homosügoot. Marker: MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas).

Uuritava *WNKI* genoomse piirkonna konserveerituse väljaselgitamiseks resekveneeriti geeni 10. intron koos sellega piirnevad 10. ja 11. ekson. Vastav ala resekveneeriti šimpansil ning kahel inimesel, kellest üks oli *Alu* insertiooniga homosügoot ja teine ilma *Alu*-ta homosügoot. Saadud järjestuste ClustalW2 programmi poolt koostatud joondus on esitatud lisas 2.

WNKI geeni 10. ja 11. ekson on inimesel ja šimpansil kõrgelt konserveerunud. 10. ekson on 100% identne ning 459 bp pikkune 11. ekson erineb inimesel ja šimpansil vaid ühe nukleotiidi poolest. Samuti on tugevalt konserveerunud 10. intron ja seda just rohkem introni esimeses pooles ja piirkonnas kuhu on inimesel inserteerunud *AluYb8*

järjestus. 10. introni allavoolu jäävas pooles on inimese ja šimpansi vahel toimunud muutusi rohkem.

Inimese *Alu*-ga ja *Alu*-ta homosügootide järjestuste võrdlusel tuvastati järjestuse erinevusi kahes kohas. Joondusel *Alu*-ta inimese järjestuse 1181. positsioonis esineb C nukleotiid. *Alu*-ga järjestuse samas positsioonis on T nukleotiid. Tegemist on SNP-ga rs880054 (minoorse alleeli C sagedus Inglismaa populatsioonis 43,8%), millel on varasemalt näidatud seos vererõhuga (Tobin jt., 2005). Selle põhjal võib oletada, et *AluYb8* on inserteerunud kirjeldatud positsioonis T nukleotiidi kandvasse alleeli. Joonduselt oli tuvastatav, et *Alu*-ta järjestuse 1236 positsioonilt algav polü-T ala oli kahe nukleotiidi võrra lühem, kuid selle erinevuse võis põhjustada viga sekveneerimisel.

4.2 AluYb8 insertiooni jaotuvus erinevates populatsioonides

Kuna indiviidide arv erinevates populatsioonides ei olnud sarnane ja mõne puhul liiga väike, moodustati alleelisageduste esitamiseks 22-st genotüpiseeritud valimist vastavalt populatsiooni geograafia ja ajaloolisele päritolule tinglikult seitse gruppi. Keskmised *Alu* insertiooniga alleelisagedused moodustatud gruppides on esitatud tabelis 6. Kõikide vaatluse all olnud populatsioonide alleelisagedused on toodud lisas 3.

Selgelt eristus teistest gruppidest Sahaara-alune Aafrika, kuhu kuuluvad populatsioonid, mis jäävad Sahaara kõrbest lõuna poole. Neis piirkondades jäi alleelisagedus populatsioonide kaupa vahemikku 2,1-7%, olles keskmiselt 4,8%. Euroopas jäi alleelisagedus vahemikku 13,4-16,1% ja Aasias 11,6-22%, olles keskmiselt vastavalt 14,8% ja 15,9%.

Põhja-Aafrika valimites kõikus alleelisagedus vahemikus 9,1-25%, kus suurima alleelisagedusega olid esindatud Lääne-Sahaara elanikud saharaavid. Kõrge oli varieeruvus ka Marokos, kus valimid olid kogutud viiest Maroko linnast. Suurt varieeruvust Marokos saab põhjendada kogutud valimite väiksusega. Alleelisagedused linnade kaupa jäid vahemikku 9,1-23,1%, kuid peale viie valimi ühendamist oli Maroko elanike alleelisagedus 15,5%.

Fisher'i Exact testiga uuriti alleelse jaotuvuse erinevust Euroopa, Aasia ja Sahaara-aluse Aafrika populatsioonidest moodustatud gruppide vahel. Statistiliselt olulised tulemused saadi, kui võrreldi omavahel Sahaara-alust rühma Euroopa ja Aasiaga (p-väärtused vastavalt 0,02 ja 0,05).

Kui võrrelda Sahaara-aluse Aafrika keskmist alleelisagedust 4,8% kõikide teiste uuritud populatsioonide keskmise alleelisagedusega 16,8% võib väita, et uuritud Sahaara kõrbest lõunasse jäävates populatsioonides on keskmine *Alu*-ga alleelisagedus 3,5 korda madalam kui keskmine alleelisagedus teistes uuritud populatsioonides (Fisher'i Exact testi p-väärtus 0,02).

Tabel 6. *AluYb8* insertiooniga alleelisagedused populatsioonigruppides.

Grupp	Valimi suurus	Alleelisagedus	Grupi koosseis
Ida-Euroopa	1523	15,9%	eestlased, tšehhid
Lääne-Euroopa	121	14,1%	CEPH, baskid, kataloonlased
Ida-Aasia	68	16,8%	hannid, korealased
Volga-Uural	94	17%	tatarlased, baškiirid
Mustlased	50	12%	Hispaania mustlased
Sahaara-alune Aafrika	141	4,8%	mandenkaalud, tansaanlased, gabonlased, pügmeed
Põhja-Aafrika	230	16,4%	viis valimit Marokost, saharaavid, alžeerlased, tuneeslased

4.3 *AluYb8* assotsiatsioonianalüüs vererõhu ja biokeemia markeritega ning juht-kontroll uuring

Vererõhu assotsiatsioonianalüüs viidi läbi 1140 Eesti indiviidiga, kes olid pikaajased hüpertensiivseid ravimeid mittetarbivad veredoonorid või hüpertoonikud, kellel oli mõõdetud vererõhu näidud enne ravi algust. Assotsiatsioonianalüüs viidi läbi uuritavate vererõhu näitude mediaanväärtustega, arvestades indiviidide sugu vanust ja kehamassi indeksit. Lineaarsel regressioonanalüüsil aditiivset geenidoosi mudelit kasutades ilmnis statistiliselt tähendusrikas seos Eesti populatsioonis *AluYb8* insertiooni ja süstoolse vererõhu ($p=0,039$) ning statistiliselt olulisele lähedane assotsiatsioon diastoolse vererõhu ($p=0,073$) vahel. Seost kinnitas ka läbiviidud LRT, kus p -väärtused olid süstoolse ja diastoolse vererõhu korral vastavalt 0,025 ja 0,043. Samade testidega naisi ja mehi eraldi uurides selgus, et seos *Alu* insertiooni ja vererõhu vahel ilmneb selgemini naistel. 750 naist eraldi testides saadi aditiivse testi p -väärtusteks süstoolse vererõhu korral 0,038 ja diastoolse korral 0,027 ning LRT kasutades vastavalt 0,012 ja 0,014. 390 meest eraldi analüüsides statistiliselt tähendusrikkaid p -väärtusi ei saadud. Läbiviidud analüüsides selgus ka regressiooni koefitsient, mis oli kõikides statistiliselt olulise p -väärtusega testides positiivne (tabel 7). Positiivne regressiooni koefitsient viitab vererõhu seisukohast *Alu*-ga alleeli võimalikule riskiefektile.

Tabel 7. Vererõhu assotsiatsiooniuuringus leitud p -väärtused ja statistiliselt olulise tulemusega testide regressiooni koefitsendid.

	n	SVR		DVR	
		aditiivne test	LRT	aditiivne test	LRT
Koos	1140	0,039 (1,79)	0,025 (2,33)	0,073	0,043 (1,21)
Mehed	390	0,66	0,6	0,89	0,8
naised	750	0,038 (2,22)	0,012 (3,31)	0,027 (1,47)	0,014 (1,77)

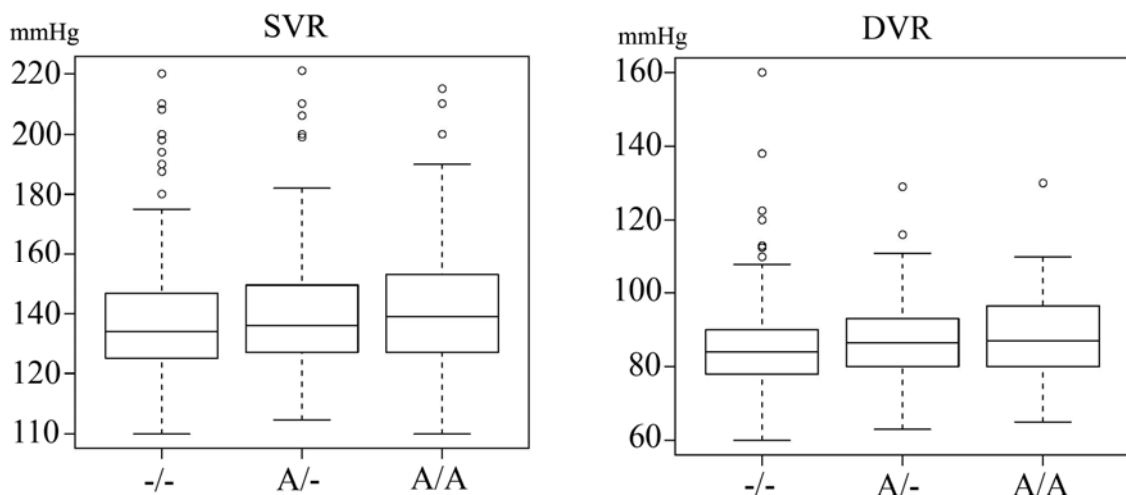
SVR – süstoolne vererõhk; DVR – diastoolne vererõhk; LRT – (*likelihood ratio test*); n – indiviidide arv; sulgudes on esitatud regressiooni koefitsent

Lisaks statistiliselt tähendusriikastele p-väärtustele olid märgatavad erinevused ka kolme erineva genotüübiga indiviidide vererõhkude mediaan- ja keskmistes väärtustes (tabel 8). Selgelt oli näha, et *Alu* insertiooni ühes alleelis kandvatel inimestel on nii süstoolse kui diastoolse vererõhu keskmine ja mediaanväärtused kõrgemad kui ilma *Alu*-ta grupil. *Alu* insertiooni suhtes homosügootsetel indiviididel olid vastavad väärtused veelgi kõrgemad. Eriti selgelt avaldus *Alu* insertiooni kandjastaatuse seos vererõhuga naistel. Kirjeldatud omaduste illustreerimiseks on joonisel 7 esitatud naiste süstoolse ja diastoolse vererõhu väärtuste karp-vurrud diagramm.

Tabel 8. Eestlaste süstoolse (SVR) ja diastoolse (DVR) vererõhu näitude keskmised ja mediaanväärtused erineva genotüübiga indiviididel.

	Koos		Naised		Mehed	
	n=(805; 303; 32)		n=(520; 207; 23)		n=(285; 96; 9)	
	SVR	DVR	SVR	DVR	SVR	DVR
-/- keskmine	139,4	86,2	137,3	85,2	143,2	88,1
-/- mediaan	137	85	134	84	141	87
A/- keskmine	141,3	87,3	139,8	87	144,7	88,1
A/- mediaan	138	86,5	136	86,5	141	87,5
A/A keskmine	145,5	89,2	146,9	88,9	141,9	89,9
A/A mediaan	143,3	87,8	139	87	145,5	90

-/- ilma *Alu*-ta homosügoot; A/- *Alu*-ga heterosügoot; A/A *Alu*-ga homosügoot; sulgudes on märgitud indiviidide arv genotüüpide kaupa (-/-; A/-; A/A)



Joonis 7. Joonisel on kujutatud Eesti naiste süstoolse (SVR) ja diastoolse (DVR) vererõhu (mmHg) erinevate genotüüpide karp-vurrud diagrammid. -/- ilma *Alu*-ta homosügoodid (n=520); A/- *Alu*-ga heterosügoodid (n=207); A/A *Alu*-ga homosügoodid (n=23).

Juht-kontroll uuringus osalesid 362 Eesti kontrolli (295 naist ja 67 meest) ja 414 patsienti (268 naist ja 146 meest). Viidi läbi logistiline regressioonanalüüs kasutades aditiivset geenidoosi mudelit, millega statistiliselt olulisi p-väärtusi ei saadud. Siiski oli tuvastatav trend, et patsientidel on *Alu*-ga alleelisagedus kõrgem kui kontrollidel. Selgemalt tuli see omadus esile jällegi naistel (tabel 9). Kõrgem alleelisagedus patsientidel on kooskõlas vererõhu assotsiatsioonianalüüsil saadud tulemustega, kus *Alu*-ga alleel omab vererõhu seisukohast riskiefekti.

Tabel 9. *Alu*-ga alleelisagedused Eesti patsientidel ja kontrollidel.

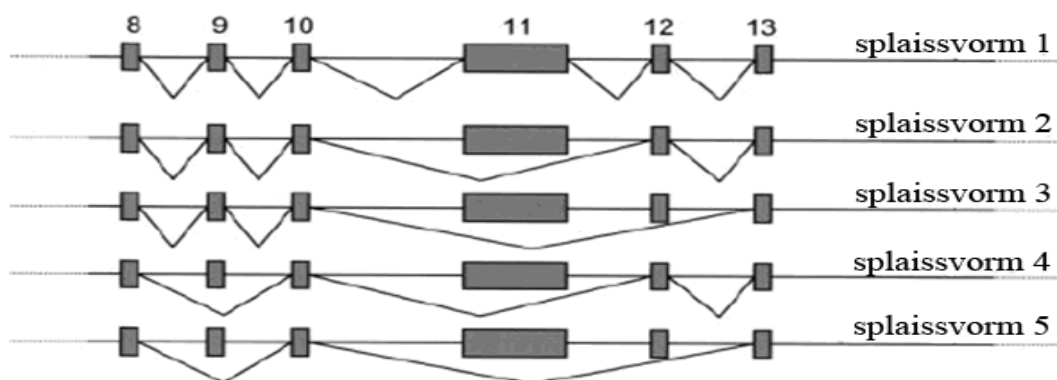
	patsiendid	kontrollid
koos	17,6%	15,2%
naised	18,8%	15,3%
mehed	15,4%	14,9%

GFR ja biokeemia väärtuste assotsiatsiooniuringus kasutati 653 TÜ Kliinikumi ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglaga koostöös kogutud indiviidide vereseerumi biomarkerite väärtusi. Analüüs teostati vere seerumist määratud üldkolesterooli, LDL, HDL, triglütseriidide, uurea, kusihappe, kreatiniini ja albumiini kontsentratsioonidega ning arvutatud GFR väärtusega. Läbiviidud LRT ja aditiivse testiga statistiliselt olulisi tulemusi ühegi parameetriga ei saadud.

4.4 *AluYb8* insertiooni mõju geeniekspressioonile

Lähtudes Delaloy jt., 2003 tööst (joonis 8) võis cDNA PCR reaktsioonil eksonist 8-13 oodata viie, eksonist 8-10 kahe ja eksonist 10-13 kolme produkti amplifitseerumist (tabel 10). Peale piirkonna 8-13 PCR reaktsioonide geelilekandmist võis tuvastada kolm produkti, millest kaks vastasid oodatud pikkustele (458 ja 542 bp) ning lisaks üks produkt (pikkus 600-700 bp vahel), mis Delaloy jt., 2003 järgi ei peaks selles piirkonnas esinema ja kuna seda ei olnud võimalik ka GeneScan analüüsil detekteerida jäigi selle produkti päritolu teadmatuks. Väga õrnalt oli näha ka kahte pikemat produkti. PCR-ga eksonist 8-10 amplifitseerusid mõlemad oodatud produktid (224 ja 308 bp) ning eksonist 10-13 amplifitseerusid kolmest oodatust produktist kaks (180 ja 458 bp) (joonis 9). Funktsionaalses uuringus kasutatud üheksal indiviidil olid olenemata genotüübist PCR geelipiltide mustrid sarnased.

Tuvastatud PCR produktidega viidi läbi GeneScan analüüs, millega oli võimalik välja selgitada vaatluse all olnud *WNKI* splaissvormide suhteline ekspressioonitase, mis arvutati kui GeneScan analüüsil saadud splaissvormide piigi pindala jagatis referentsgeenide *RPII* ja *GAPDH* piikide pindalaga.

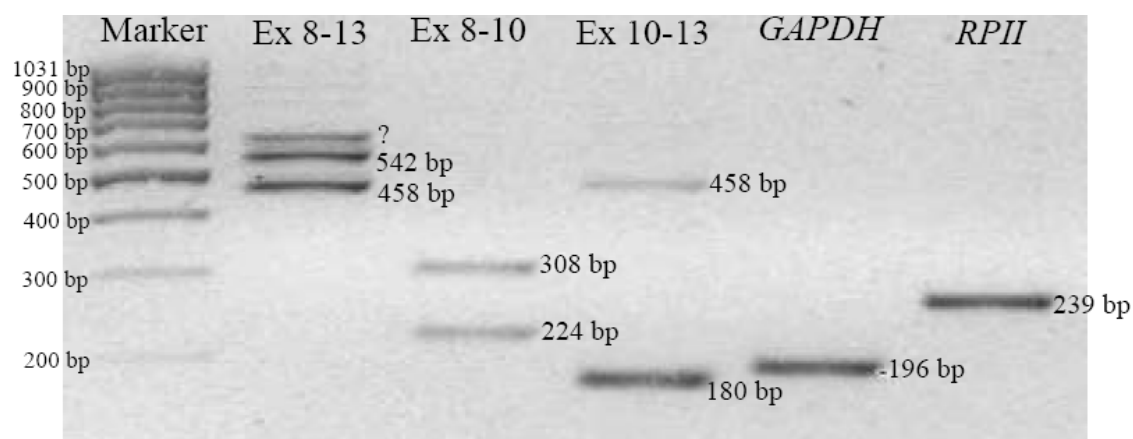


Joonis 8. *WNKI* alternatiivne splaissing Delaloy jt., 2003 järgi. Joonisel on kujutatud vormid 1-5, mis on tuvastatavad tänu eksonite 9, 11 ja 12 alternatiivsele splaissimisele. Nummerdatud hallid kastid tähistavad eksoneid, horisontaalsed jooned geeni genoomset lõiku ja murtud jooned splaissingu sündmusi.

Tabel 10. Oodatud PCR produktide pikkused ja nende tuvastamine antud töös.

	Produkti pikkus (bp)	PCR-il tuvastatud	¹ splaiissvormid
Ex 8-13			
kõik eksonid	1279	ei	1
-11	820	väga õrnalt	2
-11 ja -12	542	jah	3
-9 ja -11	736	väga õrnalt	4
-9, -11 ja -12	458	jah	5
Ex 8-10			
kõik eksonid	308	jah	1, 2 ja 3
-9	224	jah	4 ja 5
Ex 10-13			
kõik eksonid	917	ei	1
-11	458	jah	2 ja 4
-11 ja -12	180	jah	3 ja 5
GAPDH	196		
RPII	239		

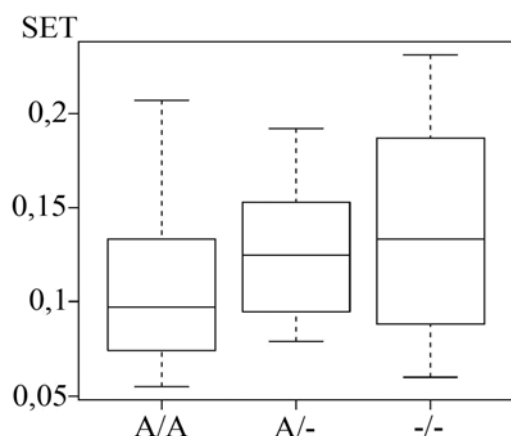
¹Delaloy jt., 2003 tuvastatud splaiissvormid (joonis 8), mis annavad käesolevas töös PCR-il vastava pikkusega produkte.



Joonis 9. Geelipilt *GAPDH* ja *RPII* ning tuvastatud *WNK1* PCR produktidega. Joonisel on välja toodud produktide pikkused. Küsimärgiga tähistatud produkti päritolu jäi selgusetuks. Marker: MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Fermentas).

Usaldusväärsete tulemuste saamiseks viidi ühe indiviidi RNA-ga läbi kaks cDNA sünteesi, mõlema cDNA sünteesi produktidega teostati kolm PCR amplifikatsiooni ja kõik PCR produktid kanti kahele geelile. Seega ühe indiviidi ühe splaissvormi kohta saadi kaksteist andmepunkti. Täpsemal analüüsil kasutati vaid teisest cDNA sünteesist lähtuvaid andmeid, sest need olid ühtlasemad ja seega usaldusväärsemad. Kuna *GAPDH*-i GeneScan analüüsi tulemused olid väga ebastabiilsed kasutati suhtelise ekspresioonitaseme arvutamisel referentsgeeninina vaid *RPII*-te.

Erinevate *WNK1* vormide suhtelised ekspresioonitasemed olid sama genotüübiga indiviidide vahel väga varieeruvad ning erinevust splaissvormide ekspresioonis genotüüpide vahel ei tuvastatud. Arvestades konkreetse *AluYb8* asukohta *WNK1* geenis, võis eeldada, et kui *Alu* insertioon mõjutab alternatiivsete vormide ekspresioonitasemeid, on see seotud eksoneid 11 ja 12 sisaldavate vormide tasemete muutmisega. Olulist erinevust nende vormide vahel ei esinenud, kuid visuaalselt oli karp-vurrud diagrammilt (joonis 10) tuvastatav trend, et *Alu* insertiooniga homosügootidel on 12. eksonit sisaldava transkripti ekspresioonitase madalam.



Joonis 10. 12. eksonit sisaldava *WNK1* splaissvormi suhtelist ekspresioonitaset kujutav karp-vurrud diagramm. SET – suhteline ekspresioonitase; -/- ilma *Alu*-ta homosügootid; A/- *Alu*-ga heterosügootid; A/A *Alu*-ga homosügootid.

Kuigi funktsionaalse uuringuga ei tuvastatud *WNK1* erinevate splaissvormide ekspresioonitaseme seost geeni 10. intronis paikneva *AluYb8* insertiooniga, võib uuringu tulemuste põhjal teha järeldusi erinevate vormide ekspressiooni kohta leukotsüütides. Ekson 9 oli esindatud pooltes transkriptides. Peamisel splaissvormil, mis leukotsüütides ekspresseerub on eemaldatud eksonid 11 ja 12 ning transkript, mis sisaldab 12. eksonit ekspresseerub vähesel määral. Saadud tulemused on kooskõlas Delaloy jt., 2003 tööga, kus uuriti *WNK1* splaissvormide ekspressiooni neeru-, südame- ja lihaskoes. Nende andmete põhjal võib järeldada, et leukotsüütides esinevad peamiselt splaissvormid 3 ja 5 (joonis 8).

5. ARUTELU

5.1 *Alu* elemendid ja polümorfseid *Alu-d* populatsioonigeneetikas

Mobiilsed DNA elemendid moodustavad inimese genoomist üle 45%. Suurimaks selliste elementide rühmaks on *Alu* kordused, mille arv ulatub 1,1 miljoni koopiani. *Alu* elemendid on umbes 300 aluspaari pikad ning asetsevad tihti intronites, geenide 3' mitte-transleeritud alades ja geenidevahelistes piirkondades (Batzer ja Deininger, 2002).

Alu-d on grupeeritud kolme suurde (J, S ja Y) perekonda, mis on omakorda jaotatud väiksemateks alamperekondadeks. Käesolevas uuringus *WNKI* geeni intronis paiknev polümorfne *AluYb8* on inimese genoomis esindatud umbes 2200 koopiaga, samas kui šimpansi genoomist on leitud vaid üheksa *AluYb8* koopiat. Sellisele plahvatuslikule *AluYb8* ekspansioonile inimese liinis arvatakse olevat olnud tugev mõju inimese genoomi ülesehitusele ja kromosoomide arhitektuurile, muutes meie geeniekspressiooni ja kromosoomide liikumist rakkude jagunemisel (Gibbons jt., 2004).

Enamik *Alu* kordusi (J ja S perekonna liikmed) on duplitseerunud primaatide varajase evolutsiooni käigus 40 miljonit aastat tagasi, kuid peaaegu kõik hiljem inserteerunud *Alu-d* kuuluvad nooremasse Y perekonda. Mõned Y perekonna liikmed (Y, Yc1, Yc2, Ya5, Ya5a2, Ya8, Yb8 ja Yb9) on sisenenud inimese genoomi nii hiljuti ning jätkavad duplitseerumist tänaseni, et on olenevalt olemasolust või puudumisest polümorfseid (Batzer ja Deininger, 2002). Polümorfsetel *Alu* elementidel on olulised eelised fülogeneetilistes ja populatsioonigeneetilistes uurimustes võrreldes SNP-de mikrosatelliitide ja RFLP-dega (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Nimelt on *Alu* insertioon genoomi konkreetsele positsioonile reeglina ühekordne sündmus, ning väga harva toimub juba inserteerunud järjestuse eemaldamine samast positsioonist, mis tähendab, et sama polümorfset *Alu* omavad inimesed on pärinud selle ühiselt eellaselt. Samuti on polümorfsete *Alu*-de korral üheselt määratletav eellasseisund, milleks on *Alu* puudumine konkreetsest positsioonist (Xing jt., 2007).

Käesolevas töös kirjeldatud polümorfse *AluYb8* elemendi madalam alleelisagedus Sahaara-aluses Aafrikas on kooskõlas Watkins'i jt., 2003 ja Xing'i jt., 2007 uuringutega, kes võrdlesid polümorfsete *Alu*-de jaotuvust Euroopas, Aasias ja Aafrikas ning leidsid samuti, et *Alu* alleelisagedused on madalaimad aafriklastel (lisa 4). *WNKI* 10. intronis paikneva *Alu* korduse suurem sagedus mitte Sahaara-alustes populatsioonides on tõenäoliselt põhjustatud tänu geenitriivile, mis tähendab, et konkreetne *Alu* insertioon oli esindatud väikeses inimrühmas, mis Aafrikast välja rändas ja *Alu* ekspandeerus edaspidi läbi juhuselise. Samuti on võimalik, et *Alu* insertioon on väljaspool Sahaara-alust sagedasem, kuna selle olemasolu andis kandjale väljaspool Aafrikat kohastumusliku eelise.

5.2 Alu insertiooni mõju genoomi funktsioonile ja seos komplekshaigustega

Alu elemendi inserteerumine genoomi on tavaliselt negatiivse efektiga põhjustades geneetilist ebastabiilsust ja geneetilisi haigusi mitmel moel. Sisenedes geeni promootorpiirkonda võib *Alu* mõjutada transkriptsiooni, muutes promootori metülatsioonitaset või takistades transkriptsioonifaktorite seondumist. *Alu* sisenemisel kodeerivasse alasse saab suure tõenäosusega kahjustatud avatud lugemisraam või korrektne splaissingu toimumine. Samuti võivad *Alu*-d mõjutada genoomi läbi nendevahelise ebavõrdse homoloogilise rekombinatsiooni toimumise (Batzer ja Deininger, 2002).

Callinan ja Batzer, 2006 järgi on teada 25 haigust, mis on põhjustatud hiljuti genoomi integreerunud *Alu*-de poolt. Kahekümne viiest haigusega seotud *Alu*-dest paigutuvad 14 eksonitesse ja 11 intronitesse. Nende 11 juhtumi puhul intronisse paigutuv *Alu* viib kas osalise introni kaasamise kypse mRNA koosseisu läbi protsessi, mida nimetatakse *Alu* eksoniseerumiseks või põhjustab *Alu* insertioon splaissingu käigus eksonite vahelejäämist. Leitud on, et polümorfse *AluYb9* insertioon verehüübefaktorit VII kodeeriva geeni introonsesse alasse viib geeniekspressiooni tugevale muutusele ja põhjustab hemofiilia A vormi (Ganguly jt., 2003). Teada on ka umbes 74 *Alu-Alu* vahelist rekombinatsiooni juhtu (Callinan ja Batzer, 2006), mida on

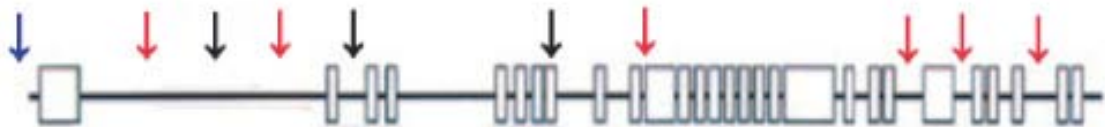
seostatud erinevate vähkkasvajatega, hüperkolesteroleemiaga, α -talasseemiaga, diabeediga ja paljude teiste haigustega (Deininger ja Batzer, 1999).

Antud magistritöös tuvastatud *WNK1* geeni 10. intronisse paigutuva polümorfse *AluYb8* insertiooni seost vererõhuga võib pidada uueks näiteks *Alu* järjestuse assotsiatsioonist komplekshaigustega. Tuntuimaks näiteks, kus *Alu* elemendi insertioon intronisse võib mõjutada geeni funktsiooni on *ACE* (*DCPI*) geen. *ACE* kodeerib angiotensiini konverteerivat ensüümi, mille ülesandeks on vere elektrolüütide tasakaalu ja vererõhu kontroll. Nimetatud geeni kuueteistkümnendas intronis on kirjeldatud polümorfset 287 aluspaari pikkust *Alu* elementi, mida on paljudes töödes seostatud vererõhu ja kardiovaskulaarhaigustega (Schunkert, 1997). *Alu* insertioon *ACE* geeni 16. intronis põhjustab selle kandjatel madalamat *ACE* taset vere seerumis. Hui jt., 2006 on näidanud assotsiatsiooni *MICB* geeni esimesse intronisse paigutuva polümorfse *Alu* ja astma vahel.

5.3 WNK1 variantide assotsiatsioon vererõhu taseme ja essentsiaalse hüpertensiooniga

Assotsiatsiooniuringuid *WNK1* polümorfismide ja vererõhu väärtuste või hüpertensiooni vahel on avaldatud neli (tutvustatud kirjanduse ülevaates). Tobin jt., 2005 tööga saabus läbimurre *WNK1* assotsiatsiooniuringutesse. See oli esimene uurimus, kus näidati, et üldlevinud *WNK1* variandid on seotud vererõhuga, andes põhjust sellesuunalisi uuringuid jätkata (Zhang ja Staessen, 2005). Avaldatud töödes on assotsiatsioon vererõhu või hüpertensiooni ravimi tiasiiddiureetikumi mõjuga tuvastatud kümnel üksikul polümorfismil (joonis 11). Lisaks on Tobin jt., 2005 ja Newhouse jt., 2005 näitanud seost SNP-dest moodustatud haplotüüpide ja vererõhu vahel.

Üks Tobin'i jt., 2005 töös vaatluse all olnud polümorfismidest (rs880054), millega saadi statistiliselt oluline tulemus paigutus geeni 10. intronisse, mis viitab konkreetse introni olulisusele geeni funktsionaalsuse seisukohast. 10. intronisse võivad olla paigutunud olulised järjestused, mis reguleerivad geeni 11. ja 12. eksoni splaissimist, sest just neid koos üheksanda eksoniga Delaloy jt., 2003 järgi *WNKI* geenis splaissitakse.



Joonis 11. SNP-de asukohad *WNKI* geenis, millega on saadud statistiliselt olulised tulemused hüpertensiooni assotsiatsiooniuringutes. Punased nooled viitavad Tobin'i jt., 2005 töö tulemustele, sinine nool Newhouse jt., 2005 ja mustad nooled Turner jt., töö tulemustele.

5.4 Alternatiivse splaissingu roll geeniekspressioonis

Hiljutised kogu genoomi peal läbiviidud alternatiivse splaissingu analüüsid on viidanud, et 40-60% inimese geenidest esineb alternatiivseid vorme. See tähendab, et alternatiivne splaissing on inimese genoomi funktsionaalse keerukuse loomise seisukohast üks peamistest mehhanismidest (Modrek ja Lee, 2002).

Alternatiivse splaissingu regulatsioonis osalevad paljud eksonitesse ja intronitesse paigutuvad järjestused, mis on seotud protsessi korrektse toimumisega. Splaissingu reaktsioone viib läbi splaisosoomi kompleks, seondudes intronites ja eksonites asetsevate regulatiivsete järjestustega (Black, 2003). Hiljutised uuringud on kinnitanud ka alternatiivse splaissingu raku- ja koespetsiifilisust (Blencowe, 2006).

Ligi 300 bp pikkuse *AluYb8* insertioon *WNKI* geeni suhteliselt lühikesse (1211 bp) 10. intronisse võib muuta splaissinguks vajalike järjestuste paiknemist intronis ja mõjutada seeläbi splaisosoomi seondumist või selle tööd. Sellised häired alternatiivse splaissingu toimumises viiksid suure tõenäosusega geeni alternatiivsete vormide

ekspressioonitaseme muutuseni. Kuigi käesolevas magistritöös ei näidatud olulist erinevust geeni alternatiivsete vormide ekspressioonitasemes leukotsüütides, on siiski võimalik, et *AluYb8 WNK1* geeni 10. intronis omab funktsionaalset efekti mõnes muus koes, kuna *WNK1* geeni ekspressiooni- ja funktsioonispekter on lai. Vererõhu seisukohast võiks uuritud *Alu* olulist rolli mängida neerus.

Käesolevas töös kasutatud GeneScan meetodi tundlikkus jäi tõenäoliselt liiga madalaks, et tuvastada võimalikke erinevusi alternatiivsete vormide ekspressioonitasemetes. Analüüsi tulemus sõltus paljudest eelnevatest etappidest nagu RNA eraldamisest, cDNA sünteesist, PCR-ist ning produktide kokkusegamise ja geelilekandmise täpsusest. Meetod võiks olla sobilik rohkem selliste analüüside läbiviimiseks, kus geeniekspressiooni erinevused on suured. See vähendaks eelnevate etappide ebatäpsuste tõttu tingitud võimalike tulemuste kadumise tõenäosust.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates tutvustati hüpertensiooni olemust ja klassifikatsiooni, loetleti siiani tuvastatud hüpertensiooni monogeensed vormid ja kirjeldati hüpertensiooni kui komplekshaigust. Samuti anti lühiülevaade meetoditest haiguse kandidaatgeenide tuvastamiseks. Lähemalt tutvustati hüpertensiooni kandidaatgeeni *WNKI*, kirjeldati geeni tähtsamaid funktsioone ja toodi välja uurimused *WNKI* geenivariantide seoste kohta hüpertensiooniga.

Töö praktilise osa eesmärgiks oli välja selgitada *WNKI* 10. intronis paikneva uue polümorfse *AluYb8* seos vererõhuga ja võimalik mõju geeni alternatiivsete vormide ekspressioonile. Lisaks selgitati välja *Alu* sagedus erinevates Euroopa, Aasia ja Aafrika populatsioonides ning uuriti *Alu* järjestust sisaldava genoomse piirkonna konserveeritust inimese ja šimpansi vahel.

Töö tulemusena näidati, et *WNKI* 10. intron ja sellega piirnevad eksonid on inimese ja šimpansi vahel kõrgelt konserveerunud. Samuti selgus *AluYb8* 3,5 korda madalam alleelisagedus populatsioonides, mis jäävad Sahaara kõrbest lõuna poole võrreldes ülejäänud vaatluse all olnud populatsioonidega. Assotsiatsiooniuringute tulemusena tuvastati, et Eesti naistel on *Alu* insertioon *WNKI* 10. intronis seotud nii diastoolse kui süstoolse vererõhuga. Kuigi juht-kontroll uuringus statistiliselt olulisi tulemusi ei saadud, oli hüpertensiooni naispatsientidel tuvastatav kõrgem *Alu*-ga alleelisagedus võrreldes tervete kontrollidega.

New polymorphic *AluYb8* in hypertension candidate gene *WNK1*: distribution and impact on gene function

Margus Putku

SUMMARY

Essential hypertension with its concurrent risk to other cardiovascular diseases affects approximately 25% of population in industrialized societies. Determining the genetic component of the disease is crucial for better understanding of the molecular basis of the phenotype and for developing more effective treatment of the disease.

This work is part of a bigger project to investigate the genetic background of hypertension. The study is focused on a new polymorphic *AluYb8* element located in intron 10 in hypertension candidate gene *WNK1* [*With No K (lysine)*]. *WNK1* plays an important role in salt homeostasis through different mechanisms and thereby has functional importance in blood pressure regulation.

My study showed that intron 10 in *WNK1* with its flanking exons is highly conserved between human and chimpanzee. *AluYb8* in *WNK1* gene intron 10 is probably human specific because it is absent in the genome of orangutan, gorilla and 11 chimpanzees. *Alu* distribution studies using samples from 22 population from Europe, Asia and Africa showed 3,5 times lower average allele frequency in Sub-Saharan populations than average allele frequency in other studied populations. Association between *Alu* and blood pressure was studied using 1140 estonian individuals, whose blood pressure values were repeatedly measured under no treatment of any antihypertensive drugs. Statistically significant association was found with both systolic and diastolic blood pressure (p-values respectively 0,039 and 0,043). Case-control study was performed using 362 controls and 414 patients but statistically nonsignificant results were observed in spite of slightly different allele frequencies in patients and controls, especially among women (18,3% and 15,8% respectively). Functional studies were also performed, but no variability in expression levels of alternative forms of *WNK1* gene forms was detected.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat Maris Laant, kes on suunanud mind avastama põnevat teadusmaailma. Tema ettepanekud ja soovitused on olnud väga olulised käesoleva töö valmimisel. Lisaks soovin tänada kõiki oma laborikaaslasi, kes on olnud abiks nii teoreetiliste kui praktiliste probleemide ja küsimuste lahendamisel. Eriline tänu ka minu sõpradele ja lähedastele, kes on mulle toeks olnud.

KASUTATUD KIRJANDUS

- The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. (2004).
- Agarwal, A., Williams, G. H., Fisher, N. D. (2005). Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol Metab* 16(3), 127-33.
- Batzer, M. A., Deininger, P. L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 3(5), 370-9.
- Binder, A. (2006). Identification of genes for a complex trait: examples from hypertension. *Curr Pharm Biotechnol* 7(1), 1-13.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72(291-336).
- Blencowe, B. J. (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126(1), 37-47.
- Callinan, P. A., Batzer, M. A. (2006). Retrotransposable Elements and Human Disease. *Genome and Disease* 1(104-115).
- Cardon, L. R., Bell, J. I. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2(2), 91-9.
- Caulfield, M., Munroe, P., Pembroke, J., Samani, N., Dominiczak, A., Brown, M., Benjamin, N., Webster, J., Ratcliffe, P., O'Shea, S., Papp, J., Taylor, E., Dobson, R., Knight, J., Newhouse, S., Hooper, J., Lee, W., Brain, N., Clayton, D., Lathrop, G. M., Farrall, M., Connell, J. (2003). Genome-wide mapping of human loci for essential hypertension. *Lancet* 361(9375), 2118-23.
- Cui, J., Melista, E., Chazaro, I., Zhang, Y., Zhou, X., Manolis, A. J., Baldwin, C. T., Destefano, A. L., Gavras, H. (2005). Sequence variation of bradykinin receptors B1 and B2 and association with hypertension. *J Hypertens* 23(1), 55-62.
- Deininger, P. L., Batzer, M. A. (1999). Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 67(3), 183-93.

- Delaloy, C., Lu, J., Houot, A. M., Disse-Nicodeme, S., Gasc, J. M., Corvol, P., Jeunemaitre, X. (2003). Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *Mol Cell Biol* 23(24), 9208-21.
- Faure, S., Delaloy, C., Leprivey, V., Hadchouel, J., Warnock, D. G., Jeunemaitre, X., Achard, J. M. (2003). WNK kinases, distal tubular ion handling and hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 18(12), 2463-7.
- Gamba, G. (2005). Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(2), F245-52.
- Ganguly, A., Dunbar, T., Chen, P., Godmilow, L., Ganguly, T. (2003). Exon skipping caused by an intronic insertion of a young Alu Yb9 element leads to severe hemophilia A. *Hum Genet* 113(4), 348-52.
- Garcia, E. A., Newhouse, S., Caulfield, M. J., Munroe, P. B. (2003). Genes and hypertension. *Curr Pharm Des* 9(21), 1679-89.
- Geller, D. S., Farhi, A., Pinkerton, N., Fradley, M., Moritz, M., Spitzer, A., Meinke, G., Tsai, F. T., Sigler, P. B., Lifton, R. P. (2000). Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289(5476), 119-23.
- Gibbons, R., Dugaiczuk, L. J., Girke, T., Duistermars, B., Zielinski, R., Dugaiczuk, A. (2004). Distinguishing humans from great apes with AluYb8 repeats. *J Mol Biol* 339(4), 721-9.
- Gong, M., Hubner, N. (2006). Molecular genetics of human hypertension. *Clin Sci (Lond)* 110(3), 315-26.
- Graudal, N. A., Galloe, A. M., Garred, P. (1998). Effects of sodium restriction on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride: a meta-analysis. *Jama* 279(17), 1383-91.
- He, G., Wang, H. R., Huang, S. K., Huang, C. L. (2007). Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. *J Clin Invest* 117(4), 1078-87.

- Holden, S., Cox, J., Raymond, F. L. (2004). Cloning, genomic organization, alternative splicing and expression analysis of the human gene WNK3 (PRKWNK3). *Gene* 335(109-19).
- Hui, J., Palmer, L. J., James, A. L., Musk, A. W., Beilby, J. P. (2006). AluYMICB dimorphism within the class I region of the major histocompatibility complex is associated with asthma and airflow obstruction in the Busselton population. *Clin Exp Allergy* 36(6), 728-34.
- Hurley, D. M., Accili, D., Stratakis, C. A., Karl, M., Vamvakopoulos, N., Rorer, E., Constantine, K., Taylor, S. I., Chrousos, G. P. (1991). Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 87(2), 680-6.
- Kahle, K. T., Wilson, F. H., Lalioti, M., Toka, H., Qin, H., Lifton, R. P. (2004). WNK kinases: molecular regulators of integrated epithelial ion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13(5), 557-62.
- Kokubo, Y., Kamide, K., Inamoto, N., Tanaka, C., Banno, M., Takiuchi, S., Kawano, Y., Tomoike, H., Miyata, T. (2004). Identification of 108 SNPs in TSC, WNK1, and WNK4 and their association with hypertension in a Japanese general population. *J Hum Genet* 49(9), 507-15.
- Kristjansson, K., Manolescu, A., Kristinsson, A., Hardarson, T., Knudsen, H., Ingason, S., Thorleifsson, G., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K. (2002). Linkage of essential hypertension to chromosome 18q. *Hypertension* 39(6), 1044-9.
- Lafferty, A. R., Torpy, D. J., Stowasser, M., Taymans, S. E., Lin, J. P., Huggard, P., Gordon, R. D., Stratakis, C. A. (2000). A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). *J Med Genet* 37(11), 831-5.
- Lee, B. H., Min, X., Heise, C. J., Xu, B. E., Chen, S., Shu, H., Luby-Phelps, K., Goldsmith, E. J., Cobb, M. H. (2004). WNK1 phosphorylates synaptotagmin 2 and modulates its membrane binding. *Mol Cell* 15(5), 741-51.

- Lenertz, L. Y., Lee, B. H., Min, X., Xu, B. E., Wedin, K., Earnest, S., Goldsmith, E. J., Cobb, M. H. (2005). Properties of WNK1 and implications for other family members. *J Biol Chem* 280(29), 26653-8.
- Levey, A. S., Bosch, J. P., Lewis, J. B., Greene, T., Rogers, N., Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130(6), 461-70.
- Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., Rich, G. M., Cook, S., Ulick, S., Lalouel, J. M. (1992). A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355(6357), 262-5.
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G., Geller, D. S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104(4), 545-56.
- Mein, C. A., Caulfield, M. J., Dobson, R. J., Munroe, P. B. (2004). Genetics of essential hypertension. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1(R169-75).
- Miller-Lindholm, A. K., LaBenz, C. J., Ramey, J., Bedows, E., Ruddon, R. W. (1997). Human chorionic gonadotropin-beta gene expression in first trimester placenta. *Endocrinology* 138(12), 5459-65.
- Modrek, B., Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30(1), 13-9.
- Naray-Fejes-Toth, A., Snyder, P. M., Fejes-Toth, G. (2004). The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(50), 17434-9.
- Newhouse, S. J., Wallace, C., Dobson, R., Mein, C., Pembroke, J., Farrall, M., Clayton, D., Brown, M., Samani, N., Dominiczak, A., Connell, J. M., Webster, J., Lathrop, G. M., Caulfield, M., Munroe, P. B. (2005). Haplotypes of the WNK1 gene associate with blood pressure variation in a severely hypertensive population from the British Genetics of Hypertension study. *Hum Mol Genet* 14(13), 1805-14.

- Ohta, A., Yang, S. S., Rai, T., Chiga, M., Sasaki, S., Uchida, S. (2006). Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun* 349(2), 804-8.
- Province, M. A., Kardia, S. L., Ranade, K., Rao, D. C., Thiel, B. A., Cooper, R. S., Risch, N., Turner, S. T., Cox, D. R., Hunt, S. C., Weder, A. B., Boerwinkle, E. (2003). A meta-analysis of genome-wide linkage scans for hypertension: the National Heart, Lung and Blood Institute Family Blood Pressure Program. *Am J Hypertens* 16(2), 144-7.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81(3), 559-75.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313(4), 856-62.
- Rainen, L., Oelmueller, U., Jurgensen, S., Wyrich, R., Ballas, C., Schram, J., Herdman, C., Bankaitis-Davis, D., Nicholls, N., Trollinger, D., Tryon, V. (2002). Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem* 48(11), 1883-90.
- Rapp, J. P. (2000). Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol Rev* 80(1), 135-72.
- Richardson, C., Rafiqi, F. H., Karlsson, H. K., Moleleki, N., Vandewalle, A., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Alessi, D. R. (2008). Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1. *J Cell Sci* 121(Pt 5), 675-84.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132(365-86).
- Schunkert, H. (1997). Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J Mol Med* 75(11-12), 867-75.

- Schuster, H., Wienker, T. E., Bähring, S., Bilginturan, N., Toka, H. R., Neitzel, H., Jeschke, E., Toka, O., Gilbert, D., Lowe, A., Ott, J., Haller, H., Luft, F. C. (1996). Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat Genet* 13(1), 98-100.
- Shimkets, R. A., Warnock, D. G., Bositis, C. M., Nelson-Williams, C., Hansson, J. H., Schambelan, M., Gill, J. R., Jr., Ulick, S., Milora, R. V., Findling, J. W., et al. (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79(3), 407-14.
- Staessen, J., Fagard, R., Lijnen, P., Amery, A. (1989). Body weight, sodium intake and blood pressure. *J Hypertens Suppl* 7(1), S19-23.
- Staessen, J. A., Wang, J., Bianchi, G., Birkenhager, W. H. (2003). Essential hypertension. *Lancet* 361(9369), 1629-41.
- Subramanya, A. R., Yang, C. L., Zhu, X., Ellison, D. H. (2006). Dominant-negative regulation of WNK1 by its kidney-specific kinase-defective isoform. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(3), F619-24.
- Sun, X., Gao, L., Yu, R. K., Zeng, G. (2006). Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration. *J Neurochem* 99(4), 1114-21.
- Zagorska, A., Pozo-Guisado, E., Boudeau, J., Vitari, A. C., Rafiqi, F. H., Thastrup, J., Deak, M., Campbell, D. G., Morrice, N. A., Prescott, A. R., Alessi, D. R. (2007). Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *J Cell Biol* 176(1), 89-100.
- Zambrowicz, B. P., Abuin, A., Ramirez-Solis, R., Richter, L. J., Piggott, J., BeltrandelRio, H., Buxton, E. C., Edwards, J., Finch, R. A., Friddle, C. J., Gupta, A., Hansen, G., Hu, Y., Huang, W., Jaing, C., Key, B. W., Jr., Kipp, P., Kohlhauff, B., Ma, Z. Q., Markesich, D., Payne, R., Potter, D. G., Qian, N., Shaw, J., Schrick, J., Shi, Z. Z., Sparks, M. J., Van Sligtenhorst, I., Vogel, P., Walke, W., Xu, N., Zhu, Q., Person, C., Sands, A. T. (2003). Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24), 14109-14.

- Zhang, H., Staessen, J. A. (2005). Association of blood pressure with genetic variation in WNK kinases in a white European population. *Circulation* 112(22), 3371-2.
- Zhou, X. F., Cui, J., DeStefano, A. L., Chazaro, I., Farrer, L. A., Manolis, A. J., Gavras, H., Baldwin, C. T. (2005). Polymorphisms in the promoter region of catalase gene and essential hypertension. *Dis Markers* 21(1), 3-7.
- Tobin, M. D., Raleigh, S. M., Newhouse, S., Braund, P., Bodycote, C., Ogleby, J., Cross, D., Gracey, J., Hayes, S., Smith, T., Ridge, C., Caulfield, M., Sheehan, N. A., Munroe, P. B., Burton, P. R., Samani, N. J. (2005). Association of WNK1 gene polymorphisms and haplotypes with ambulatory blood pressure in the general population. *Circulation* 112(22), 3423-9.
- Turner, S. T., Schwartz, G. L., Chapman, A. B., Boerwinkle, E. (2005). WNK1 kinase polymorphism and blood pressure response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 46(4), 758-65.
- Wade, J. B., Fang, L., Liu, J., Li, D., Yang, C. L., Subramanya, A. R., Maouyo, D., Mason, A., Ellison, D. H., Welling, P. A. (2006). WNK1 kinase isoform switch regulates renal potassium excretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22), 8558-63.
- Watkins, W. S., Rogers, A. R., Ostler, C. T., Wooding, S., Bamshad, M. J., Brassington, A. M., Carroll, M. L., Nguyen, S. V., Walker, J. A., Prasad, B. V., Reddy, P. G., Das, P. K., Batzer, M. A., Jorde, L. B. (2003). Genetic variation among world populations: inferences from 100 Alu insertion polymorphisms. *Genome Res* 13(7), 1607-18.
- Vehaskari, V. M. (2007). Heritable forms of hypertension. *Pediatr Nephrol*
- Verissimo, F., Jordan, P. (2001). WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20(39), 5562-9.
- Wilson, F. H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K. A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D. V., Lipkin, G. W., Achard, J. M., Feely, M. P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R. J., Mayan, H., Simon, D. B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X., Lifton, R. P. (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293(5532), 1107-12.

- Wilson, R. C., Krozowski, Z. S., Li, K., Obeyesekere, V. R., Razzaghy-Azar, M., Harbison, M. D., Wei, J. Q., Shackleton, C. H., Funder, J. W., New, M. I. (1995). A mutation in the HSD11B2 gene in a family with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab* 80(7), 2263-6.
- Vitari, A. C., Deak, M., Morrice, N. A., Alessi, D. R. (2005). The WNK1 and WNK4 protein kinases that are mutated in Gordon's hypertension syndrome phosphorylate and activate SPAK and OSR1 protein kinases. *Biochem J* 391(Pt 1), 17-24.
- Xing, J., Witherspoon, D. J., Ray, D. A., Batzer, M. A., Jorde, L. B. (2007). Mobile DNA elements in primate and human evolution. *Am J Phys Anthropol Suppl* 45(2-19).
- Xu, B., English, J. M., Wilsbacher, J. L., Stippec, S., Goldsmith, E. J., Cobb, M. H. (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem* 275(22), 16795-801.
- Xu, B. E., Stippec, S., Chu, P. Y., Lazrak, A., Li, X. J., Lee, B. H., English, J. M., Ortega, B., Huang, C. L., Cobb, M. H. (2005). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(29), 10315-20.
- Xu, Q., Modrek, B., Lee, C. (2002). Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Res* 30(17), 3754-66.
- Yang, C. L., Angell, J., Mitchell, R., Ellison, D. H. (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* 111(7), 1039-45.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.ensembl.org/>

<http://frodo.wi.mit.edu/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>

<http://www.langsrud.com/fisher.htm>

<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>

<http://www.r-project.org/>

<http://bioinfo.ebc.ee/mprimer3/>

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerite järjestused.

Praimeri nimetus	Järjestus 5'-3'
A. Praimerid Alu insertiooni tuvastamiseks	
Intr10_F ¹	GGGTAACCAACCCTTGAAGTAGG
Intr10_R	GGGTA CTCTCAAGTGATTAGGAGGA
B. Praimerid sekveneeritava ala amplifitseerimiseks	
WNK1_Seq1_F ¹	TGGGGTGAGGGAGATAATTGGGTG
WNK1_Seq_R	ACTCTGTGGTGCCCTCTTTTGCT
Sekveneerimispraimerid	
WNK1_Seq3_F	TCAGGTAGTGGAGAGGGATGATTG
WNK1_Seq4_F	ACCCCTTGTCTATGGAAGGGTCC
WNK1_Seq5_F	CCTTCCAGTGGGAGAGCCGC
WNK1_Alu_F	CGGCCTCCCAAAGTGCTGGG
C. Funktsionaalses uuringus kasutatud praimerid	
Ex 7_8 F	FAM -TTATCTGATGGGACGGTTGA
Ex 10 F	FAM -TGCACAGCCAGTGAGTCAGCC
Ex 10 R	TGGCTCTGCAGGAGCAACCT
Ex 13_14 R	GCAACATCTGAATGTGCACTG
GAPDH F	CCATGGAGAAGGCTGGGG
GAPDH R	HEX -CCAAGTTGTCATGGATGACC
RPII F	CTTCACGGTGCTGGGCATT
RPII R	TET -GTGCGGCTGCTTCCATAA

¹Neid primereid kasutati ka sekveneerimisel.

Lisa 2. *WNK1* ekson 10-11 joendus. *Alu/Alu* – *Alu* insertiooniga homosügoot; *Wt* – ilm *Alu*-ta homosügoot. Rohelisega on tähistatud eksonite 10 ja 11 järjestused. *Wt* järjestuse 1181. positsioonis on sinisega märgitud SNP rs880054 asukoht. Punane ala joendusel viitab *AluYb8* järjestusele.

```

Alu/Alu CAGCAGGGAATACAGCAGACAGCCCTCCTCAACAGACAGTGCAGTATTCACCTTTCACAG 60
Wt      CAGCAGGGAATACAGCAGACAGCCCTCCTCAACAGACAGTGCAGTATTCACCTTTCACAG 60
Simpans CAGCAGGGAATACAGCAGACAGCCCTCCTCAACAGACAGTGCAGTATTCACCTTTCACAG 60
*****

Alu/Alu ACATCAACCTCCAGTGAGGCCACTACTGCACAGCCAGTGAGTCAACCTCAAGCTCCACAA 120
Wt      ACATCAACCTCCAGTGAGGCCACTACTGCACAGCCAGTGAGTCAACCTCAAGCTCCACAA 120
Simpans ACATCAACCTCCAGTGAGGCCACTACTGCACAGCCAGTGAGTCAACCTCAAGCTCCACAA 120
*****

Alu/Alu GTCTTGCCCTCAAGTATCAGCTGGAAAACAGGTAAACTTTTTTTTTTTTTTTAAACAGGTA 180
Wt      GTCTTGCCCTCAAGTATCAGCTGGAAAACAGGTAAACTTTTTTTTTTTTTTTAAACAGGTA 180
Simpans GTCTTGCCCTCAAGTATCAGCTGGAAAACAGGTAAACTTTTTTTTTTTTTTTAAACAGGTA 180
*****

Alu/Alu AACTCTTAATTTCTGAAAGGGTGCTAAAAGGGATTCCATGTAACCTGTCCTTTCATGTG 240
Wt      AACTCTTAATTTCTGAAAGGGTGCTAAAAGGGATTCCATGTAACCTGTCCTTTCATGTG 240
Simpans AACTCTTAATTTCTGAAAGGGTGCTAAAAGGGATTCCATGTAACCTGTCCTTTCATGTG 240
*****

Alu/Alu GATAGACTTCTACCTTTTCTTCTAAGGGTAACCAACCCTTGAAGTAGGTTAATCTCATTG 300
Wt      GATAGACTTCTACCTTTTCTTCTAAGGGTAACCAACCCTTGAAGTAGGTTAATCTCATTG 300
Simpans GATAGACTTCTACCTTTTCTTCTAAGGGTAACCAACCCTTGAAGTAGGTTAATCTCATTG 300
*****

Alu/Alu CAGAAATGAAGTGAAGATCACCTCATTGGTGCATATGCATTATTTAATGTAAATGGGTAC 360
Wt      CAGAAATGAAGTGAAGATCACCTCATTGGTGCATATGCATTATTTAATGTAAATGGGTAC 360
Simpans CAGAAATGAAGTGAAGATCACCTCATTGGTGCATATGCATTATTTAATGTAAATGGGTAC 360
*****

Alu/Alu GTTACTGACAGCAGTGACAATCCAAAGTTTCACTTCTAGTCTTACCAGTCCAAAATTGAT 420
Wt      GTTACTGACAGCAGTGACAATCCAAAGTTTCACTTCTAGTCTTACCAGTCCAAAATTGAT 420
Simpans GTTACTGACAGCAGTGACAATCCAAAGTTTCACTTCTAGTCTTACCAGTCCAAAATCGAT 420
*****

Alu/Alu GTAACAGGTATTAGAAATAACAGGTAAATAAAGGTGCTCTGGTAACTGAACCTATGACA 480
Wt      GTAACAGGTATTAGAAATAACAGGTAAATAAAGGTGCTCTGGTAACTGAACCTATGACA 480
Simpans TTAACAGGTATTAGAAATAACAGGTAAATAAAGGTGCTCTGGTAACTGAACCTATGACA 480
*****

Alu/Alu TTCCCTAGAATTGTGTCAGCTATGCTGATATTCTAGGTTTGAAACTATGCTTTATTTTC 540
Wt      TTCCCTAGAATTGTGTCAGCTATGCTGATATTCTAGGTTTGAAACTATGCTTTATTTTC 540
Simpans TTCCCTAGAATTGTGTCAGCTATGCTGATATTCTAGGTTTGAAACTATGCTTTATTTTC 540
*****

Alu/Alu ATGTAGATTTCTGCACTGTTTACTGTGTGGAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACG 600
Wt      ATGTAGATTTCTGCACTGTTTACTGTGTGGAATGTTTTTTTTTT----- 583
Simpans ATGTAGATTTCTGCACTGTTTACTGTGTGGAATGTTTTTTTTTT----- 584
*****

Alu/Alu GAGTCTCGCTCTGTGCGCCAGGTCGGACTGCGGACTGCAGTGGCGCAATCTCGGCTCACT 660
Wt      -----
Simpans -----

```

Alu/Alu GCAAGCTCCGCTTCCCGGGTTCACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGA 720
Wt -----
Simpans -----

Alu/Alu CTACAGGCGCCCGCCACCGCGCCCGGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTT 780
Wt -----
Simpans -----

Alu/Alu CACCTTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCATGATCCACCCGCTCGGCCTC 840
Wt -----
Simpans -----

Alu/Alu CCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCGCCCGGCCTTTTTTTTCTTAAGTAGT 900
Wt -----CTTAAGTAGT 593
Simpans -----CTTAAGTAGT 594

Alu/Alu CCTCCTAATCACTTGAGAAGTACCCTGTAGAAGGTATGCTTTTTCTGAATGACCTTTTTTC 960
Wt CCTCCTAATCACTTGAGAAGTACCCTGTAGAAGGTATGCTTTTTCTGAATGACCTTTTTTC 653
Simpans CCTCCTAATCACTTGAGAAGTACCCTGTAGAAGTTATGCTTTTTCTGAATGACCTTTGTTC 654

Alu/Alu AACTTTATTTTTGAGTACTGTTGTGCATGTATGTGCACAGTGTATTGTTACCCTAATATT 1020
Wt AACTTTATTTTTGAGTACTGTTGTGCATGTATGTGCACAGTGTATTGTTACCCTAATATT 713
Simpans AACTTTATTTTTGAGCACTGTTGTGCATGTATGTGCACAGTGTATTGTTACCCTAATATT 714

Alu/Alu TCATCACATCTGAGATGCTATCAACTTTAAAATGTACCATATTTTATGTACCACATTATC 1080
Wt TCATCACATCTGAGATGCTATCAACTTTAAAATGTACCATATTTTATGTACCACATTATC 773
Simpans TCATCACATCTGAGATGCTATCAACTTTAAAATGTACCA-----CATTATC 760

Alu/Alu AGTTATAAAGTAGATCCCAATTTCTCACATGTTAAAATGATCAGGTAGTGGAGAGGGATG 1140
Wt AGTTATAAAGTAGATCCCAATTTCTCACATGTTAAAATGATCAGGTAGTGGAGAGGGATG 833
Simpans AGTTATAAAGTAGATCCCAATTTCTCACATGTTAAAATGGTCAGGTAGTGGAGAGGGATG 820

Alu/Alu ATTGCATCCTAGAATGAGTGAAATATGTGAATTATACCAATTTTTATTGAGCCATGTTGG 1200
Wt ATTGCATCCTAGAATGAGTGAAATATGTGAATTATACCAATTTTTATTGAGCCATGTTGG 893
Simpans ATTGCATCCTAGAATGAGTGAAATATGTGAATTATACCAATTTTTATTGAGCCATGTTGG 880

Alu/Alu ACTTAAGAATTTTAGAAATAATACGAATGAAATCTTAATCCACTGGAAGGAATTCATT 1260
Wt ACTTAAGAATTTTAGAAATAATACGAATGAAATCTTAATCCACTGGAAGGAATTCATT 953
Simpans ACTTAAGAATTTTAGAAATAATATGAATGAAATCTTAATCCACTGGAAGGAATTCATT 940

Alu/Alu TGAATTTAGTAACTACTGTAACAGCAGTCGTAACCTTTAGTGATAGCATTATGGTATATA 1320
Wt TGAATTTAGTAACTACTGTAACAGCAGTCGTAACCTTTAGTGATAGCATTATGGTATATA 1013
Simpans TGAATTTAGTAACTACTGTAATAGCAGTCGTAACCTTTAGTGATAGCATTATGGTATATA 1000

Alu/Alu AAATATATTCCAATAAAGCTGTTAAAAA-AAGCAACCCCTTGTCTATGGAAGGGTC 1379
Wt AAATATATTCCAATAAAGCTGTTAAAAA-AAGCAACCCCTTGTCTATGGAAGGGTC 1072
Simpans AAATATATTCCAATAAAGCTGTTAAAAA-AAGCAACCCCTTGTCTATGGAAGGGTC 1060

Alu/Alu CTCTTCTATTGCCAAATGCTGAAGCATTAGCAAATATTTCTATGACAAAAGGTGTAGAAC 1439
Wt CTCTTCTATTGCCAAATGCTGAAGCATTAGCAAATATTTCTATGACAAAAGGTGTAGAAC 1132
Simpans CTCTTCTATTGCCAAATGCTGAAGCATTAGCAAATATTTCTATGACAAAAGGTGTAGAAC 1120

Alu/Alu AGTAATAGTCTATTTAGCCTCTTTCTCTCTGCTCTCCTTTCCATATTTTATGTGGCAT 1499
Wt AGTAATAGTCTATTTAGCCTCTTTCTCTCTGCTCTCCTTTCCATATTTTATGTGGCAT 1192
Simpans AGTAATAGTCTATTTAGCCTCTTTCTCTCTGCTCTCCTTTCCATATTTTATGTGGCAT 1180

Alu/Alu ATTAACCTAACACTAATGTATGCAGGGTTTTGTTGGTTTGGTGTTTTTTTTTTTTGT 1559
Wt ATTAACCTAACACTAATGTATGCAGGGTTTTGTTGGTTTGGTGTTTTTTTTTTTT--GTTT 1250
Simpans ATTAACCTAACACTAATGTATGCAGGGTTTTGTTGGTTTGGTGTTTTTTTTTTTGTT---TT 1236

Alu/Alu GTTTTTTCTCTTTTGGCTAATACATAAATCTTGCTTTTGGCAGCCTTGCTTTTTTTTT 1619
Wt GTTTTTTCTCTTTTGGCTAATACATAAATCTTGCTTTTGGCAGCCTTGCTTTTTTTTT 1310
Simpans GTTTTTTCTCTTTTGGCTAATACATAAATCTTGCTTTTGGCAGCCTTGCTATTTTTTT 1296

Alu/Alu TTTTTTTTTTTTTTTTAA-GCCTGTCTGTTTTGTTTTTCTTTACCTTCCCAGCTTCCAGT 1678
Wt TTTTTTTTTTTTTTTTAA-GCCTGTCTGTTTTGTTTTTCTTTACCTTCCCAGCTTCCAGT 1369
Simpans TTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCCTGTCTGTTTTGTTTTTCTTTACCTTCCCAGCTTCCAGT 1356

Alu/Alu TTCCCAGCCAGTACCAACTATCCAAGGCGAACCTCAGATCCCAGTTGCGACACAACCCTC 1738
Wt TTCCCAGCCAGTACCAACTATCCAAGGCGAACCTCAGATCCCAGTTGCGACACAACCCTC 1429
Simpans TTCCCAGCCAGTACCAACTATCCAAGGCGAACCTCAGATCCCAGTTGCGACACAACCCTC 1416

Alu/Alu GGTGTTCCAGTCCACTCTGGTGTCTATTTCCCTCCAGTGGGACAGCCGCTCCCTACTCC 1798
Wt GGTGTTCCAGTCCACTCTGGTGTCTATTTCCCTCCAGTGGGACAGCCGCTCCCTACTCC 1489
Simpans GGTGTTCCAGTCCACTCTGGTGTCTATTTCCCTCCAGTGGGACAGCCGCTCCCTACTCC 1476

Alu/Alu CTTGCTCCCTCAGTACCCTGTCTCTCAGATTCCCATATCAACTCCTCATGTGTCTACGGC 1858
Wt CTTGCTCCCTCAGTACCCTGTCTCTCAGATTCCCATATCAACTCCTCATGTGTCTACGGC 1549
Simpans CTTGCTCCCTCAGTACCCTGTCTCTCAAATTCCCATATCAACTCCTCATGTGTCTACGGC 1536

Alu/Alu TCAGACAGGTTTCTCATCCCTTCCCATCACAATGGCAGCTGGCATTACTCAGCCTCTGCT 1918
Wt TCAGACAGGTTTCTCATCCCTTCCCATCACAATGGCAGCTGGCATTACTCAGCCTCTGCT 1609
Simpans TCAGACAGGTTTCTCATCCCTTCCCATCACAATGGCAGCTGGCATTACTCAGCCTCTGCT 1596

Alu/Alu CACGTTGGCTTCATCTGCTACAACAGCTGCGATCCCGGGGTATCAACTGTGGTTCCCTAG 1978
Wt CACGTTGGCTTCATCTGCTACAACAGCTGCGATCCCGGGGTATCAACTGTGGTTCCCTAG 1669
Simpans CACGTTGGCTTCATCTGCTACAACAGCTGCGATCCCGGGGTATCAACTGTGGTTCCCTAG 1656

Alu/Alu TCAGCTTCCAACCCTTCTGCAGCCTGTGACTCAGCTGCCAAGTCAGGTTACCCACAGCT 2038
Wt TCAGCTTCCAACCCTTCTGCAGCCTGTGACTCAGCTGCCAAGTCAGGTTACCCACAGCT 1729
Simpans TCAGCTTCCAACCCTTCTGCAGCCTGTGACTCAGCTGCCAAGTCAGGTTACCCACAGCT 1716

Alu/Alu CCTACAACCAGCAGTTCAGTCCATGGGAATACCAGCTAACCTTGGACAAGCTGCTGAGGT 2098
Wt CCTACAACCAGCAGTTCAGTCCATGGGAATACCAGCTAACCTTGGACAAGCTGCTGAGGT 1789
Simpans CCTACAACCAGCAGTTCAGTCCATGGGAATACCAGCTAACCTTGGACAAGCTGCTGAGGT 1776

Alu/Alu TCCACTTTCCTCTGGAGATGTTCTGTACCAG 2129
Wt TCCACTTTCCTCTGGAGATGTTCTGTACCAG 1820
Simpans TCCACTTTCCTCTGGAGATGTTCTGTACCAG 1807

Lisa 3. *Alu* insertiooniga alleelisagedused kõikides uuritud populatsioonides, erinevate genotüüpidega indiviidide arv populatsioonis ja kogu valimi suurus.

Populatsioon	Indiviidide arv			Kokku	Allelisagedus
	<i>Alu/Alu</i> ¹	<i>Alu/-</i> ²	<i>-/-</i> ³		
eestlased	32	303	805	1140	16,1%
tšehhid	9	102	272	383	15,7%
CEPH	2	5	23	30	15,0%
baskid	0	14	36	50	14,0%
kataloonlased	0	11	30	41	13,4%
hannid	2	7	16	25	22,0%
korealased	1	8	34	43	11,6%
tatarlased	1	16	30	47	19,1%
baškiirid	2	10	35	47	14,9%
mustlased	0	12	38	50	12,0%
mandenkaalud	0	1	23	24	2,1%
tansaanlased	0	2	15	17	5,9%
gabonlased	0	4	46	50	4,0%
pügmeed	0	7	43	50	7,0%
MOJ (Oujda) ⁴	2	2	9	13	23,1%
MCA (Casablanca) ⁴	0	8	17	25	16,0%
MRA (Rabat) ⁴	0	4	18	22	9,1%
MCH (Chefchaouen) ⁴	0	3	8	11	13,6%
MNA (Nador) ⁴	0	5	8	13	19,2%
saharaavid	6	13	31	50	25,0%
tuneeslased	1	8	39	48	10,4%
alžeerlased	0	14	34	48	14,6%

¹*Alu* insertiooniga homosügoodid, ²*Alu*-ga heterosügoodid, ³*Alu*-ta homosügoodid

⁴Maroko linn, kust proovid on kogutud.

Lisa 4. Xing jt., 2007 järgi. Joonisel on kujutatud alleelisageduste järgi konstrueeritud puu, mis illustreerib 100 erineva *Alu* insertiooni jaotuvust 36 populatsioonis.

