

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

Kertu Liis Krigul

**DNA metülatsioonimustri roll endometriooosi kujunemises**

Bakalaureusetöö

Juhendajad Merli Saare, MSc  
Liis Leitsalu, MSc

TARTU 2016

## Sisukord

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Kasutatud lühendid .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>Sissejuhatus .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1. Kirjanduse ülevaade.....</b>  | <b>6</b>  |
| 1.1 Ülevaade endometriosisist.....  | 6         |
| 1.1.1 Haiguse iseloomustus .....  | 6         |
| 1.1.2 Endometriosisi diagnoosimine ja ravi .....  | 7         |
| 1.1.3 Endometriosisi kujunemise teooriad .....  | 9         |
| 1.1.4 Endometriosisi patogeneesi mehhanismid .....  | 11        |
| 1.1.4.1 Immunoloogilised ja põletikuga seotud tegurid haiguse kujunemises .....             | 12        |
| 1.1.4.2 Keskkonnafaktorid haiguse kujunemises .....   | 13        |
| 1.1.4.3 Hormonaalsed faktorid haiguse kujunemises .....                                     | 14        |
| 1.1.4.4 Geneetilised tegurid haiguse kujunemises.....                                       | 15        |
| 1.1.5 DNA metülatsioon.....   | 17        |
| 1.1.5.1 DNA metülatsiooni olemus .....  | 17        |
| 1.1.5.2 DNA metülatsiooni bioloogiline olulisus.....  | 19        |
| 1.1.5.3 DNA metülatsiooni uurimise meetodid.....  | 20        |
| <b>2. Uurimus .....</b>   | <b>23</b> |
| 2.1 Töö eesmärgid .....   | 23        |
| 2.2 Materjal ja meetodika.....  | 23        |
| 2.3 Tulemused .....   | 23        |
| 2.3.1 Kandidaatgeenidel põhinevad DNA metülatsiooni uuringud.....                           | 23        |
| 2.3.2 Ülegenoomsed DNA metülatsiooni uuringud .....   | 27        |
| 2.3.2.1 Endomeetriumi DNA metülatsiooni uuring .....  | 28        |
| 2.3.2.2 Endometsioosikollete DNA metülatsiooni uuring.....                                  | 28        |
| 2.3.2.3 Endometriosisikolde ja endomeetriumi stroomarakkude DNA metülatsiooni uuringud..... | 29        |
| 2.3.2.4 Ülegenoomsete DNA metülatsiooni uuringute omavaheline võrdlus .....                 | 30        |
| 2.4 Arutelu .....   | 34        |
| <b>Kokkuvõte .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>The role of DNA methylation in the pathogenesis of endometriosis.....</b>                | <b>40</b> |
| <b>Kasutatud kirjandus .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>Kasutatud veebiaadressid .....</b>   | <b>59</b> |
| <b>Lihlitsents.....</b>   | <b>60</b> |

## Kasutatud lühendid

|                   |   |
|-------------------|---|
| 17 $\beta$ -HSDT2 | 17 $\beta$ - beeta-hüdroksüsteroidi dehüdrogenaasi tüüp 2 ( <i>17<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase type 2</i> ) |
| 5mC               | 5-metüültsütosiin ( <i>5-methylcytosine</i> )   |
| ASRM              | Ameerika reproduktiivmeditsiini ühing ( <i>American Society for Reproductive Medicine</i> )                                   |
| COX-2             | Tsüklooksügenaas-2 ( <i>cyclo-oxygenase-2</i> )   |
| CGI               | CpG saareke ( <i>CpG island</i> )   |
| CpG               | Fosfodiestersideme abil ühendatud nukleotiidid tsütosiin ja guaniin ( <i>cytosine-phosphate-guanine</i> )                     |
| DMR               | Erinevalt metüleeritud regioon ( <i>differentially methylated region</i> )  |
| DNMT              | DNA metüültransferaas ( <i>DNA methyltransferase</i> )  |
| EDC               | Endokriinsüsteemi kahjustavad kemikaalid ( <i>endocrine disrupting chemicals</i> )  |
| ER                | Östrogeeni retseptor ( <i>estrogen receptor</i> )   |
| FN                | Fibronektiin ( <i>fibronectin</i> )   |
| GWAS              | Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring ( <i>genome-wide association study</i> )  |
| HDAC              | Histooni deatsetülaasid ( <i>histone deacetylases</i> )   |
| IL                | Interleukiin ( <i>interleukin</i> )   |
| MeCP2             | Metüleeritud CpGd siduv valk 2 ( <i>methyl CpG binding protein 2</i> )  |
| MeDIP             | Metüleeritud DNA immuunsadestamine ( <i>methylated DNA immunoprecipitation</i> )  |
| MCP-1             | Monotsüüdi kemoatraktant-I ( <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )  |
| MMP               | Maatriks metalloproteinaas ( <i>matrix metalloproteinase</i> )  |
| MRT               | Magnetresonantstomograafia ( <i>magnetic resonance imaging</i> )  |
| MVP               | Metülatsiooni suhtes varieeruv positsioon ( <i>methylation variable position</i> )  |
| NK rakud          | Loomulikud tapjarakud ( <i>natural killer cells</i> )   |
| PCB               | Polüklooritud bifenüülid ( <i>polychlorinated-biphenyls</i> )   |

|               |   |
|---------------|---|
| PCDD          | Polüklooritud-dibenso-para-dioksiinid ( <i>polychlorinated-dibenzo-p-dioxins</i> )                                |
| PCDF          | Polüklooritud dibensofuraanid ( <i>polychlorinated-dibenzofurans</i> )  |
| PR            | Progesterooni retseptor ( <i>progesterone receptor</i> )  |
| qRT-PCR       | Kvantitatiivne reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )   |
| SAH           | S-adenosüül-L-homotsüsteiin ( <i>S-Adenosyl-L-homocysteine</i> )  |
| SAM           | S-adenosüülmetioniin ( <i>S-Adenosyl methionine</i> )   |
| SF            | Steroidifaktor ( <i>steroid factor</i> )  |
| SNP           | Ühenukleotiidne polümorfism ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )   |
| STAR          | Steroidogeenne akuutne reguleeriv valk ( <i>steroidogenic acute regulatory protein</i> )                          |
| TCDD          | 2,3,7,8-tetraklorodibenso-para-dioksiin ( <i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin</i> )                               |
| TIMP          | Metalloproteinaaside koeinhibiitorid ( <i>tissue inhibitor metalloproteinase</i> )                                |
| TNF- $\alpha$ | Tuumornekroosifaktor $\alpha$ ( <i>tumour necrose factor <math>\alpha</math></i> )                                |
| TGF- $\beta$  | Transformeeriv kasvufaktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )                       |
| TSS           | Transkriptsiooni algussait ( <i>transcription start site</i> )  |
| WERF EPHeCt   | ( <i>World Endometriosis Research Foundation<br/>Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project</i> ) |

## Sissejuhatus

Endometriosis on östrogeenist sõltuv komplekshaigus, mis esineb umbes 10%-l reproduktiivses eas olevatest naistest. Haigust iseloomustab endomeetriumi sarnase koe esinemine ja talitlemine väljaspool emakaõõnt. Kõhuõõnes paiknevad veritsevad endometriosisikolded põhjustavad põletikulisi protsesse, mis võivad viia alakõhu valude tekkeni. Põletikuliste protsesside tagajärjel võivad tekkida alakõhus ka liited, mis omakorda võivad viia viljatuse kujunemiseni.

Kuigi haigust kirjeldati esmakordselt aastal 1860, pole endiselt selge, miks see tekib. Välja on pakutud erinevaid haiguse kujunemist selgitavaid teooriaid ja mehhanisme, kuid ükski neist teooriatest ei suuda siiski piisavalt veenvalt endometriosisi teket seletada. Arvatakse, olulist rolli võivad mängida nii hormonaalsed, immunoloogilised, geneetilised kui ka keskkonnafaktorid. Hiljutised uuringud on välja pakkunud, et endometriosisi kujunemine võib olla seotud muutustega endomeetriumi ja endometriosisikollete rakkude DNA metülatsioonimustris.

DNA metülatsioon on oluline epigeneetiline mehhanism, mis osaleb geeniekspressiooni regulatsioonil ja koetsiifiliste geenide avaldumisel. Lisaks mängib see rolli paljudes organismis olulistel protsessidel nagu transponeeruvate elementide mahasurumine, X kromosoomi inaktiveerimine, genoomne imprinting jne. On leitud, et muutused metülatsioonimustris võivad mõjutada paljude erinevate haiguste, nagu näiteks vähkkasvajate kujunemist ning autoimmuunhaiguste teket. See on ajendanud otsima ka võimalikke seoseid endometriosisi kujunemise ja DNA metülatsioonimustri muutuste vahel.

Töö üldeesmärgiks on anda ülevaade endometriosisist, endometriosisiga seotud DNA metülatsiooni uuringutest ning sellest, kuidas DNA metülatsiooni muutused võiksid endometriosisi kujunemisel rolli mängida.

Töö teostati Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS-s.

Märksõnad: Endometriosis, DNA metülatsioon

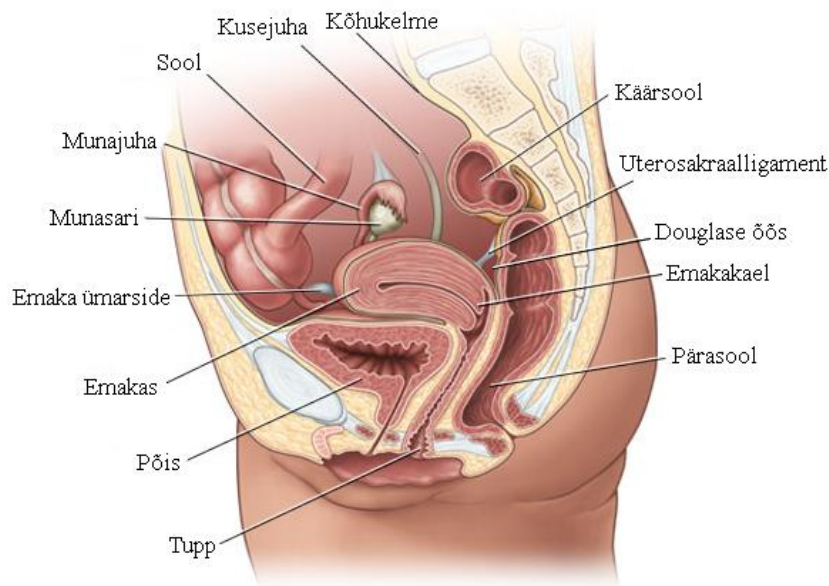
## **1. Kirjanduse ülevaade**

### **1.1 Ülevaade endometriosisist**

#### **1.1.1 Haiguse iseloomustus**

Endometriosis on levinud günekoloogiline haigus, mille esinemissagedus reproduktiivses eas naiste üldpopulatsioonis on ligikaudu 10% ja viljakusprobleemidega naistel isegi kuni 50% (Houston jt, 1987; Signorile jt, 2009). Haigust iseloomustab endomeetriumi ehk emaka limaskestast sarnase koe esinemine ja talitlemine väljaspool emakaõõnt (Giudice, 2010; Kitawaki jt, 2002). Endometriosisi on esmakordselt mainitud juba aastal 1860, mil Poola arst Von Rokitansky kirjeldas kõhuõõnes paiknevat veritsevat koldeid (Rokitansky, 1860). Endometriosisikolletena kasvav endomeetrium reageerib organismi hormonaalse tasakaalu muutustele koe perioodilise kasvuga ning sarnaselt emakas olevale endomeetriumile toimub ka kolletes menstruatsiooni ajal endomeetriumi koe lagunemine. Kõhuõõnde sattunud veri kutsub esile põletikulisi ja liitelisi protsesse, mille tagajärjel tekivad haigusega seotud sümptomid nagu valulik menstruatsioon, valulik suguühe, valulik urineerimine, vaagnapiirkonna kroonilised valud ja sageli ka viljatus. Vaagnapiirkonna valud võivad langeda kokku menstruaaltsükli algusega või esineda ühtlaselt kogu menstruaaltsükli jooksul (Burns ja Schenken, 1999). Samas võib haigus kulgeda ka asümptomaatiliselt (Giudice jt, 2012).

Endometriosisikolded võivad esineda kõikide kõhuõõne elundite pinnal. Enamlevinud kohtadeks on munasarjad, kõhukelme, munajuhad, emakakael, soolte pind, Douglase õõs, emakat toetavad sidemed, põis ja kusejuhad (Joonis 1). Harvemini on koldeid leitud kopsudel, kesknärvisüsteemis, rinnakelmel, diafragmal, südamepaunal ja operatsiooniarmidel (Comiter, 2002; Giudice jt, 2004). On teada juhtumeid endometriosisi esinemisest meestel, kes on saanud pikka aega eesnäärmevähi raviks östrogeenipreparaate (Suginami, 1991). Teismeliseeas enne menarhet on endometriosis haruldane ning haigus enamasti taandub menopausi järel (Kauppila, 2008).



**Joonis 1. Endometriosisikollete võimalik paiknemine.** Kolded võivad esineda kõikide kõhuõõne elundite pinnal. Sagedasemad asukohad on munasarjad, kuse- ja munajuhad, emakakael, Douglase õõs, kõhukelme ja uterosakraalligamendid (muudetud joonis [http://www.endo-resolved.com/surgical\\_procedures.html](http://www.endo-resolved.com/surgical_procedures.html)).

Epidemioloogilised uuringud on välja toonud haigestumise riski tõstvaid tegureid nagu varajane menarhe ja lühikesed ning vererohked menstruaaltsüklid. Riskigruppi kuuluvad ka naised, kes pole kunagi last sünnitanud (Giudice jt, 2012). Arvatakse, et endometriosisi levimus on kasvamas ning selle põhjusteks loetakse menarhe nihkumist varasemale ajale, raseduste arvu vähenemist, lühemat imetamise perioodi ning vanuse kasvu esimese lapse sünnitamisel (Missmer jt, 2004).

### 1.1.2 Endometriosisi diagnoosimine ja ravi

Endometriosisi diagnoosimine võib võtta palju aega. Uuringud on leidnud, et alates sümptomite esmakordsest esinemisest kuni haiguse diagnoosimiseni võib näiteks USA-s kuluda keskmiselt 11,7 aastat (Hadfield jt, 1996). Kahjuks puuduvad endometriosisi varajaseks kliiniliseks diagnoosimiseks mitte-invasiivsed diagnostilised testid ning haiguse tuvastamiseks ning raviks kasutatakse laparoskoopilist uuringut, mis võimaldab vaadelda ja eemaldada kõhuõõnes paiknevaid endometriosisikoldeid (Ballard jt, 2006; Bulun, 2009). Laparoskoopia käigus eemaldatud koebiopsiatele tehakse histoloogiline uuring, kus endomeetriumi laadsete rakkude ehk epiteeli ja strooma olemasolu kinnitab haiguse diagnoosi

(Dunselman jt, 2014). Lisaks kasutatakse haiguse diagnoosiks ultraheliuuringut või magnetresonantstomograafiat (MRT), mis on võrreldes laparoskoopiaga ebatäpsemad meetodid, kuid asendamatud endometrioomide ehk munasarja tsüstide tuvastamisel (Exacoustos jt, 2014). MRT abil on võimalik endometriosikoldeid visualiseerida kui laparoskoopia kasutamine pole liidete tõttu võimalik (Bis jt, 1997). Samas on alla 2-3 millimeetriste ning subperitoneaalsete kollete leidmine MRT abil vähetõhus (Signorile ja Baldi, 2015).

Endometrioosi jagatakse vastavalt kollete paiknemisele kolmeks alatüübiks: peritoneaalne ehk kõhuõõne endometrioos, ovariaalne ehk munasarja endometrioos ja sügav nodulaarne ehk sõlmeline süvaendometrioos. Endometriosikolded võivad esineda kas ühe kindla alamtüübina (näiteks ainult peritoneaalsed kolded) või siis esinevad koos mitu erinevat alamtüüpi (näiteks munasarja endometrioos koos peritoneaalsete kolletega) (Donnez jt, 1997; Brosens ja Benagiano, 2012). Peritoneaalse endometrioosi korral võib leida punakaid, sinakas-mustjaid ning valkjaid, mis paiknevad pigem pindmiselt. Valkjaid koldeid peetakse juba paranenud endometriosikolleteks, punakaid noorteks ning sinakas-mustjaid edasiarenenud endometrioosi kolleteks (Redwine, 1987; Nisolle jt, 1993). Ovariaalse endometrioosi korral on tüüpiliseks leiuks „šokolaaditsüstid“ ehk vanast verest ja rakumassist tekkinud tumepruunid põisjad moodustised. Süvaendometrioosi korral võivad kolded esineda rektovaginaalses vaheseinas, uterosakraalsidemitel, utero-ovariaalsidemitel ja vaagna elundite lihaselises seinas (Brosens ja Benagiano, 2012).

Vastavalt ASRM (American Society for Reproductive Medicine) klassifikatsioonile eristatakse kirurgiliste leidude alusel nelja endometrioosi raskusastet, mille määramisel võetakse arvesse vaagna elundite kahjustuste ulatust, munajuhade läbitavust, liidete esinemist, kollete paiknemist, hulka, sügavust ja suurust (ASRM, 1997). I staadium tähistab minimaalse astme, II staadium kerge astme, III staadiumi mõõduka astme ja IV staadium raske astme endometrioosi. Minimaalse ja kerge astme endometrioosi korral leitakse kõhuõõnest üksikuid pindmiseid koldeid. Munajuhad on enamasti läbitavad, munasarjad võivad olla kahjustunud, võib esineda vaagnavalu ning viljatust, kuid kaebused võivad ka puududa. Haigust on võimalik medikamentidega kontrolli all hoida. Mõõduka astme endometrioosi korral täheldatakse suurenenud vaagnavalu, munajuhad võivad olla muutunud läbimatuks, koldeid on rohkem ja nad on sügavamad ning munasarjad ja emakas võivad olla kahjustunud. Lisaks on liidete hulk kõhuõõnes suurenenud. Raske astme endometrioosi korral on eelnevalt

kirjeldatud sümptomid veelgi võimendunud, liidete osakaal suurenenud, kolded sügavamad ja ulatuslikumad. Lisaks võib esineda üle 2,5 cm suuruseid munasarja endometriioome (ASRM, 1997). Kuigi antud klassifikatsiooni kasutatakse laialdaselt, ei võimalda see hinnata patsiendi valu ulatust, viljatuse riski ning ravijärgset rasedumisvõimet (Audebert jt, 1991).

Ainuke teadaolev efektiivne viis endometriiosist vabanemiseks on kollete kirurgiline eemaldamine. Farmakoloogiline ravi aitab vaid sümptomeid leevendada, haigusest vabanemiseks see piisav ei ole (Bulun, 2009). Ravi määratakse patsiendile individuaalselt sõltuvalt sümptomitest, viljakusest ning tema vanusest. Tavaliselt kasutatakse kirurgilist ning farmakoloogilist ravimeetodit kombineeritult. Esialgu kõrvaldatakse kõhuõõnest kõik nähtavad kolded ning seejärel kasutatakse hormonaalseid preparaate, nagu näiteks rasedumisvastaseid medikamente, et vähendada menstruatsioonil erituvat vere hulka (Bullett jt, 2010). Veritsemine väheneb ka endometriiosikolletes ja see omakorda takistab valu ja põletiku teket (Huang, 2008). Pikema aja peale endometriiosikolded taanduvad ning sümptomid leevenduvad, sageli paraneb ka võime raseduda. Samas on leitud, et peaaegu pooltel juhtudel taaspuhkeb haigus ravi järgselt (D'Hooghe jt, 2004).

### **1.1.3 Endometriooosi kujunemise teooriad**

On välja toodud mitmeid teooriaid, mis püüavad seletada endometriooosi patogeneesi mehhanisme. Tuntumad nendest on implantatsiooniteooria ja tsöloomse metaplaasia teooria. Neist kahest tõenäolisemaks peetakse implantatsiooniteooriat, mille korral liigub endomeetriumi kude retrograadsel ehk äraspidisel menstruatsioonil läbi munajuhade kõhuõõnde ja kinnitub sealsetele organitele (Sampson, 1921). Teooria poolt räägib see, et retrograadset menstruatsiooni esineb naistel väga tihti. Seda kinnitab ka uuring, kus 90%-l tervetest naistest leiti menstruatsiooni järgselt peritoneaalses vedelikus menstruaalverd (Halme jt, 1984) ning elujõulist endomeetriumi kudet (Koks jt, 1997). Sampsoni teooriale räägib vastu asjaolu, et sellega ei suudeta seletada endometriooosi tekkimist meestel, menopausis naistel, noortel naistel, kellel pole menstruatsioon veel alanud (Laufer, 2000; Nap, 2012; Olikier, 1971) ning kollete esinemist ebatüüpilistes asukohtades nagu näiteks kopsudel või kesknärvisüsteemis. Samuti esineb 90%-l naistest küll retrograadne menstruatsioon, kuid endometriooos kujuneb vaid kuni 10%-l naistest. See annab alust arvata, et lisaks retrograadsele menstruatsioonile peavad haiguse kujunemisel rolli mängima ka teised tegurid, mis loovad eeldused endomeetriumi rakkude implantatsiooniks kõhuõõnes (Burney ja Giudice, 2012).

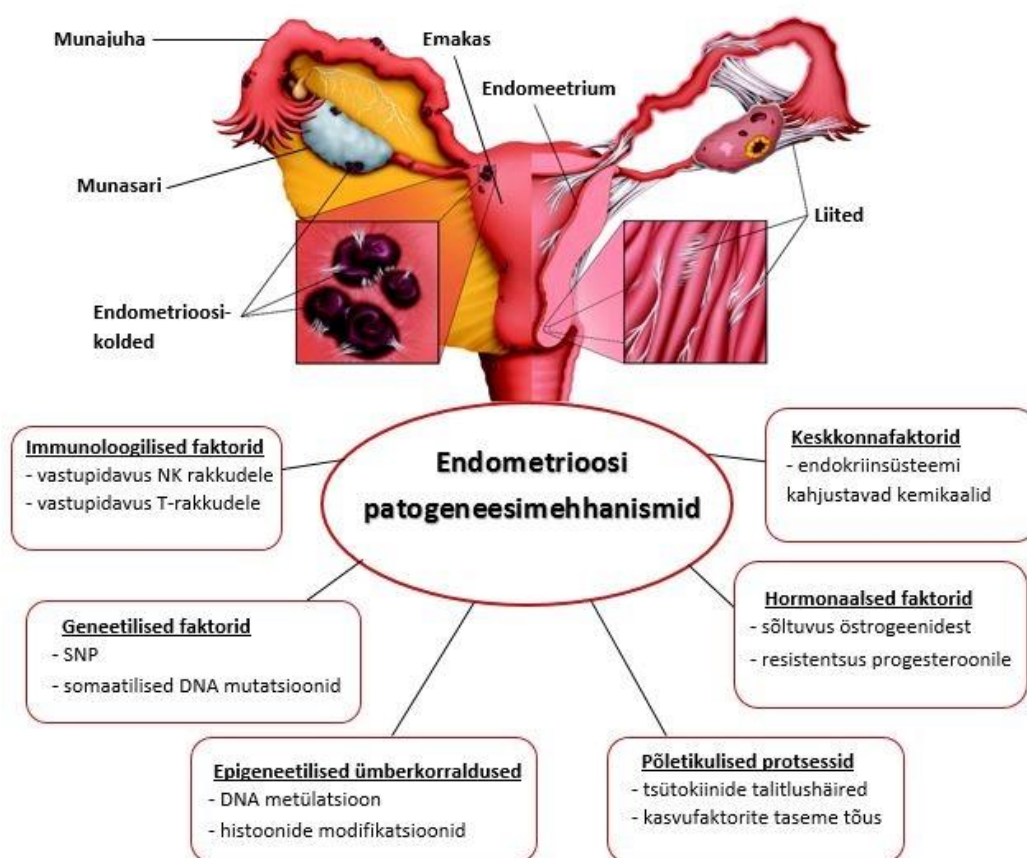
Teiseks enamlevinud teoriaks on tsöloomse metaplaasia teooria. Selle järgi võib tsöloomne kude muutuda endomeetriumi sarnaseks koeks. Kuna lisaks Mülleri juhadele areneb tsöloomsest seinapeiteelset välja ka rinna- ja kõhukelme (Donnez jt, 2012), siis saaks teooria abil seletada kollete paiknemist väljaspool vaagnapiirkonda. Samuti selgitaks see endometrioosikollete esinemist meestel ja ka naistel, kellel on menopaus või kellel pole menstruatsioone veel esinenud. Ka selles teoorias esineb siiski vasturääkivusi. Kui tsöloomne epiteel saab kergesti metaplaasia abil muutuda, siis peaks haigust rohkem esinema ka meeste seas. Samuti peaks endometrioosi sagedus vanusega tõusma nagu tõuseb vanusega metaplaasia esinemissagedus. Lisaks peaks koldeid esinema rohkem rindkere õõnes, kuna tsöloom mängib lisaks peritoneumiõõne arengule rolli ka rinnaõõne arengus (Nap jt, 2012). Arvatakse, et metaplaasia tekkepõhjused võivad peituda nii hormonaalse tasakaalu muutustes, põletikulistes protsessides (Nap jt, 2012) kui ka EDC-des (endokriinsüsteemi kahjustavates kemikaalides) (Crain jt, 2008).

Lisaks eelpool nimetatud teooriatele on välja pakutud ka embrüonaalsete rudimentide, induktsiooni- ja tüvirakkude teooriat ning endomeetriumi koe levikut veresoonekonna ja/või lümfisüsteemi abil. Embrüonaalsete rudimentide teooria kohaselt võivad kolded tekkida östrogeeni mõjul rakkudest, mis jäid alles embrüonaalse arengu ajal toimunud Mülleri juha migratsioonil (Burney ja Giudice, 2012). Induktsiooniteooriat peetakse tsöloomse metaplaasia teooria laienduseks, mille kohaselt kõhuõõnde sattunud endomeetrium eritab mingit tundmatut biokeemilist või immunoloogilist ainet, mis stimuleerib mesenhümaalseid rakke diferentseeruma endomeetriumi laadseks koeks (Levander ja Normann, 1955). Tüvirakkude teooria järgi võivad endometrioosikolded tekkida erinevate faktorite mõjul endomeetriumi tüvirakkudest, mis satuvad menstruatsiooni ajal läbi munajuhade ja lümfi- ja/või veresoonte kaudu emakavälisesse piirkonda (Gargett jt, 2008). Teooriale, mille järgi endomeetriumi kude levib lümfisüsteemi abil, räägivad kaasa endomeetriumi koe leiud lümfisoontest ja –sõlmedest (Aoki, 1967). Endomeetriumi rakkude levikut vereringe abil toetab see, et adenomüoosi ehk emaka endometrioosi patsientide emaka veresoontes on leitud endomeetriumi kudet (Sampson, 1927). Kuigi lümfisüsteem ja vereringe võivad patogeneesil rolli mängida, pole need ilmselt peamised mehhanismid, sest maksa, kopsu ja rindkere endometrioos on pigem harv nähtus (Donnez jt, 2012).

Ükski eelpool mainitud teooria pole siiski piisav, et veenvalt seletada endometriooosi väljakujunemist ning on võimalik, et eri piirkondades asuvatel kolletel on erinevad patogeneesimehhanismid.

### 1.1.4 Endometriooosi patogeneesi mehhanismid

Endometriooosi täpsed kujunemismehhanismid pole siiani selged. Arvatakse, et haiguse kujunemises mängivad olulist rolli nii immunoloogilised, põletikulised, hormonaalsed faktorid kui ka geneetiline eelsoodumus ja epigeneetilised ning keskkonnaga seotud tegurid (Joonis 2).



**Joonis 2. Endometriooosi võimalikud patogeneesi mehhanismid.** Joonisel on kujutatud endometriosiskoldeid emakal, munasarjadel ja munajuhadel ning liiteid, mis on muutnud munajuhad läbimatuks ja kahjustanud emakat. Lisaks on välja toodud haiguse võimalikud patogeneesi mehhanismid (muudetud <http://www.clearpassage.com/what-we-treat/infertility/endometriosis-infertility/>).

#### 1.1.4.1 Immunoloogilised ja põletikuga seotud tegurid haiguse kujunemises

Normaalselt funktsioneeriv immuunsüsteem peaks ära tundma ja hävitama vales kohas paikneva endomeetriumi koe. Endometrioosi korral jäävad aga endomeetriumi rakud kõhuõõnde alles, saavad seal kinnituda ning luua oma veresoonte võrgustiku et immuunsüsteem seda takistada suudaks. Seetõttu arvatakse, et endometriosikollete kujunemisel mängivad olulist rolli ka immuunsüsteemi häired (Gazvani ja Templeton, 2002). On välja pakutud rakulise immuunsuse kõrvalekaldeid nagu T-rakkude vahendatud tsütotoksilisuse vähenemine (Dmowski jt, 1981) ning ka NK-rakkude (*natural killer* ehk loomulike tapjarakkude) tsütotoksilisuse vähenemine (Oosterlynck, 1991), mille tõttu jääb kõhukelmele sattunud endomeetriumi kude immuunsüsteemi poolt hävitamata. Just immuunsüsteemi häireid peetakse üheks võimalikuks endometrioosiga seotud viljatuse põhjuseks (Kalinina ja Matt, 2003). Endometrioosi patsientidel on tuvastatud B-lümfotsüütide aktiivsuse tõusu, mis omakorda soodustab autoantikehade tootmist (Kyama jt, 2003). Leitud on nii organspetsiifilisi kui ka mitte-organspetsiifilisi antikehi, sagedamini anti-endometriaalseid, anti-ovariaalseid ja antifosfolipiid-antikehi (Kalinina ja Matt, 2003). Vereseerumis ja emakakaela sekreedis leiduvad antikehad võivad takistada embrüo implanteerumist ning mõjutada emaka limaskesta küpsemist kinnitades endomeetriumi, emaka veresoonte endoteelile või ladestudes immuunkompleksidena (Geva jt, 1997; Burns ja Schenken, 1999).

Endometrioosi korral on peritoneaalvedelikus tõusnud põletikuline aktiivsus ning ka makrofaagide hulk, suurenenud on tsütokiinide IL-1 (interleukiin-1), IL-6 (interleukiin-6), TNF- $\alpha$  (tuumornekroosifaktor  $\alpha$ ) ning kasvufaktorite TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) ja VEGF (veresoonte endoteeli kasvufaktor) tase (Kyama jt, 2003). Uuringud on näidanud, et VEGF ning IL-6 tasemed peritoneaalvedelikus on endometrioosi puhul kõrgemad kogu menstruaaltsükli jooksul võrreldes tervete kontrollidega ning korreleeruvad positiivselt haiguse raskusega (Witz, 1999; Mahnke jt, 2000). IL-6 hulk on suurenenud ka endometriosihaigete naiste eutoopilises endomeetriumis ning ka endometriosikolletes (Bergqvist jt, 2001). IL-6 osaleb munasarjades steroidhormoonide produktsioonis, follikulogeneesis ja implantatsiooni protsesside reguleerimisel (Tsudo jt, 2000), endometrioosi haigetel võib IL-6 aga vähendada NK rakkude tsütotoksilisust endomeetriumi fragmentide vastu kõhuõõnes (Kang jt, 2014). VEGF, mida toodavad makrofaagid IL-6 toimel, osaleb angiogeneesis, koevigastuste parandamises ja fibroosi moodustamises (Donnez

jt, 1998; Witz, 1999) ja seega võib VEGF olulist rolli mängida endometrioosikollete verevarustuse loomisel. Tsütokiin TNF- $\alpha$  on seotud endomeetriumi rakkude adhesiooni ja proliferatsiooni stimuleerimisega ning ekstratsellulaarset maatriksit lagundavate metalloproteinaaside (MMP) ekspressiooni suurendamisega (Kyama jt, 2003). MMP-d koos metalloproteinaaside koeinhibiitoritega (TIMP - *tissue inhibitor metalloproteinase*) osalevad veresoonte moodustumise, endomeetriumi uuenemise (Kyama jt, 2003) ja põletiku tekitamise protsessides (Parks jt, 2004). Endometrioosihaigete endomeetriumis on näidatud MMP-de geeniekspressiooni profiili muutusi võrreldes tervetega naistega (Uzan jt, 2004). Samuti on näidatud, et tsütokiinid IL-1 ja kasvufaktor TGF- $\beta$  soodustavad endometriaalse koe kinnitumist ja arengut ning aitavad kaasa põletikulise keskkonna loomisel ja säilitamisel (Kyama jt, 2003). Lisaks on endometrioosi patsientidel peritoneaalses vedelikus suurenenud ka IL-8, angiogeensete omadustega tsütokiini, kontsentratsioon ning tema taseme tõus võib kaasa tuua kõhuõõnde sattunud endomeetriumi suurenenud proliferatsiooni ja fibronektiinidele kinnitumise, luues sellega soodsad tingimused kollete tekkimiseks (Arici, 2002).

#### **1.1.4.2 Keskkonnanafaktorid haiguse kujunemises**

Arvatakse, et endometrioosi kujunemist võivad mõjutada ka keskkonnanafaktorid, täpsemalt endokriinsüsteemi kahjustavad kemikaalid ehk EDC-d (*endocrine disrupting chemicals*). Viimase 15 aasta jooksul on endometrioosi patogeneesiga seostatud 29 erinevat dioksiini ja dioksiini taolist endokriinsüsteemi kahjustavat kemikaali (Anger ja Foster, 2008; Rier ja Foster, 2003; Bruner-Tran jt, 2008). Nendest 7 on olnud polüklooritud-dibenso-paradioksiinid (*polychlorinated-dibenzo-p-dioxins*, PCDD), 10 polüklooritud dibensofuraanid (*polychlorinated-dibenzofurans*, PCDF) ja 12 polüklooritud bifenuülid (*polychlorinated-biphenyls*, PCB). Need EDC-d võivad aktiveerida, inhibeerida või jäljendada hormoonide tööd (Sonnenschein ja Soto, 1998) ning seonduda kas hormoonide endaga või nende retseptoritega. Nad võivad mõjutada nii hormoonide sünteesi, sekreteerimist, lagundamist, transporti kui ka seondumist retseptoritele, mis omakorda võib mõjutada keha homöostaasi, arengut, käitumist ja reproduktiivsüsteemi (Sofa jt, 2015). Samuti võivad need kemikaalid toimida kui kasvajate promootorid (Warner jt, 2002) ning mõjutada transkriptsiooni regulatsiooni seondudes tuuma pinnal paiknevatele retseptoritele. EDC-d võivad inhibeerida aromataasi, olla östrogeni ja androgeeni retseptorite antagonistid või agonistid (Yang, 2006) ning vähendada näiteks progesterooni retseptorite hulka (Nayyar jt, 2007). Reesusahvidel on

leitud doos-sõltuv seos kõige mürgisema endokriinsüsteemi kahjustava kemikaali 2,3,7,8-tetraklorodibenso-para-dioksiini ehk TCDD ja peritoneaalse endometrioosi vahel (Rier jt, 1993). Uuringud inimestega on aga vastuolulised. Võrreldes kontrollidega leiti endometrioosiga naistel vereseerumist rohkem TCDD kemikaali (Mayani jt, 1997). Inimeste endomeetriumi *in vitro* uuringus mõjutas TCDD endomeetriumi endoteeli rakkude proliferatsiooni, mis viitab selle rollile angiogeneesis (Bredhult jt, 2007). Samas on TCDD mõju endomeetriumi siiski pigem oletuslik, kuna *in vivo* uuringute läbi viimine ja TCDD mõju suuruse ja tagajärgede hindamine on keeruline. Samas on ka uuringuid, mis ei ole leidnud veenvaid tõendeid hüpoteesile, et keskkonnanafaktorid suurendaksid inimesel endometrioosi kujunemise riski (Guo, 2009).

#### **1.1.4.3 Hormonaalsed faktorid haiguse kujunemises**

Endometrioosi peetakse östrogeensõltuvaks haiguseks, kuna endometriosikolletes on näidatud suurenenud lokaalset östrogeeni biosünteesi, mis võib olla põhjustatud aromataasi ekspressiooni häiretest. Aromataasi normaalses endomeetriumis ei leidu, seega ei toodeta seal lokaalselt ka östrogeeni. Küll aga on aromataas aktiivne endometriosikolletes ja endometriosihaigete endomeetriumis ning selle tulemusel on suurenenud ka östrogeeni lokaalne tootmine (Kitawaki jt, 1997). Östrogeen stimuleerib tsüklooksügenaas-2 (*cyclooxygenase-2*, *COX-2*) tootmist, mis omakorda suurendab prostaglandiini E<sub>2</sub> kogust. Põletiku ja valuga seostatud prostaglandiin aga suurendab endometriosihaigetel omakorda aromataasi aktiivsust ja seeläbi jällegi östrogeeni hulka (Kitawaki jt, 1997; Simpson jt, 1980). Bioloogiliselt aktiivne östrogeen ehk östradiol on oluline endomeetriumi funktsionaalkihi taastamisel pärast menstruatsiooni. Kollete poolt toodetud östradiol võib aga lihtsustada endometrioidsete kudede implantatsiooni kõhuõõnde (Noble jt, 1997).

Lisaks aromataasiga seotud lokaalselt suurenenud östradioli biosünteesile on endometrioosi patogeneesiga ilmselt seotud ka progesterooni vastane resistentsus. Normaalses organismis on progesterooni roll inhibeerida östrogeeni toimet menstruatsioonitsükli sekretoorses faasis ja valmistada endomeetriumi ette implantatsiooni toimumiseks. Endometrioosi patsientidel on aga progesterooni retseptorite hulk endometriosikolletes vähenenud, mis teeb koldeid progesterooni osas resistentsemaks (Bulun jt, 2006; Attia jt, 2000). Kollete resistentsus tähendab aga omakorda, et lokaalselt toodetakse rohkem östrogeene, sest progesteroon ei aktiveeri östradioli inaktiveerivat 17 $\beta$ -hüdroksüsteroide dehüdrogenaasi tüüp 2 (17 $\beta$ -HSD2)

ensüümi (Cheng jt, 2007). Östradioli suurem hulk võib jällegi soodustada endometrioosikollete kasvu.

#### **1.1.4.4 Geneetilised tegurid haiguse kujunemises**

Ühe peamise endometrioosi kujunemist mõjutava tegurina on välja toodud haiguse võimalikku geneetilist tagapõhja. Geneetilisest eelsoodumusest annab märku see, et raske astme endometrioosiga naise esimese astme sugulastel on keskmiselt 7 korda kõrgem risk endometrioosi kujunemiseks, võrreldes esimese astme sugulastega tervel naisel (Moen ja Magnus, 1993). Samuti kinnitavad ka kaksikutel läbi viidud uuringud, et ühemunakaksikutel on 2x korda suurem risk saada endometrioos võrreldes erimunakaksikutega, mistõttu peetakse pärilikkuse määraks umbes 50% (Treloar jt, 1998; Saha jt, 2015).

Endometrioosi geneetilise tausta väljaselgitamiseks on kasutatud erinevaid uurimismeetodeid. Näiteks on läbi viidud suur hulk kandidaatgeenidel põhinevaid assotsiatsioonianalüüse, kus otsitakse ühenukleotiidseid polümorfisme (*single nucleotide polymorphism*, SNP) geenides, millel võiks olla seos haiguse avaldumisega. Selleks võrreldakse kandidaatgeenide SNP-de esinemissagedusi haigetest ja tervetest indiviididest koosnevates gruppides (Cardon ja Bell, 2001). Endometrioosi geneetilise tagapõhja mõistmiseks on uuritud vähemalt 70 kandidaatgeeni ning põhjaliku ülevaate 2008 - 2012 aastatel avaldatud kandidaatgeenide uuringute kohta on teinud Rahmioglu koos kaasautoritega (Rahmioglu, 2012). Nad tõid välja sagedamini uuritud geenide grupid (Tabel 1).

Autorid leidsid, et enim uuritud geeniks oli *VEGF*. Kuigi varasem metaanalüüs näitas, et *VEGF*-i viiest polümorfismist üks (rs3025039) oli statistiliselt oluline endometrioosi kujunemise riski suurendamisel (Liang jt, 2012), ei suudetud Austraalias läbi viidud mahuka uuringu käigus selle polümorfismi statistilist olulisust leida (Zhao jt, 2008). Rahmioglu ja kaasautorite metaanalüüs võttis kokku eelnevad kandidaatgeenide uuringud ning jõudis tulemuseni, et ei *VEGF*-i ega ühtegi teist kandidaatgeeni ei saa piisavalt veenvalt endometrioosi kujunemisega seostada (Rahmioglu jt, 2012).

**Tabel 1. Sagedamini uuritud kandidaatgeenide grupid**

|   | <b>Uuritud kandidaatgeenid</b>  |
|---|---|
| Adhesioonimolekulid ja maatriksi ensüümid                                 | <i>CDH1, ICAM1, MMP2, MMP9, MUC2, MUC4</i>  |
| Apoptoos, DNA reparatsioon, onkogenees ja rakutsükli regulatsioon         | <i>AKT1, APE1, CDKN1A, CDKN1B, HOGG1, PI3KCA, TP53, XPD, XPG, XRCC1, XRCC3</i>  |
| Põletikureaktsioonid või tsütokiinid                                      | <i>C3, CTLA4, DR4/5, FCRL3, IFNG, IL10, IL16, IL18, IL1B, IL2RB, IL6, LOXL4, NFKB1, PTGS2, PTPN22, TCRB, TNFA, TNFR1, TNFR2, TNFRSF11B, TNFSF13B, TRAIL</i> |
| Steroide sünteesivad ensüümid, detoksifikatsiooni ensüümid ja retseptorid | <i>CYP17A1, CYP19A1, CYP11A1, CYP1A2, CYP2C19, GSTM1, GSTP1, PPARG</i>  |
| Östradioli metabolism   | <i>COMT, HSD17B1, HSD17B2</i>   |
| Kasvufaktorid   | <i>BNC2, FGF1, FGF2, IGF1, IGF1R, IGF2, TGFBI, VEGF</i>   |
| Immuunsüsteem   | <i>CCL21, CD40, HLA regioon, HLA-DRB1, IRF5, STAT4, TRAF1-C5, VDR</i>   |
| Teised ensüümid ja metaboolsed rajad                                      | <i>eNOS, IRS2, LHB, SERPINE</i>   |

Endometrioosi geneetilise tagapõhja tuvastamiseks on kasutatud ka ülegenoomseid assotsiatsiooniuringuid (*genome-wide association study*, GWAS). GWA uuringute korral võrreldakse SNP mikrokiibi andmeid patsientide ja tervete kontrollide vahel, et leida kas mõni SNP esineb haigust kandvate indiviidide seas sagedamini ja võiks seega olla haiguse kujunemisega seotud. Siiani on läbi viidud neli GWA uuringut (Adachi jt, 2010; Uno jt, 2010; Painter jt, 2011; Albertsen jt, 2013) ja mitmeid replikatsiooniuringuid (Pagliardini jt, 2013; Sundqvist jt, 2013; Sapkota jt, 2015) ning uuringute metaanalüüse (Nyholt jt, 2012; Rahmioglu jt, 2014; Sapkota jt, 2015). Viimane metaanalüüs, mis kaasas 11506 patsienti ja 32678 kontrolli, leidis 8 ülegenoomse olulisusega SNP-d (Tabel 2) (Rahmioglu jt, 2014; Sapkota jt, 2015). Kaheksast SNPst viis (rs12700667, rs7521902, rs1537377, rs7739264 ja rs13394619) näitasid tugevamat efekti suurust mõõduka ja raske astme endometrioosi korral. Antud metaanalüüs tõi välja mitmeid huvipakkuvaid gene nagu näiteks *WNT4*, *CDKN2BAS1*, *FNI* ja *IL1A*, mis võiksid olla seotud haiguse kujunemisega. *CDKN2BAS1* lookus osaleb mitmete tuumorsupressor geenide (*CDKN2B*, *CDKN2A*, *ARF*) regulatsioonis (Pasmant jt, 2007; Jarinova jt, 2009; Liu jt, 2009). Inaktiveerunud *CDKN2BAS1* on leitud endometrioosi ja emakakehavähi patsientidel (Goumenou jt; Martini jt, 2002; Guida jt, 2009). SNP rs7521902 lähedal paiknev geen *WNT4* kodeerib naiste suguorganite arenguks vajalikku valku, millela ei kujune välja Mülleri juha ega selle derivaadid (Vanio jt, 1999). On leitud, et

*WNT* geenid avalduvad nii kõhukelmes kui ka endomeetriumis (Gaetje jt, 2007). *FNI* ehk fibronektiin-1, kust leiti rs1250248, on seotud raku adhesiooni ja migreerumise protsessidega nagu näiteks embrüogeneesi, haavade paranemise, vere hüübimise, peremeesraku kaitsevõime ja metastaasidega (Pankov ja Yamada, 2002). *IL1A* kodeerib valku, mis kuulub tsütokiin interleukiin-1 (IL-1) perekonda ja on seotud immuunvastuse ja põletikuliste protsessidega.

**Tabel 2. Endometrioosi haigestumise riskiga seotud SNPd GWA uuringute ja replikatsioonialüüsise andmestiku metaanalüüsist (Rahmioglu jt, 2014; Sapkota jt, 2015).**

| SNP        | OR*  | Statistiline olulisus | Kromosoom | Lähim geen      |
|------------|------|-----------------------|-----------|-----------------|
| rs7521902  | 1,18 | $1,8 \times 10^{-15}$ | 1         | <i>WNT4</i>     |
| rs12700667 | 1,13 | $1,6 \times 10^{-9}$  | 7         | Intergeenne     |
| rs1537377  | 1,12 | $1,0 \times 10^{-8}$  | 9         | <i>CDKN2BAS</i> |
| rs1250248  | 1,11 | $8,0 \times 10^{-8}$  | 2         | <i>FNI</i>      |
| rs10859871 | 1,18 | $4,8 \times 10^{-15}$ | 12        | <i>VEZT</i>     |
| rs7739264  | 1,15 | $6,2 \times 10^{-10}$ | 6         | <i>ID4</i>      |
| rs13394619 | 1,13 | $2,9 \times 10^{-8}$  | 2         | <i>GREB1</i>    |
| rs6542095  | 1,15 | $8,0 \times 10^{-8}$  | 2         | <i>IL1A</i>     |

OR – odds ratio (šansside suhe)

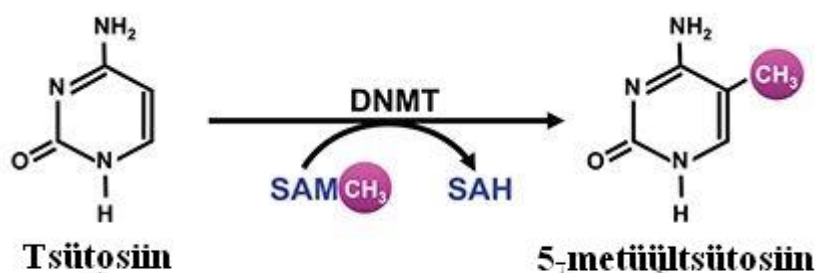
Kuigi GWA uuringud on andnud olulist infot endometrioosi kujunemist mõjutavate SNP-de kohta, on haigusega seostatud SNPde efekti suurused jäänud siiski keskpärasteks ning lisaks pole need variandid ka väga head molekulaarsed markerid otsesteks diagnostilisteks testideks (Visscher jt, 2012). Kuna ülegenoomsete uuringute panus haiguse põhjuste tuvastamisel on jäänud tagasihoidlikuks, on endometrioosi uuringud asunud otsima haiguse epigeneetilist tagapõhja. Huviorbiiti on tõusnud eelkõige DNA metülatsiooni muutused, mida on asunud otsima nii endometrioosi haigete endomeetriumitest kui endometrioosi kolletest.

## 1.1.5 DNA metülatsioon

### 1.1.5.1 DNA metülatsiooni olemus

Epigeneetika uurib muutusi geneetilises materjalis, mis mõjutavad geeni ekspressiooni, jättes seejuures DNA järjestuse muutmata (Wolffe ja Matzke, 1999). Üheks enim uuritud epigeneetiliseks modifikatsiooniks on DNA metülatsioon ehk DNA metüülimine. DNA metülatsiooni puhul on tegemist biokeemilise protsessiga, mille korral adeniini või tsütosiini

nukleotiidile lisatakse metüülgrupp (-CH<sub>3</sub>). Eukarüootides on levinum tsütosiini modifikatsioon, mille korral on metüülrühm lisatud tsütosiini pürimidiini 5' süsinikule (Joonis 3). Protsessi viivad läbi C5-DNA metüültransferaasid (DNMT-d) ja nende töö tulemusel tekib 5-metüültsütosiin (5mC) (Jeltsch, 2006; Razin ja Chedar, 1977). Metüülatsiooni viivad läbi kolm põhilist metüültransferaasi: DNMT1, DNMT3A ja DNMT3B. DNMT1 ehk „säilitamise“ metüültransferaas metüleerib eelkõige hemi- ehk poolmetüleeritud DNAd, mille üks ahel on eelnevalt metüleeritud (Okano jt, 1998). DNMT3A ja DNMT3B ehk „de novo“ metüültransferaasid metüleerivad eelnevalt metüleerimata saite ja hemimetüleeritud DNA-d (Okano jt, 1998). Nad on eriti olulised metüülatsiooni musterite loomisel varajases arengus. Samas on leitud, et lisaks DNMT1-le on ka DNMT3A ja DNMT3B võimelised osalema metüülatsiooni musterite säilitamisel (Jones ja Liang, 2009) ning kõik DNMT-d on vajalikud embrüonaalse arengu käigus (Bestor jt, 1992).



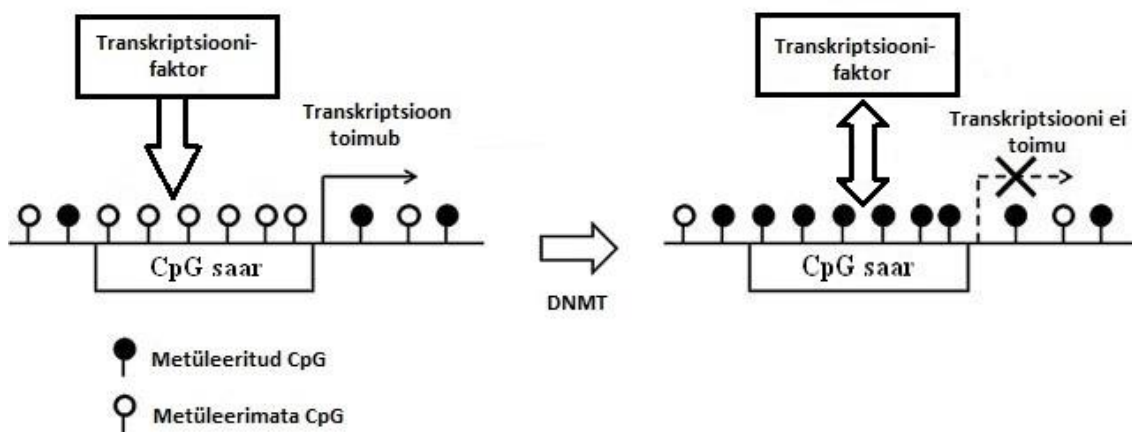
**Joonis 3. DNA metüülatsiooni skeem.** Tsütosiinile lisatakse metüülgrupp, mille tulemusena tekib 5-metüültsütosiin. Metüülgrupi doonoriks on SAM ehk S-adenosüülmetioniin, metüülatsiooni tagajärjel tekib lisaks 5-metüültsütosiinile ka SAH ehk S-adenosüül-L-homotsüsteiin. Reaktsiooni viivad läbi DNA metüültransferaasid ehk DNMT-d (muudetud <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/6-16.htm>).

Imetajatel toimub DNA metüülatsioon põhiliselt siis, kui C nukleotiidile järgneb nukleotiid G. Need alad on tuntud kui CpG saidid, mida on hajusalt inimese haploidses genoomis umbkaudselt 28 miljonit (Jaffe jt, 2012; Rakyán jt, 2011). CpG sait võib olla kas täielikult metüleeritud, poolmetüleeritud või metüleerimata. Metüleerituse tase võib sõltuda nii kromosoomi piirkonnast, raku tüübist, arengustaadiumist kui ka alleeli päritolust (Reinius, 2012). Inimesel on umbkaudselt 70-80% CpG saitidest metüleeritud (Bock, 2012). Esineb ka 500-2000 nukleotiidilisi piirkondi, mis on ülejäänud genoomiga võrreldes CpG saitide rikkamad. Neid alasid nimetatakse CpG saarekesteks (*CpG islands*, CGI) (Ng ja Bird, 1999).

Arvatakse, et need saarekesed on olemas rohkem kui pooltes selgroogsete geenides. Inimese genoomis on selliseid saarekesi umbes 30000. CpG saarekesed võivad paikneda nii transkriptsiooni algussaidi (*transcription start site*, TSS) läheduses kui ka geeni sees. TSSi läheduses paiknevad CpG saarekesed pole tavaliselt metüleeritud (Jones, 2012). Metülatsiooni taseme osas varieeruvad on saarekeste kõrval paiknevad CpG-kaldad, mille CpG saitide tihedus on võrreldes CpG saartega väiksem (Irizarry jt, 2009). Ühe CpG saidi tasandil esinevat metülatsiooni varieeruvust kirjeldatakse terminiga metülatsiooni suhtes varieeruv positsioon (*methylation variable position*, MVP), mis on võrreldav geneetikas SNP-ga (Rakyan jt, 2011). Kui metülatsioon on muutunud mitmes kõrvuti paiknevas CpG saidis, siis nimetatakse seda piirkonda erinevalt metüleeritud regiooniks (*differentially methylated region*, DMR). DMR-id on tavaliselt alla 1000 nukleotiidi pikkused, kuid leidub regioone, mis on üle miljoni aluspaari pikad (Frigola jt, 2006).

### **1.1.5.2 DNA metülatsiooni bioloogiline olulisus**

DNA metülatsioon ning metülatsioonimustrite muutused on olulised organismi normaalses arengus ning rakkude diferentseerumisel. Lisaks on DNA metülatsioonil oluline roll koespetsiifiliste geenide avaldumisel (De Smet jt, 1999) ning geeniekspressiooni reguleerimisel. Näiteks mõjutab geeniekspressiooni see, kus paikneb metüleeritud regioon. Kui transkriptsiooni algussaidi vahetusläheduses on CpG-d metüleeritud, siis toimub transkriptsiooni initsiatsiooni blokeerimine. Samas kui metüleeritud CpG saidid paiknevad geeni sees promooterregioonist eemal, siis võib blokeerimise asemel hoopis toimuda transkriptsiooni elongatsiooni etapi stimuleerimine (Jones, 2012). Transkriptsiooni blokeerimine toimub peamiselt kahe meetodi abil: esiteks takistab tsütosiinile lisatud metüülrühm otseselt transkriptsioonifaktorite seondumist (Joonis 4; Comb ja Goodman, 1990) ja teiseks kutsub DNA metüleerimine esile geeniekspressiooni vaigistamist vahendavate valkude seondumist (Tate ja Bird, 1993). Näiteks vahendab metüleeritud CpGd siduv valk 2 (MeCP2) histoone modifitseerivate ensüümide, nagu näiteks histooni deatsetülaasi (HDAC) kompleksi seondumist, mille tulemusel muutub kromatiini struktuuri suletuks ja geeniekspressioon vaigistatakse, sest transkriptsioonifaktorite juurdepääs on takistatud (Nan jt, 1998).



**Joonis 4. DNA metülatsioon ja transkriptsiooni regulatsioon.** DNA metülatsioonil lisatakse metüültransferaaside (DNMT-de) abil CpG dinukleotiidi tsütosiinile metüülgrupp. Kui CpG saar on metüleeritud, siis transkriptsioonifaktorite seondumine DNAle on takistatud ja geeni transkriptsioon on inhibeeritud. Kui CpG saar pole metüleeritud, siis saavad transkriptsiooni faktorid seonduda ning transkriptsioon toimuda (muudetud Nasu jt, 2011).

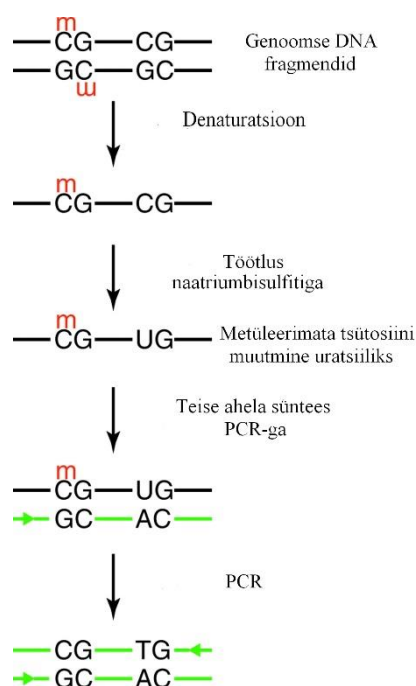
DNA metülatsioon on oluline erinevates bioloogilistes protsessides nagu näiteks transponeerivate elementide vaigistamisel (Bestor, 1998), tüvirakkude diferentseerumisel (Meissner, 2010), embrüonaalse arengul (Reik, 2010), genoomsel imprintingul (Barlow, 2011), kroonilise põletiku tekkel (Martin ja Herceg, 2012) ning X kromosoomi inaktiveerimisel (Hellmann jt, 2007).

On leitud, et metülatsioonimustri muutused võivad mõjutada erinevate haiguste, nagu näiteks vähkkasvajate ning autoimmuunsushaiguste kujunemist (Fraga, 2005; Javierre, 2009). Kasvajate puhul on avastatud, et nende metülatsioonimuster on muutunud võrreldes normaalsete sama koe rakkude DNA metülatsioonimustriga (Feber jt, 2011). Lisaks on metülatsioonimustri muutuseid avastatud ka diabeedi, skisofreenia ja hulgiskleroosi puhul (Rakyan jt, 2008).

### 1.1.5.3 DNA metülatsiooni uurimise meetodid

DNA metülatsiooni uurimine on keeruline, sest erinevalt genoomist, mida on inimesel üks, võib epigenoome olla mitmeid olenevalt koetüübist ja organismi arengufaasist ning need võivad olla ajas muutuvad. Lisaks on raske määrata, kas muutunud metülatsioonimustri profiil on tekkinud haiguse tagajärjel või põhjustab haigust (Rakyan jt, 2011). Metülatsiooni

taset genoomis saab hinnata, kas mõõtes metüleerituse hulka üldiselt või lookusspetsiifiliselt, mida omakorda saab hinnata vaadates kogu genoomi või kandidaatgeene. Lookusspetsiifiliselt kandidaatgeenide metülatsiooni taset hinnatakse näiteks metülatsioonitundliku PCR-i abil, mille puhul kasutatakse naatriumbisulfiti töötlusega DNA-d (Joonis 5). Töötluse tulemusel muutuvad metüleerimata C nukleotiidid U-deks, metüleeritud C-d püsivad aga muutumatuks (Frommer jt, 1992). Bisulfiti töötluse puudujäägiks on see, et meetod ei tee vahet 5-metüültsütosiinil ja hiljuti DNA-s avastatud 5-hüdroksümetüültsütosiinil. Täpsema tulemuse saamiseks kasutatakse bisulfiti sekveneerimist, mille abil saab kvantitatiivselt mõõta metüleeritud ja metüleerimata C-de hulka.



**Joonis 5. Naatriumbisulfiti töötlus.** DNA denatureeritakse ning töödeldakse seejärel naatriumbisulfitiga, mille tulemusel muudetakse metüleerimata tsütosiinid (C) uratsiilideks (U). PCR-i käigus muudetakse uratsiilid tümiinideks samal ajal kui metüleeritud tsütosiinid jäävad muutmata. Bisulfiti töötluse järgse järgselt pole DNA ahelad enam komplementaarsed ning PCR-il kasutatavad praimerid on disainitud nii, et saaks hinnata ühe kindla ahela metülatsiooni staatust (muudetud Zilberman ja Henikoff, 2007).

Ülegenoomseteks lookusspetsiifilisteks uuringuteks kasutatakse nii meetodeid, mis põhinevad kiipidel kui meetodeid, mis kiipe ei vaja. Kiipidel põhinevate meetodite puhul kasutatakse DNA eeltöötluks tavaliselt kas metülatsioonitundlikke restriksiooniensüüme,

metüültundlike antikehadega või valkudega rikastamist või juba eelnevalt mainitud töötlust naatriumbisulfitiga. Metülatsiooni tundlikud restriksioonilised endonukleaasid ehk restriктаasid suudavad eristada metüleeritud ja metüleerimata DNA-d ning lõigata seda sait-spetsiifiliselt. Olenevalt sellest, millist restriksiooni ensüümi kasutatakse, jääb vaid üht tüüpi DNA (metüleeritud või metüleerimata) restriктаaside poolt lõikamata, mistõttu on seda võimalik hiljem eristada. Metüültundlike antikehade või valkudega rikastamise puhul kasutatakse 5-metüülsütosiini vastaseid antikehasid ja valke, et eraldada metüleeritud DNA metüleerimata DNA-st. Metülatsioonikiibid, mis on näiteks Illumina või Affymetrix poolt toodetud, võimaldavad metülatsioonitaset määrata kogu genoomi ulatuses suhteliselt kiiresti. Illumina Infinium tehnoloogia puhul on mikrokiibi abil võimalik mõõta CpG metüleeritust kasutades kahte erinevat oligonukleotiidide disaini (Infinium I ja Infinium II), mis tunnevad ära kas metüleeritud või metüleerimata lookuse (Illumina Inc). CpG saidi metülatsioonitaseme väljendamiseks kasutatakse beeta väärtust, mille leidmiseks võrreldakse kahe alleeli fluorestsentssignaali intensiivsuste suhet (Bibikova jt, 2011).

Samas täpsema ülegenoomse tulemuse annab siiski bisulfit sekveneerimine, mille korral bisulfit töötusega DNA sekveneeritakse teise põlvkonna sekveneerimise abil ning analüüsitakse CpG saitide metülatsiooni taset aluspaarilise täpsusega kogu genoomi ulatuses (Lister jt, 2009). Lisaks on selle abil võimalik täpsemini kaardistada metülatsiooni erinevat tüüpi kordusjärjestustes, mis on keeruline mikrokiipidel põhinevate tehnoloogiatega. Probleemiks on aga sekveneerimise ajamahukus.

## 2. Uurimus

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli:

- 1) Anda ülevaade endometriooosi DNA metülatsiooni uuringutest.
- 2) Analüüsida, kas ja kuidas võiksid muutused metülatsioonimustris olla seotud endometriooosi kujunemisega.

### 2.2 Materjal ja metoodika

Referatiivseks uurimistööks kasutati põhiliselt PubMed andmebaasi. Kasutatud artiklite avaldamisperiood oli detsember 2002 kuni aprill 2016. Kasutati ainult inglisekeelseid artikleid. Märksõnad, mille järgi artikleid otsiti, olid „endometriosis“ eraldi ning kombineeritult sõnadega „candidate gene studies,“ „diagnosis,“ „DNA methylation,“ „endocrine disrupting chemicals,“ „environmental factors,“ „epidemiology,“ „epigenetics,“ „genetics,“ „GWAS,“ „hormonal factors,“ „immunology,“ „linkage studies,“ „microarray,“ ja „pathogenesis“.

Erinevate geenide funktsiooni leidmiseks kasutati NCBI Gene ning ka PubMed andmebaasi, kuhu sisestati ülegenoomsetes metülatsiooniuuringutes kattunud geenide nimesid koos sõnaga „function“ ning ka ilma selleta. DNA metülatsiooni uuringute andmete ühisosa leidmiseks kasutati Venni diagrammi (Heberle jt, 2015).

### 2.3 Tulemused

#### 2.3.1 Kandidaatgeenidel põhinevad DNA metülatsiooni uuringud

Esimesed endometriooosi kandidaatgeenidel põhinevaid DNA metülatsiooniuuringud pärinevad juba aastast 2005 ning nüüdseks on vaadeldud juba seitsmeteistkümne erineva geeni DNA metülatsiooni (Tabel 3). Enim uuritud geenide hulka kuuluvad *HOXA10*, steroidifaktor 1 ehk *SF-1 (NR5A1)*, ensüümi tsüklooksügenaas 2 kodeeriv *COX-2*, progesterooni retseptori isoformi *PR-B* kodeeriv geen *PR* ning östrogeeni retseptorit *ER-β* kodeeriv geen *ESR2*.

**Tabel 3. Endometriooosi kandidaatgeenidel põhinevad DNA metülatsiooni uuringud.**

| <b>Geen</b>                           | <b>Metüleeritus</b> | <b>Erinevalt metüleeritud kude</b>  | <b>Viide</b>   |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--|
| <i>CDH1</i>                           | Hüpermetülatsioon   | Endomeetrium<br>Endometriooosikolle | Li jt, 2016  |
| <i>HOXA10</i>                         | Hüpometülatsioon    | Endomeetrium                        | Kulp jt, 2016  |
|                                       | Hüpermetülatsioon   | Endomeetrium                        | Fambrini jt, 2013;<br>Szczepańska jt, 2010;<br>Wu jt, 2005 |
|                                       |                     | Endomeetriumi strooma               | Lu jt, 2013  |
|                                       |                     | Endometriooosikolle                 | Andersson jt, 2014   |
| <i>COX-2</i>                          | Hüpometülatsioon    | Endometriooosikolle                 | Zidan jt, 2015   |
|                                       |                     | Endomeetrium                        | Wang jt, 2012  |
| <i>LINE-1</i>                         | Hüpometülatsioon    | Endometriooosikolle                 | Senhthong jt, 2014   |
| <i>RUNX3</i>                          | Hüpermetülatsioon   | Endometriooosikolle                 | Guo jt, 2014   |
| <i>RASSF2</i>                         | Hüpermetülatsioon   | Endometriooosikolle                 | Ren jt, 2014   |
| <i>ESR1</i>                           | -                   | Endometriooosikolle                 | Meyer jt, 2014   |
| <i>ESR2</i>                           | -                   | Endometriooosikolle                 | Meyer jt, 2014   |
|                                       | Hüpometülatsioon    | Endometriooosikolde strooma         | Xue jt, 2007   |
| <i>SF-1</i><br>( <i>NR5A1</i> )       | Hüpermetülatsioon   | Endometriooosikolde strooma         | Xue jt, 2014; Xue jt, 2011                                 |
|                                       | Hüpometülatsioon    | Endometriooosikolde strooma         | Xue jt, 2007   |
| <i>HOXA11</i>                         | Hüpermetülatsioon   | Endomeetrium                        | Szczepańska jt, 2012                                       |
| <i>hMLH1</i>                          | Hüpermetülatsioon   | Endometriooosikolle                 | Martini jt, 2002   |
| <i>CYP-19</i><br>( <i>aromataas</i> ) | Hüpometülatsioon    | Endometriooosikolde stroomarakud    | Izawa jt, 2011   |
| <i>ERVW-1</i>                         | Hüpometülatsioon    | Endometriooosikolle                 | Zhou jt, 2014  |
| <i>PAX-2</i>                          | -                   | Endometriooosikolle                 | De Graaff jt, 2012   |
| <i>PR (PR-<math>\alpha</math>)</i>    | -                   | Endomeetrium<br>Endometriooosikolle | Wu jt, 2006  |
| <i>PR (PR-<math>\beta</math>)</i>     | Hüpermetülatsioon   | Endometriooosikolle                 | Meyer jt, 2014; Wu jt, 2006                                |
| <i>DUSP2</i>                          | -                   | Endometriooosikolde stroomarakud    | Wu jt, 2011  |

*HOXA10* ehk *homeobox A10* on transkriptsioonifaktor, mille metülatsioon on endometrioosi korral kõige sagedamini uuritud (Kulp jt, 2016; Andersson jt, 2014; Lu jt, 2013; Fambrini jt, 2013; Szczepańska jt, 2010; Wu jt, 2005). *HOXA10* ekspresseerub endomeetriumis ning on oluline endomeetriumi kasvamisel, diferentseerumisel ning embrüo implantatsiooni ajal endomeetriumi retseptiivseks muutumisel (Zanatta jt, 2010). *HOXA10* ekspressioon on endomeetriumis stimuleeritud östrogeeni ja progesterooni poolt ning antud geeni ekspressioon tõuseb menstruaaltsükli kesksekretoorses faasis (Eun Kwon ja Taylor, 2004). *HOXA10* olulisust endometrioosi patogeneesis hakati lähemalt uurima siis, kui avastati, et haigetel naistel ekspresseeritakse sekretoorses faasis vähem *HOXA10* võrreldes kontrollidega. *HOXA10* ekspressiooni languse tagajärjel väheneb endomeetriumi retseptiivsuseks vajalike geenide ekspressioon ning seeläbi võib endometrioosiga naistel kujuneda viljatus (Szczepańska jt, 2010). *HOXA10* hüpermetülatsioon promooterpiirkonnas võib viia geeniekspressiooni vähenemiseni, mis omakorda võiks seletada endometrioosihaigete vähenenud viljakust. Kuigi viimane kandidaatgeeni metülatsiooni uuring näitas *HOXA10* geeni promooterregioonis paiknevate CpG saitide ning ka intronite piirkonnas paiknevate CpG saarte hüpometylatsiooni endometrioosiga naiste endomeetriumis (Kulp jt, 2016), on siiski kõik teised tulemused leidnud, et *HOXA10* geen on endomeetriumis ja kolletes hüpermetüleeritud.

Mitmed uuringud vaatlesid ka *NR5A1* geeni, mis kodeerib *SF-1* ehk steroidofaktor 1. See on oluline transkriptsioonifaktor, mis mängib rolli steroidogeense akuutse regulatoorse valgu ehk *STAR*-i ja aromataasi kodeeriva *CYP19A1* aktiveerimisel, mis omakorda on seotud östrogeeni sünteesiga. *SF-1* tase on märkimisväärselt suurem endometrioosikolde stroomarakkudes võrreldes normaalse endomeetriumiga. Xue jt, 2007 uuringus leiti, et endometrioosikolletes oli *SF-1* promooterpiirkonnas paiknev CpG saar hüpometylatsioon ning tervete naiste endomeetriumis hüpermetüleeritud. Kaks *SF-1* uuringut (Xue jt, 2011; Xue jt, 2014) on avastanud, et CpG saar, mis ulatub *SF-1* ekson II-st kuni intron III-ni, on endometrioosikolletes hüpermetüleeritud. Endometrioosikoldes toimuv promootoris paikneva CpG saare hüpometylatsioon ning promooterist kaugemal asuva CpG hüpermetülatsioon võib *SF-1* ekspressiooni võimendada. Kuna *SF-1* on ka aromataasi sünteesi aktiveerija, siis võimaldaksid nende kolme uuringu leiud täpsemalt seletada, miks on kolletes aromataasi süntees suurenenud.

Kuna endometrioosi peetakse hormoonsõltuvaks haiguseks ning endometrioosikolletes on näidatud suurenenud vastuvõtlikkust östrogeenile ja suurenenud *ER-β* retseptorite hulka (Brandenberger jt, 1999), siis on ka rohkem uuritud *ESR2* metülatsiooni (Meyer jt, 2014; Xue jt, 2007). *ESR2* kodeerib östrogeeni retseptorit  $\beta$  ehk *ER-β*, mis seondab bioloogiliselt aktiivset östrogeeni ehk östradiooli ja seeläbi saavad östrogeeniga seotud funktsioonid avalduda. Uuring, kus võrreldi omavahel haigete naiste endometrioosikolde stroomat ja tervete naiste endomeetriumi stroomat, näitas *ER-β* hüprometülatsiooni (Xue jt, 2007), mis võimaldaks seletada östrogeeni retseptoreid kodeeriva geeni *ESR2* suurenenud ekspressiooni ning seeläbi retseptorite hulga kasvu ja vastuvõtlikkuse suurenemist endometrioosikolletes. Samas Meyer jt, 2014, kes võrdlesid endometrioosikollet endomeetriumi, ei suutnud *ESR2* metülatsiooni muutust leida.

Samuti on uuritud *PR-β* promooteri metülatsioonitaset endometrioosikolletes (Wu jt, 2006; Meyer jt, 2014). *PR-β* on isovorm, mis on kodeeritud geeni *PR* poolt ja selle ekspressioon on endometrioosikolletes vähenenud, mistõttu on vähenenud ka progesterooni retseptorite hulk, mis võib omakorda põhjustada endometrioosile omast progesterooni resistentsust. Kandidaatgeenide uuringutes on leitud, et *PR-B* promototerregioon on hüpermetüleeritud, mis võiks seletada *PR-β* retseptorite hulga vähenemist ja seeläbi tekkinud kollete progesterooni resistentsust endometrioosi haigetel patsientidel.

Geeniekspressiooni uuringud on näidanud, et *COX-2* on endometrioosikolletes üleekspressioonitud ning on leitud, et selle hulk korreleerub patsientide valu tugevusega ning on seotud ka haiguse taastekkega pärast kollete kirurgilist eemaldamist (Ota jt, 2001; Matsuzaki jt, 2004; Buchweitz jt, 2006). Kandidaatgeenide metülatsiooniuringud on leidnud, et eutoopilises endomeetriumis ja endometrioosikolletes on *COX-2* promototerregioon hüprometüleeritud. Sellega seoses on näidatud samades kudedes ka *COX-2* mRNA hulga kasvu (Wang jt, 2012; Zidan jt, 2015). *COX-2* ekspressioonitasemete muutused on seotud prostaglandiini  $E_2$  üleliigse tootmisega, mis omakorda suurendab endometrioosihagetel aromataasi sünteesi aktiivsust ja seeläbi östrogeeni hulka.

Üheks oluliseks geeniks on ka *CYP-19* ehk aromataas, mida ennast pole küll kandidaatgeenide metülatsiooni uuringutes palju uuritud, kuid mille ekspressiooni võivad mõjutada teised kandidaatgeenide uuringutes kajastatud erinevalt metüleeritud geenid. Sellel on oluline roll androgeeni muutmisel östrogeeniks (Simpson jt, 1994) ja seda peetakse endometrioosikolletes üheks olulisemaks hüperöstrogeense keskkonna kujundajaks. Tervete

naiste endomeetriumis aromataasi ekspressiooni kirjeldatud ei ole (Kitawaki jt, 1997), küll on aga endometriosisiga naiste endomeetriumis ja endometriosisikolletes näidatud aromataasi ekspressiooni. Aromataasi ekson II puhul on uuring näidanud CpG saarte hüpometüleeritust endometriosisikolletes ja hüpermetüleeritust tervete naiste endomeetriumis (Izawa jt, 2011). Aromataasi hüpometülatsiooni tõttu võib selle ekspressioon olla endometriosisikolletes suurem ja see omakorda võib mõjutada östrogeeni kontsentratsiooni kasvu kolletes.

### 2.3.2 Ülegenoomsed DNA metülatsiooni uuringud

Ülegenoomsed metülatsiooni uuringud on paljulubavaks viisiks endometriosisile omase epigeneetilise mustri tuvastamisel. Siiani on läbiviidud viis ülegenoomst DNA metülatsiooni uuringut (Borghese jt, 2010; Dyson jt, 2014; Naqvi jt, 2014; Yamagata jt, 2014; Saare jt, 2016). Erinevad tööd on keskendunud erinevatele koetüüpidele. Uuritud on võrdlevalt tervete ja endometriosisiga naiste endomeetriumeid, võrreldud omavahel endometriosisikoldeid ja endomeetriumeid ning kolletest ja endomeetriumitest pärinevaid endometriaalseid stroomarakke. Ülegenoomsetes metülatsiooni uuringutes kasutatud kiibid ning patsientide ja kontrollide hulk on toodud välja tabelis (Tabel 4).

**Tabel 4. Endometriosisi ülegenoomsed metülatsiooni uuringud.**

| Patsiendid (n)      | Kontrollid (n) | Kiip   | Viide             |
|---------------------|----------------|--|-------------------|
| 7 (EN)              | 6 (E)          | Illumina Infinium<br>HumanMethylation27 Assay    | Naqvi jt, 2014    |
| 31 (EN)             | 24 (E)         | Infinium<br>HumanMethylation450<br>Beadchip      | Saare jt, 2016    |
| 15 (L)              | 20 (E)         | Affymetrix GeneChip<br>Human Promoter 1.0R Array | Borghese jt, 2010 |
| 6 (LSC)             | 6 (ESC)        | Infinium<br>HumanMethylation450<br>beadchip      | Dyson jt, 2014    |
| 3 (LSC)<br>3 (ENSC) | 3 (ESC)        | HumanMethylation27<br>BeadChip                   | Yamagata jt, 2014 |

E – tervete naiste endomeetrium, EN – endometriosisiga naiste endomeetrium, L – endometriosisikolde, SC – stroomarakud, ESC – tervete naiste endomeetriumi stroomarakud, LSC – kolde stroomarakud, ENSC – endometriosisiga naiste endomeetriumi stroomarakud

### 2.3.2.1 Endomeetriumi DNA metülatsiooni uuringud

Endometrioosiga naiste endomeetriumi DNA metülatsiooniprofiile on vaadeldud kahes töös (Naqvi jt, 2014; Saare jt, 2016). Naqvi jt, 2014 töös võrreldi tervete ning endometrioosi haigete naiste endomeetriumi. Metülatsioonikiibi abil uuriti 27578 CpG saidi metülatsiooniprofiile ning leiti 120 geeni, mille metülatsioonitase oli statistiliselt oluliselt muutunud. Neist 59 olid hüpermetüleeritud ja 61 hüpometüleeritud. qRT-PCR abil kontrolliti ka seda, et kas on muutunud nende geenide ekspressiooni tase. Oma töös valisid nad neist geenidest välja 10, mille rolli varasemalt ei olnud endometrioosiga näidatud ning mida on seostatud põletikuga ning apoptoosi protsessidega seotud radadega. Leiti, et *MGMT*, *DUSP22*, *CDCA2*, *ID2* ja *RBBP7* olid hüpermetüleeritud ning *BMPR1B*, *TNFRSF1B*, *ZNF681*, *IGSF21* ja *TP73* hüpometüleeritud. Samuti näitasid nad, et hüpermetüleeritud geenide *MGMT*, *DUSP22*, *CDCA2* ja *ID2* mRNAde tasemed olid endometrioosiga patsientide endomeetriumis oluliselt vähenenud. Hüpometüleeritud geenide ekspressioon oli küll üldiselt suurenenud, kuid mitte nii palju, et see oleks statistiliselt oluline. Statistiliselt oli oluline vaid *ZNF681* ekspressiooni suurenemine ning hüpometüleeritud *IGSF21* ekspressiooni vähenemine. Toodi esile ka *HOXA10* ekspressiooni vähenemist ning hüpermetülatsiooni, kuid antud tulemused ei olnud siiski statistiliselt olulised, sest metülatsiooni taseme muutus jäi väiksemaks autorite enda poolt määratud olulisuse lävendist.

Saare jt, 2016 töös leiti, et olulist erinevust haigete ning tervete kontrollide endomeetriumi metülatsiooni profiilides ei ole, küll aga näidati, et endomeetriumi metülatsiooniprofiil oli mõjutatud menstruaaltsükli faasidest. Kui menstruaaltsükli arvesse ei võetud, leiti töös vaid 28 erinevalt metüleeritud regiooni, mis olid seotud 16 geeniga: *PI3*, *SLC43A3*, *MGAT5B*, *MUC4*, *HIVEP3*, *FGG*, *CLCF1*, *CANT1*, *LTK*, *AHRR*, *AKR1B1*, *APEH*, *CST11*, *ELOVL4*, *HBE1*, *NEGR1*. Siiski tuleb mainida, et enamuse leitud erinevalt metüleeritud geenide metülatsioonitasemete muutused olid väga tagasihoidlikud ja mitmete geenide (*PI3*, *SLC43A3*, *MGAT5B*, *MUC4*, *HIVEP3*, *FGG*, *CANT1*, *LTK*) metülatsioon oli mõjutatud menstruaaltsüklist. Autorite arvates on siiani ebaselge, kuidas väikesed muutused DNA metülatsioonis võiksid muuta geeniekspressiooni ja olla olulised haiguse kujunemises.

### 2.3.2.2 Endometrioosikollete DNA metülatsiooni uuring

Endometrioosiga naiste endometrioosikollete DNA metülatsiooniprofiili on määratud vaid ühes uuringus (Borghese jt, 2010). Borghese jt, 2010 poolt läbi viidud uuring oli kõige

esimene ülegenoomne metülatsiooni analüüs, millega uuriti rohkem kui 25000 promooteri metülatsiooni. Antud uuringus määrati DNA metüleeritus erinevatest endometrioosikollete tüüpidest (nagu endometrioomid, süvaendometrioos, pindmine endometrioos) ja endomeetriumi moodustatud DNA segudes. Töös leiti, et hüpermetüleeritud regioonid paiknevad pigem kromosoomide otstes ning hüpometüleeritud regioonid paiknevad üle kogu kromosoomi. Uuringus võrreldi omavahel erinevat alatüüpi endometrioosi tervete naiste endomeetriumi ja ning leiti, et pindmise kõhuõõne endometrioosi puhul esines 229 erinevalt metüleeritud regiooni, munasarja endometrioosi puhul 161 ja süva-endometrioosi puhul oli neid regioone 108. Kui vaadeldi kõiki kollete alatüüpe korraga, siis leiti 20 regiooni, mis olid muutunud metülatsiooniga (*FLJ38379*, *DEFB125*, *GOLGB1*, *PERP*, *NOM1*, *CNTLN*, *RASSF4*, *C10orf25*, *ZNF22*, *HRAS*, *LRRC56*, *F7*, *DKFZp451A211*, *ADPRHL1*, *TPSD1*, *PYDC1*, *TEX14*, *RAD51C*, *RNF126*, *FSTL3*, *FTHL19*) ning nendest regioonidest olid 11 hüpometüleeritud. Siiski leidsid autorid, et vastavalt korrelatsioonianalüüsile üldine metülatsioonitase endometrioosi erinevate alamtüüpide ja endomeetriumi vahel ei erinenud, seega sai taaskord kinnitust see, et endomeetrium ja endometrioosikolle on sama päritolu.

### **2.3.2.3 Endometrioosikolde ja endomeetriumi stroomarakkude DNA metülatsiooni uuringud**

Lisaks endomeetriumi ja kollete DNA metülatsiooni uuringutele on vaadeldud ka muutusi endometrioosikolletest ja endomeetriumi eraldatud ning *in vitro* kasvatatud endometriaalsetest stroomarakkudes. Dyson jt, 2014 töös uuriti kuue endometrioosiga naise kolletest ja kuue terve naise endomeetriumi pärinevaid stroomarakke ning leiti 42248 erinevalt metüleeritud CpG-d, mille hulgas olid 403 geeni statistiliselt oluliselt muutunud metülatsiooni profiiliga. Nende hulgas oli palju transkriptsioonifaktoreid ja geene, mis on juba teadaolevalt seotud endomeetriumi detsidualisatsiooni ja endometrioosi patofüsioloogiaga. Nad uurisid lähemalt *GATA2* ja *GATA6* geene ning leidsid, et endometrioosikolletes on *GATA2* hüpermetüleeritud ja allasurutud ning *GATA6* on hüpometüleeritud ja rohkelt ekspresseerunud. *GATA6* on mitmete steroidogeensete ensüümide, nagu näiteks aromataasi, oluline regulaator (Lavoie ja King, 2009). Autorid leidsid, et *GATA6* suurendab *NR5A1* (SF-1) ja *CYP19A1* (aromataas) ekspressiooni endomeetriumis ning *GATA2* toimib endometrioosikolde *GATA6* ja *CYP19A1* antagonistina. Samas ei ole teada, miks *GATA6* endometrioosikolde avaldub. *GATA*

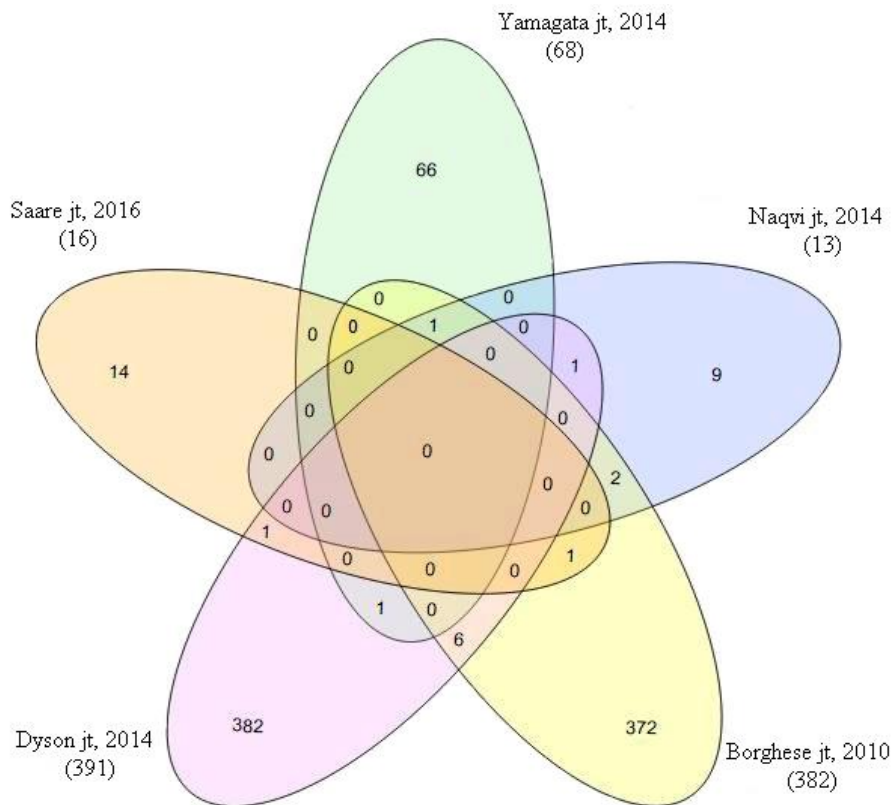
perekonna metüleerituse häired korreleeruvad *GATA* geenide ekspressiooni muutustega ning võivad mõjutada haiguse kulgu ja aromataasi ekspressiooni häireid.

Yamagata jt, 2014 töös võrreldi *in vitro* kasvatatud endomeetriumi stroomarakkude profiile endometriosisita (n=3) ja endometriosisiga (n=3) naistel ning lisaks võrreldi kontrollidega ka haigete endomeetriumi kolde strooma (n=3) metülatsiooni profiile. Endomeetriumite omavahelises võrdluses leiti vaid mõned oluliselt erinevalt metüleeritud geenid. Ainult 9 CpGd olid haigete naiste endomeetriumis hüpometüleeritud ning 6 CpGd hüpermetüleeritud. Kui võrreldi koldeid tervete naiste endomeetriumitega, leiti kolletes 368 hüper- ning 515 hüpometüleeritud CpGd. Need paiknesid vastavalt 329-s ja 441-s geenis. Analüüsi tulemusel jõuti järeldusele, et kolletel on omane neile spetsiifilise metülatsiooni profiili olemasolu. Yamagata jt, 2014 töös kinnitati ka kandidaatgeenide uuringus (Xue jt, 2007) leitud tulemust, et *SF-1* promooterregioon on endometriosisikollete stroomarakkudes hüpometüleeritud võrreldes endomeetriumi stroomarakkudega.

#### **2.3.2.4 Ülegenoomsete DNA metülatsiooni uuringute omavaheline võrdlus**

Selleks, et leida seni läbiviidud ülegenoomsete DNA metülatsiooni uuringute ühisosa ja välja selgitada geene, mis võiksid olla olulised haiguse kujunemisel, võrdlesin omavahel erinevaid uuringuid kasutades Venn diagrammi (Heberle jt, 2015, joonis 6).

Kuna erinevad publikatsioonid ja nende lisad ei sisaldanud alati täielikke erinevalt metüleeritud geenide nimekirja, siis kasutati Venn diagrammi loomiseks saadaolevaid andmeid järgnevalt: Yamagata jt, 2014 tööst kaasati nimekirjad geenidest, mis olid erinevalt ekspresseerunud ning erineva metülatsioonitasemega, Naqvi jt, 2014 tööst vaid artiklis väljatoodud 13 erinevalt metüleeritud geeni, Borghese jt, 2010 tööst kõik erinevalt metüleerunud piirkondadega seotud geenid sõltumata endometriosisi alatüübist ning Saare jt, 2016 ja Dyson jt, 2014 uuringutest kõik erinevalt metüleeritud regioonidega seotud geenid.



**Joonis 6. Venn diagramm ülegenoomsete metülatsiooni uuringute tulemustest (tarkvara Heberle jt, 2015).**

Venn diagrammi põhjal endometriosisiga naiste endomeetriumi DNA metülatsiooni uuringutes (Saare jt, 2016; Naqvi jt, 2014) ühisosa puudus, ning ühtegi ühist erinevalt metüleeritud geeni neis kahes uuringus ei leitud. Kui võrreldi omavahel Naqvi jt, 2014 poolt läbiviidud endomeetriumi töö tulemusi endometriosisikollet uurinud töö tulemustega (Borghese jt, 2010), leiti kolm geeni, mis olid muutunud metülatsiooni profiiliga: *MAFB*, *HOXD11* ja *HOXD10*. Viimane neist tuvastati ka endomeetriumi stroomarakke uurinud töös (Yamagata jt, 2014). Saare jt, 2016 töös kattus Borghese jt, 2010 tööga üks geen, milleks oli *APEH*. Geen *APEH* kodeerib atsüülpeptiidi hüdrolaasi ensüümi ning selle geeni deletsioone on seostatud kartsinoomidega. Geenid *MAFB*, *HOXD10* ja *HOXD11* kodeerivad aga erinevaid transkriptsioonifaktoreid, millest *MAFB* on seotud vereloome regulatsiooniga ning *HOXD10* ja *HOXD11* jäsemete arenguga. *HOXD10* ekspressiooni on tuvastatud ka emaka kasvajates (Redline jt, 1994). Lisaks on *HOXD10* ekspressiooni näidatud endomeetriumi stroomas ja näärmeepiteelis, kus seostati *HOXD10* ekspressiooni implantatsiooniakna ajal endomeetriumi retseptiivseks muutumisega (Xu jt, 2014). Arvatakse, et *HOXD* geenid võivad koos *HOXC*

geenidega olla olulised endomeetriumi arengul ja vohamisel. Kuigi on tehtud uuringuid, mis on tuvastanud *HOXD10* ja *HOXD11* geenide ekspressiooni endomeetriumis proliferatiivse faasi ajal (Akbas ja Taylor, 2004), pole seni siiski ühtegi kattuvatest geenidest konkreetselt seoses endometriosisiga uuritud.

Endomeetriumi stroomatrakkudel läbiviidud uuringutes (Yamagata jt, 2014; Dyson jt, 2014) leiti vaid üks ühine geen, milleks oli *MFAP2* ehk mikrofibrilliga seotud valk 2 (*microfibrillar-associated protein 2, MFAP2*). Ka selle geeni puhul pole endometriosisiga seoses uuringuid tehtud. *MFAP2* geen kodeerib elastiiniga seotud mikrofibrillide perekonna suurt antigeeni valku, mida on seostatud pärilike sidekoe haigustega. Arvatakse, et *MFAP2* ekspressiooni vähenemisel võib olla seos implantatsiooni häiretega (Turkyilmaz jt, 2012), mis omakorda võib põhjustada endometriosisiga kaasnevat viljatust.

Kui võrreldi omavahel stroomarakkude (Dyson jt, 2014) ja endometriosisikolletel (Borghese jt, 2010) läbiviidud DNA metülatsiooni uuringute tulemusi, siis leiti kuus kattuvat geeni: *C1orf180 (LINC01555)*, *C1orf86(FAAP20)*, *CITED4*, *FAM41C*, *PRKCZ* ja *SLC16A4*. Mitte ühtegi nendest kattuvatest geenidest pole uuritud seoses endometriosisiga. Nendest *C1orf180 (LINC01555)* ja *FAM41C* kuuluvad mittekodeerivate RNA-de hulka. *C1orf86 (FAAP20)* on Fanconi aneemia tuumakompleksi valku kodeeriv geen (Kim jt, 2012), mida pole seni seostatud ühegi reproduktiivsüsteemi mõjutava haigusega. *CITED4* puhul on tegemist transkriptsiooni koaktivaatorite perekonda kuuluva geeniga, mis võib olla seotud kasvajate tekkega rinnavähis (Fox jt, 2004) ning see võib avalduda ka folliikulites, kus tema ekspressiooni indutseerib luteiniseeriv hormoon. Ta on seotud ovulatsiooni esile kutsumisega reguleerides ovulatsiooni toimumiseks olulisi geene (Zhang jt, 2014). *PRKCZ* ehk proteiini kinaas C zeta kuulub seriini/treoniini kinaaside hulka, mida on seostatud tuumafaktor- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) aktivatsiooniga müomeetriumis ehk emaka lihaskestas (Dallot jt, 2005) ning raseduse lõppfaasis tekkivate emaka kokkutõmmetega (Di Liberto jt, 2003). Lisaks võib *PRKCZ* kaasa aidata vähi tekkele põhjustades rakkude polaarsuse häirumist ning seeläbi koe ümberorganiseerumist (Grifoni jt, 2007). Samuti on seda seostatud munasarjavähi tekkega, sest vahendab teiste oluliste signaalmolekulide ekspressiooni ja mõjutab seeläbi kasvajakude vohamist ja migratsiooni (Seto ja Andrulis, 2015). *SLC16A4 (monocarboxylate transporter 4, MCT4)* puhul on tegemist transportervalgu kodeeriva geeniga, mille produkt katalüüsib monokarboksülaatide (näiteks laktaat või püruvaat) kiiret

transporti läbi plasmamembraani. See on põhiline laktaadi transporter platsentas (Moreau jt, 2014) ja seda on tuvastatud ka müomeetriumis (Akerud jt, 2009).

Dyson jt, 2014 kollete ja endomeetriumi stroomarakkude uuringu ning Naqvi jt, 2014 endomeetriumi uuringu tulemuste võrdlusel leiti üks ühine geen, *IGSF21*, mis kuulub immunoglobuliinide superperekonda *IGSF* ja mida on seostatud endomeetriumi rakkude adhesiooniga (Singh ja Aplin, 2009). Dyson jt, 2014 ja Saare jt, 2016 tööde vahel kattus vaid üks transkriptsioonifaktorit kodeeriv geen *HIVEP3* ( *$\kappa$ B and RSS recognition component, KRC*), mida pole naistel seostatud ühegi reproduktiivsüsteemi haigusega. Mõlema geeni seosed endometrioosiga vajavad veel uurimist.

## 2.4 Arutelu

Endometriosis on komplekshaigus, mille kujunemise põhjused on siiani ebaselged. Viimasel ajal on järjest rohkem hakatud uurima metülatsiooni rolli endometriosisi kujunemisel. Selleks hinnatakse, kas kolletel ning haigete naiste endomeetriumi on võrreldes tervete naiste endomeetriumi erinev metülatsiooniprofiil. Läbi on viidud nii kandidaatgeenide kui ka ülegenoomseid metülatsiooni uuringuid.

Kandidaatgeenidel põhinevad metülatsiooni uuringud on välja toonud mitmeid gene, nagu näiteks *HOXA10*, *SF-1*, *COX-2* ja *PR-B*, mille erinevat metülatsiooni on suudetud näidata mitmes erinevas kandidaatgeenide uuringus. Kahjuks antud geenide erinevat metülatsiooni tervete ja haigete indiviidide vahel ei ole suudetud aga kinnitada ülegenoomsetes uuringutes ja vaid ühes töös (Yamagata jt, 2014) leiti endometriosisikolletes tervete naiste endomeetriumi võrreldes *SF-1* (*NR5A1*) promootori hüpometülatsioon. Lisaks *NR5A1*-le on kõikidest uuritud kandidaatgeenidest kordunud ülegenoomsetes uuringutes vaid raku proliferatsioon ja diferentseerumisega seotud tuumorrepressor-geen *RUNX3*, mis esines Dyson jt töös, ja östrogeeni retseptor alfa kodeeriv *ESR1*, mis esines Yamagata jt töös. On näidatud, et *RUNX3* metülatsioon korreleerub positiivselt *ESR1* ekspressiooniga ja selle geeni promootori hüpermetülatsioon võib olla seotud ovariaalse endometriosisi muutumisega pahaloomuliseks ovariaalseks kartsinoomiks (Guo jt, 2014). Huvitav on märkida, et *ESR1* kohta tehtud kandidaatgeeni uuring metülatsiooni muutust ei leidnud (Meyer jt, 2014) ning kumbki nendest geenidest ei kordunud üheski teises ülegenoomses uuringus.

Ülegenoomseid metülatsiooni uuringuid on läbi viidud viis, kuid vaadates erinevates uuringutes saadud tulemusi on nende omavaheline kattuvus siiski üsna väike. Ühegi ülegenoomsetes metülatsiooni uuringutes kattunud geenide rolli pole endometriosisi kujunemises lähemalt uuritud. Kahte ülegenoomsetes uuringutes korduvatest geenidest, *HOXD10* ja *HOXD11*, on varasemalt seostatud endomeetriumi tsükliliste muutustega. *HOXD10* ekspressiooni on tuvastatud emakas ning seda on seostatud ka endomeetriumi retseptiivseks muutmisega (Xu jt, 2014; Akbas ja Taylor, 2004). Seega võib antud geenide muutunud metülatsioon olla seotud implantatsiooni häiretega ja endometriosisiga seotud viljatuse üheks võimalikuks põhjuseks. Samuti seostatakse implantatsioonihäiretega ka teist erinevates uuringus kattuvat geeni, *MFAP2* (Turkyilmaz jt, 2012). Üks ülegenoomsetes uuringutes kordunud geen, *IGSF21*, on oluline endomeetriumi rakkude adhesioonil, seega võib ka *IGSF21* kaudselt endometriosisi kujunemisel rolli mängida. Muutunud *IGSF21*

metülatsioon endomeetriumis võib viia rakkudevahelise häirunud immuunvastuseni ning mõjutada kõhuõõnde sattunud endomeetriumi rakkude adhesiooni ektoopilistesse piirkondadesse.

Sellel, miks erinevad uuringud jõuavad sageli erinevatele tulemustele, võib olla mitmeid põhjuseid. Ülegenoomsete metülatsiooni uuringute kattuvus võib olla mõjutatud eelkõige erinevustest patsientide valimis ning uuringutes osalevate patsientide ning kontrollide hulgast, mis on kõikides seni läbiviidud uuringutes olnud tagasihoidlik. Seega vaadates uuritavate väikest arvu, võib arvata, et uuringute võimsus tuvastada väiksemaid metülatsiooni erinevusi võib olla ebapiisav. Kuna on näidatud, et erinevatel kudedel võib olla neile spetsiifiline metülatsioonimuster (Muangsub jt, 2014), siis võib uuringute tulemuste vähene kattuvus olla põhjustatud erinevate koetüüpide võrdlemisest. Töodes on kasutatud erinevaid strateegiaid võrreldes omavahel kas paarilisi koldeid ja endomeetriume, endomeetriume omavahel või endomeetriumist ja kolletest pärinevaid stroomarakke. Võiks oodata tulemuste kattuvust sama kudet uurivate autorite vahel, kuid kui sama koetüüpi uurinud tööde tulemusi analüüsida, siis jääb kattuvus siiski väheseks. Näiteks endomeetriumit uurinud Saare jt, 2016 ning Naqvi jt, 2014 töödes, ei kattunud leitud geenidest omavahel ükski ja endometriooosikolde stroomat uurinud Dyson jt, 2014 ning Yamagata jt, 2014 töid omavahel kõrvutades kattus 459st töödes leitud geenist vaid üks geen (*MFAP2*). Kui kõik ülegenoomsetes uuringutes leitud geenid kokku panna ja kattuvust uurida, siis 870 geenist kattus vaid 13 geeni, mis teeb kokku ainult 1,5%. Üks põhjus on kindlasti selles, et kõik Naqvi jt töös leitud erinevalt metüleeritud geenid ei olnud võrdluseks kättesaadavad, nii et tegelik kattuvus võib olla uuringute vahel veidi suurem. Samuti võib ühe põhjusena esile tuua erinevate kiipide kasutamist eri uuringutes. Borghese jt, 2010 kasutasid oma töös Affymetrix GeneChip Human Promoter 1.0R array'd, mis võimaldab vaadelda umbes 25500 promootorregiooni metülatsiooni profiile (Affymetrix), Yamagata jt, 2014 ja Naqvi jt, 2014 kasutasid Illumina Infinium HumanMethylation27 Assay kiipi, mille puhul saab metülatsioonitaset vaadelda 27578 CpG lookuses enam kui 14000 geenis ning Saare jt, 2016 ja Dyson jt, 2014 Methylation450 kiipi, mille abil saab metülatsioonitaset hinnata rohkem kui 480000 CpG saidis, mis paiknevad enam kui 21000 geenis üle terve genoomi (Illumina Inc). Kiipide erinevuste tõttu saab iga kiibiga hinnata erinevas koguses CpG saite ning uuritavate saitide asukoht võib varieeruda. Samuti võib välja tuua Borghese jt, 2010 poolt kasutatud DNA nn. segamise ja immuunsadestamise strateegia, mis ei suuda tuvastada hõredalt paiknevate GpC saitide

metülatsioonitaset, mistõttu võib osa olulistest erinevalt metüleeritud CpGdest jääda tuvastamata.

Ülegenoomsete metülatsiooni uuringute kattuvus võib olla mõjutatud ka erinevustest patsientide valimis. Kuna kirjanduses on viiteid, et DNA metülatsioonimustrit võib mõjutada vanus (Issa jt, 1994; Fuke jt, 2004) ning see, kas patsient suitsetab (Besingi ja Johansson, 2014; Breitling jt, 2011), siis oleks oluline ka seda informatsiooni patsientide kirjeldamisel kajastada. Samuti oleks oluline kirjeldada, kas patsiendid on enne operatsiooni saanud hormoonravi, sest selle tulemusel võib muutuda geeniekspressiooni kolletes ning endomeetriumis (Kauppila jt, 2008). Viiest ülegenoomsest metülatsiooni uuringust oli vanust maininud vaid kolm tööd (Dyson jt, 2014; Saare jt, 2016; Borghese jt, 2014), suitsetamist aga ainult üks töö (Saare jt, 2016). Seda, kas patsiendid on saanud hormoonravi enne operatsiooni, on kajastanud 3 tööd (Dyson jt, 2014; Naqvi jt, 2014; Saare jt, 2016).

Lisaks võivad varieeruda erinevate uuringukeskuste koeproovide töötlemis- ja kogumismeetodid. Tulemusi võivad mõjutada ka patsientide erinevad selektsioonikriteeriumid nagu näiteks haiguse raskusaste ja menstruaaltsükli faas. Haiguse staadiumid on välja toonud Saare jt, 2016, Yamagata jt, 2014 ning Borghese jt, 2010, kuid seda pole aga teinud Naqvi jt, 2014 ning Yamagata jt, 2014. Kuna Saare jt, 2016 näitasid, et menstruaaltsükkel võib mõjutada geenide metülatsiooniprofiile, siis tuleks kindlasti ka menstruaaltsükli päeva arvesse võtta, mida ei ole aga kõik autorid oma töös teinud (Naqvi jt, 2014).

Selleks, et erinevate uuringute tulemused oleksid omavahel võrreldavad, on oluline uuringud ühtlustada juba proovide kogumise hetkest. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project (WERF EPHect) poolt on välja töötatud uuringute standardprotokollid, mis määravad ära, kuidas proove koguda, töödelda ja säilitada. Miinimum, mida peaks iga uuring kajastama, on menstruaaltsükli päev ja faas, kas patsient on saanud hormoonravi ja kas on enne tehtud endometrioosiga seoses kirurgilisi operatsioone. Lisaks on vajalik ka kollete iseloomustus ja histoloogiline kontroll. Kuna endometrioos võib esineda ka asümptomaatiliselt, siis tuleks laparoskoopiliselt kontrollida ka kontrollideks valitud indiviide, et kindlasti välistada endometrioosi olemasolu. Standardprotokollide kasutusele võtmine aitaks kaasa tulemuste korratavusele ning võimaldaks erinevate endometrioosiga tegelevate uurimiserühmade vahelist koostööd.

Käesoleva töö puudusteks on analüüs piiratud andmetega. Nimelt polnud kahjuks võimalik saada kätte Naqvi jt, 2014 geenilisti 120 olulise erinevalt metüleeritud geeniga, vaid ainult 13 nende poolt artiklis mainitud geeni. Lisaks on Dyson jt, 2014 artiklis mainitud, et nad leidsid 403 statistiliselt olulist erinevalt metüleeritud geeni, kuid nende geenilisti uurimisel sain kokku ainult 391.

### **Töö järeldused:**

- Kuna erinevate uuringute tulemused ei ole oma disaini tõttu võrreldavad, siis ei ole võimalik adekvaatselt hinnata DNA metülatsiooni olulisust endometrioosi kujunemises.
- Uuringute puuduliku disaini ja patsientide tagasihoidliku fenotüübilise kirjelduse probleemidele lisaks on uuritavate grupid ka liiga väikesed usaldusväärsete tulemuste saamiseks. Seega oleks vaja tulevikus kasutusele võtta standardprotokollid, et muuta erinevate uurimisrühmade tulemused omavahel paremini võrreldavaks.
- Kuna ühtegi ülegenoomsetes uuringutes kattunud geenide rolli pole endometrioosi patogeneesis seoses veel tuvastatud, võiks tulevikus nende geenide seoseid haiguse kujunemisega uurida.

## Kokkuvõte

Endometriosis on komplekshaigus, mille korral emaka limaskestast sarnane kude kasvab ja talitleb väljaspool emakaõõnt ning moodustab koldeid. Haiguse kujunemine pole siiani selge, kuigi välja on pakutud, et kujunemist mõjutavad nii hormonaalsed, immunoloogilised, geneetilised kui ka keskkonnafaktorid. Hiljutised uuringud on püstitanud hüpoteesi, et endometriosisi kujunemine võib olla seotud muutustega endomeetriumi ja endometriosisikollete rakkude DNA metülatsioonimustris. Selle uurimiseks on läbi viidud nii kandidaatgeenidel põhinevaid kui ka ülegenoomseid metülatsiooni uuringuid, mille omavaheline kattuvus on jäänud siiski tagasihoidlikuks. Ülegenoomseid uuringuid analüüsidest tuvastasin vaid mõned erinevates uuringutes kattunud geenid, mis võiksid olla olulised endometriosisi patogeneesis nagu näiteks *HOXD10* ja *HOXD11*. Kuna *HOXD10* ja *HOXD11* osalevad protsessides, mis on seotud embrüonaalse arengu, endomeetriumi tsükliiliste muutuste ning implantatsiooniga, siis võiksid antud geenid mängida olulist rolli ka endometriosisi ja sellega seotud viljatuse kujunemisel. Tähtsust võivad omada ka *MFAP2* ja *IGSF21*, mida on seostatud vastavalt implantatsioonihäirete ja endomeetriumorakkude vahelise adhesiooniga. Tulevikus võiks tähelepanu pöörata ülegenoomsetes metülatsiooni uuringutes kattunud geenide, eriti *HOXD10*, funktsiooni uurimisele endometriosisi kujunemisel, sest seda ei ole seni veel tehtud.

Kuna siiani läbiviidud DNA metülatsiooni uurivate tööde metoodikas esineb puudusi, siis oleks tarvis tulevikus kasutusele võtta endometriosisi uurimiseks standardprotokollid, et tulemused erinevate uuringute vahel oleksid võrreldavad. Arvestada tuleks uuritavate vanuse, menstruaaltsükli faasi ning sellega, kas uuritavad suitsetavad. Kindlasti on oluline teha endometriosisikollete proovidele histoloogiline kontroll, kus kinnitatakse haiguse olemasolu. Kuna endometriosis võib esineda asümptomaatiliselt, siis tuleks kontrollide puhul kindlasti välistada endometriosisi olemasolu laparoskoopia või mõne muu meetodi abil, millega saab kõhuõõnt visualiseerida. Lisaks sellele oleks tarvis korrata uuringuid suurema valimiga, et tõsta uuringutulemuste võimsust ja usaldusväärsust. Tänapäevani avaldatud uuringute põhjal ei ole võimalik teha järeldusi DNA metülatsiooni olulisuse kohta endometriosisi tekkel.

## **Tänuavaldused**

Soovin tänu avaldada oma suurepärasele juhendajatele, Merli Saarele ning Liis Leitsalule, kes oma nõuga minu jaoks pidevalt olemas olid. Eriti soovin tänada Merli Saaret, kes oma järjepidevuse ning kriitilise meele abil aitas minu töö valmimisele ning analüüsivõime arengule tugevalt kaasa. Samuti sooviksin tänada Maire Petersit abistavate kommentaaride eest. Suur aitäh ka perele julgustuse, innustamise ning igakülgse toetuse eest.

## The role of DNA methylation in the pathogenesis of endometriosis

Kertu Liis Krigul

### Summary

Endometriosis is a complex, estrogen-dependent disease characterised by the ectopic presence and growth of functional endometrial tissue, glands and stroma, outside of the uterine cavity. The lesions typically occur in the peritoneal cavity. Endometriosis is classified depending on the number, size, and superficial and/or deep location of endometrial implants, plaques, endometriomas, and/or adhesions. The most common symptoms include severe pelvic pain, especially during intercourse and menstruation, however some women remain asymptomatic. Endometriosis is also associated with infertility. Current epidemiological studies indicate that endometriosis occurs in 6–10% of reproductive-age female population (Treloar et al., 1999) and in 20–50% of women with infertility (Gao et al., 2006). The most common explanation for the etiology is the implantation theory also known as theory of retrograde menstruation. The pathogenesis of endometriosis still remains controversial: immunological, hormonal, genetic, environmental and epigenetic factors may all play a role. Recently it has been proposed that aberrant DNA methylation may initiate the pathological process of endometriosis by affecting gene expression and therefore leading to alterations in the cellular microenvironment.

In this study, I found 13 genes that replicated in genome-wide DNA methylation analyses (*MFAP2*, *C1orf180*, *C1orf86*, *CITED4*, *FAM41C*, *PRKCZ*, *SLC16A4*, *IGSF21*, *HIVEP3*, *MAFB*, *HOXD10*, *HOXD11*, *APEH*). None of them have previously been associated with endometriosis and thus need to be investigated. We also found out that the results about genes from candidate-gene studies do not usually replicate in genome-wide DNA methylation analyses, except for *NR5A1* and *RUNX3*.

There are many problems with the methods and design of the studies about endometriosis. The phenotypical characterisation is deficient and the study sizes are limited. In future studies about endometriosis, the authors should use standard protocols and bigger sample sizes to allow comparisons between different study groups. The question remains if the differences in methylation are causing endometriosis or are they just the mere outcome of the disease.

## Kasutatud kirjandus

1. Adachi, S., Tajima, A., Quan, J. ja teised. (2010). Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population. *J Hum Genet.* 55: 816–821.
2. Ahn, S.H., Monsanto, S.P., ja teised. (2015). Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis. *Biomed Res Int.* 2015:795976. doi: 10.1155/2015/795976
3. Akbas, G.E. ja Taylor, H.S. (2004). HOXC and HOXD gene expression in human endometrium: lack of redundancy with HOXA paralogs. *Biol Reprod.* 70(1): 39-45.
4. Akerud, H., Ronquist, G. ja Wiberg-Itzel, E. (2009). Lactate distribution in culture medium of human myometrial biopsies incubated under different conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(6): E1414-9.
5. Albertsen, H.M., Chettier, R., Farrington, P. ja Ward, K. (2013). Genome-wide association study link novel loci to endometriosis. *PLoS One.* 8: e58257.
6. Andersson, K.L., Bussani, C. ja Fambrini, M. ja teised. (2014). DNA methylation of HOXA10 in eutopic and ectopic endometrium. *Hum Reprod.* 29(9): 1906-11.
7. Anger, D.L. ja Foster, W.G. (2008). The link between environmental toxicant exposure and endometriosis. *Front Biosci.* 13: 1578–1593.
8. Aoki, M. (1967). Endometriosis of the pelvic lymph nodes. *Pathol Int.* 17: 217–234.
9. Arici, A. (2002). Local cytokines in endometrial tissue: the role of interleukin-8 in the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 955:101-9.
10. Arici, A., Oral, E., Attar, E. ja teised. (1997) Monocyte chemotactic protein-1 concentration in peritoneal fluid of women with endometriosis and its modulation of expression in mesothelial cells. *Fertil Steril.* 67(6): 1065-72.
11. ASRM. (1997). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril.* 67: 817-821.
12. Attia, G.R., Zeitoun, K. ja teised. (2000) Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 2897–902.
13. Audebert, A., Backstrom, T., Barlow, D.H., Benagiano, G., Brosens, I., Buhler, K., Donnez, J., Evers, J.L., Pellicer, A., Mettler, L., jt. (1991). Endometriosis 1991: a discussion document. *Hum Reprod.* 7(3): 432-435.

14. Aznaurova, Y.B., Zhumataev, M.B., Roberts, T.K., Aliper, A.M., Zhavoronkov, A.A. (2014). Molecular aspects of development and regulation of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 12: 50.
15. Baldi, A., Campioni M., Signorile, P.G. (2008). Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer. *Oncol Rep.* 19: 843-6.
16. Ballard, K.D., Lowton, K., Wright, J.T. (2006). What's the delay? A qualitative study of women's experience of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertil Steril.* 85: 1296-301.
17. Baranov, V.S., Ivaschenko, T.E., Liehr, T. ja Yarmolinskaya, M.I. (2015) Systems genetics view of endometriosis: a common complex disorder. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 185: 59-65.
18. Barlow, D. P. (2011). Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu. Rev. Genet* 45: 379-403.
19. Bergqvist, A., Bruse, C., Carlberg, M. ja Carlström, K. (2001). Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril.* 75(3): 489-95.
20. Besingi, W. ja Johansson, A. (2014). Smoke-related DNA methylation changes in the etiology of human disease. *Hum Mol Genet.* 23(9): 2290-7.
21. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C. ja teised. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics.* 98: 288-295.
22. Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature.* 447(7143): 396-8.
23. Bis, K.G., Vrachliotis, T.G., Agrawal, R. ja teised. (1997). Pelvic endometriosis: MR imaging spectrum with laparoscopic correlation and diagnostic pitfalls. *Radiographics.* 17(3): 639-55.
24. Bock, C. (2012). Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet.* 13(10): 705-19.
25. Borghese, B., Barbaux, S., Mondon, F. ja teised. (2010). Research resource: genome-wide profiling of methylated promoters in endometriosis reveals a subtelomeric location of hypermethylation. *Mol Endocrinol.* 24(9): 1872-85.
26. Brandenberger, A.W., Lebovic, D.I., Tee, M.K. ja teised. (1999). Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod.* 5(7): 651-5.

27. Bredhult, C. Bäcklin, B.-M. ja Olovsson M. (2007). Effects of some endocrine disruptors on the proliferation and viability of human endometrial endothelial cells *in vitro*. *Reprod Toxicol.* 23: 550-559.
28. Breitling, L.P., Yang, R., Korn, B. ja teised. (2011). Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet.* 88: 450-457.
29. Brero, A., Leonhardt, H. ja Cardoso, M.C. (2006). Replication and translation of epigenetic information. *Curr Top Microbiol Immunol.* 301: 21-44.
30. Brinkman, A. B. ja teised. (2010). Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods.* 52: 232–236.
31. Brosens, I. (1997). Diagnosis of endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol.* 15(3): 229-233.
32. Brosens, I. ja Benagiano, G. (2012). History of Endometriosis: A 20th-Century Disease. L.C. Giudice, J. L.H. Evers, D.L. Healy (Toim), *Endometriosis: Science and Practice* (lk 3-15). Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Chichester.
33. Bruner-Tran, K.L., Yeaman, G.R., Crispens, M.A. ja teised. (2008). Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis. *Fertil Steril.* 89: 1287–1298.
34. Buchweitz, O., Staebler, A., Wülfing, P. ja teised. 2006. COX-2 overexpression in peritoneal lesions is correlated with nonmenstrual chronic pelvic pain. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 124: 216–221.
35. Bulletti, C., Coccia, M.E., Battistoni, S. ja Borini, A. (2010). Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet.* 27(8): 441-447.
36. Bulun, S.E. (2009). Endometriosis. *N Engl J Med.* 360: 268-79.
37. Bulun, S. E., Cheng, Y.H., Yin, P. ja teised. (2006). Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol.* 248: 94–103.
38. Bulun, S.E., Fang, Z., Imir, G., Gurates, B. ja teised. (2004). Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med.* 22(1): 45–50.
39. Burney, R. O., Giudice, L.C. (2012). Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis. *Fertil Steril.* 98(3): 511-9.
40. Burns, W.N. ja Schenken, R.S. (1999). Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin Obstet Gynecol.* 42(3): 586-610.

41. Cai, L.Y., Izumi, S., Suzuki, T. ja teised. (2011). Dioxins in ascites and serum of women with endometriosis: a pilot study. *Hum Reprod.* 26: 117–126.
42. Cardon, L.R. ja Bell, J. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2(2): 91-9.
43. Cheng, Y.H., Imir, A., Fenkci, V., Yilmaz, M.B., Bulun, S.E. (2007). Stromal cells of endometriosis fail to produce paracrine factors that induce epithelial  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene and its transcriptional regulator Sp1: a mechanism for defective estradiol metabolism. *Am J Obstet Gynecol.* 196(4): 391.e 1-7.
44. Cheong, Y.C., Shelton, J.B., Laird, S.M. ja teised. (2002). IL-1, IL-6 and TNF-alpha concentrations in the peritoneal fluid of women with pelvic adhesions. *Hum Reprod.* 17(1): 69-75.
45. Choudhury, S.R., Knapp, L.A. (2001). Human reproductive failure I: immunological factors. *Hum. Reprod. Update.* 7: 113-134.
46. Comb, M. ja Goodman, H. M. (1990). CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucl. Ac. Res.* 18: 3975–3982.
47. Comiter, C.V. (2002). Endometriosis of the urinary tract. *Urol Clin North Am.* 29(3): 625-635.
48. Crain, D.A., Janssen, S.J., Edwards, T.M., Heindel, J., Ho, S.M., Hunt, P., jt. (2008). Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril.* 90: 911–40.
49. D'Hooghe, T.M., Kyama, C., Debrock, S. ja teised. (2004). Future directions in endometriosis research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1034: 316-325.
50. Dallot, E., Mehats, C., Oger, S. ja teised. (2005). A role for PKCzeta in the LPS-induced translocation NF-kappaB p65 subunit in cultured myometrial cells. *Biochimie.* 87: 513–521.
51. de Graaff, A.A., Delvoux, B., Van de Vijver, K.K. ja teised. (2012). Paired-box gene 2 is down-regulated in endometriosis and correlates with low epidermal growth factor receptor expression. *Hum Reprod.* (6): 1676-84.
52. De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B. ja teised. (1999). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol.* 19(11): 7327–35.

53. Di Liberto, G., Dallot, E., Eude-Le Parco, I. ja teised. (2003). A critical role for PKC zeta in endothelin-1-induced uterine contractions at the end of pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285: 599–607.
54. Dmowski, W.P., Steele, R.W. ja Baker, G.F. (1981). Deficient cellular immunity in endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141: 377–383.
55. Donnez, J., Nisolle, M. (1997). Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril.* 68 (4): 585-596.
56. Donnez, J., Donnez, O., Lousse, J.C., Squifflet, J. (2012). Peritoneal, Ovarian, and Rectovaginal Endometriosis are Three Different Entities. L.C. Giudice, J. L.H. Evers, D.L. Healy (Toim), *Endometriosis: Science and Practice* (lk 92-107). Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Chichester.
57. Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F. ja Nisolle, M. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum. Reprod.* 13: 1686-1690.
58. Dunselman, G.A. ja teised. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod.* 29: 400-12.
59. Dyson, M.T., Roqueiro, D., Monsivais, D. ja teised. (2014). Genome-wide DNA methylation analysis predicts an epigenetic switch for GATA factor expression in endometriosis. *PLoS Genet.* 10(3): e1004158.
60. Ehrlich, M. (2003). Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem.* 88(5): 899-910.
61. Eun Kwon, H. ja Taylor H.S. (2004). The role of HOX genes in human implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 1034: 1-18.
62. Exacoustos, C., Manganaro, L., Zupi, E. (2014). Imaging for the evaluation of endometriosis and adenomyosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 28(5): 655-81.
63. Fambrini, M., Sorbi, F., Bussani, C. ja teised. (2013). Hypermethylation of HOXA10 gene in mid-luteal endometrium from women with ovarian endometriomas. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 92(11):1331-4.
64. Falconer, H., D'Hooghe, T., Fried, G. (2007). Endometriosis and genetic polymorphisms. *Obstet Gynecol Surv.* 62: 616–28.
65. Feber, A. ja teised. (2011). Comparative methylome analysis of benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Genome Res.* 21: 515–524.
66. Fox, S.B., Bragança, J., Turley, H. ja teised. (2004). CITED4 inhibits hypoxia-activated transcription in cancer cells, and its cytoplasmic location in breast cancer is

- associated with elevated expression of tumor cell hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.* 64(17): 6075-81.
67. Fraga, M.F. ja teised. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30): 10604-9.
68. Frigola, J., Song, J., Storzaker, C. ja teised. (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Gen.* 38: 540–549.
69. Frommer, M. ja teised. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 1827–1831.
70. Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A. ja teised. (2004). Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet.* 68(3): 196-204.
71. Gaetje, R., Holtrich, U., Engels, K. ja teised. (2007). Endometriosis may be generated by mimicking the ontogenetic development of the female genital tract. *Fertil Steril.* 87: 651-656.
72. Gargett, C.E., Chan, R.W.S. ja Schwab, K.E. (2008). Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 288: 22–29.
73. Gazvani, R. ja Templeton, A. (2002). New considerations for the pathogenesis of endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 76 (2): 117-126.
74. Ginno, P.A. ja teised. (2012). R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters. *Molecular Cell.* 45(6): 814–825.
75. Giudice, L.C., Kao, L.C. (2004). Endometriosis. *Lancet.* 364: 1789-99.
76. Giudice, L.C. (2010). Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 362(25): 2389-2398.
77. Goumenou, A.G., Arvanitis, D.A., Matalliotakis, I.M. ja teised. (2000). Loss of heterozygosity in adenomyosis on hMSH2, hMLH1, p16Ink4 and GALT loci. *Int J Mol Med.* 6: 667-671.
78. Grifoni, D., Garoia, F., Bellosta, P. ja teised. (2007). aPKCzeta cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in *Drosophila* and human epithelia. *Oncogene.* 26: 5960–5965.
79. Gu, H. ja teised. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nature Protoc.* 6: 468–481.

80. Guida, M., Sanguedolce, F., Bufo, P. ja teised. (2009). Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol.* 30: 267-270.
81. Guo, C., Ren, F., Wang, D. ja teised. (2014). RUNX3 is inactivated by promoter hypermethylation in malignant transformation of ovarian endometriosis. *Oncol Rep.* 32(6): 2580-8.
82. Hadfield, R., Mardon, H., Barlow, D. ja Kennedy, S. (1996). Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod.* 114: 878–880.
83. Hadfield, R.M., Mardon, H.J., Barlow, D.H., Kennedy, S.H. (1997). Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil Steril.* 12: 32-34.
84. Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F. (1984). Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 64: 151-154.
85. Heilier, J.F., Nackers, F., Verougstraete, V. ja teised. (2005). Increased dioxin-like compounds in the serum of women with peritoneal endometriosis and deep endometriotic (adenomyotic) nodules. *Fertil Steril.* 84: 305–312.
86. Heinaru, A. 2012. *Geneetika*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. DNA metüülimine ja geeni mälu. Lk 482-484.
87. Heinaru, A. 2012. *Geneetika*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. Geeni vermimine ehk imprinting. Lk 485-486.
88. Hellman, A. ja Chess, A. (2007). Gene body-specific methylation on the active x chromosome. *Science.* 315(5815): 1141–1143.
89. Heberle, H., Meirelles, G.V., da Silva, F.R. ja teised. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16:169.
90. Ho, H.N., Wu, M.Y., Yang, Y.S. (1997). Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 38(6): 400-12.
91. Houston, D.E., Noller, K.L., Melton, L.J. 3rd, Selwyn, B.J., Hardy, R.J. (1987). Incidence of pelvic endometriosis in Rochester. *Am J Epidemiol.* 125(6): 959-969.
92. Huang, H.Y. (2008). Medical treatment of endometriosis. *Chang Gung Med J.* 31(5): 431-440.
93. Huang, T.H., Perry, M.R. ja Laux, D.E. (1999). Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet.* 8(3): 459-70.

94. Issa, J.J., Ottaviano, Y.L., Celano, P. ja teised. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 7: 536–40.
95. Izawa, M., Harada, T., Taniguchi, F. ja teised. (2008). An epigenetic disorder may cause aberrant expression of aromatase gene in endometriotic stromal cells. *Fertil Steril.* 89(5): 1390-6.
96. Izawa, M., Taniguchi, F., Uegaki, T. ja teised. (2011). Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril.* 95(1): 33-9.
97. Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B. ja teised. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypoand hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics.* 41: 178-186.
98. Jaffe, A. E., Murakami, P., Lee, H. ja teised. (2012). Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *International Journal of Epidemiology.* 41: 200-209.
99. Jain, J., Dalton, M.E. (1999). Chocolate cysts from ovarian follicles. *Fertil Steril.* 72(5): 852-856.
100. Jarinova, O., Stewart, A.F., Roberts, R. ja teised. (2009). Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29: 1671-1677.
101. Javierre, B.M. ja teised. (2010). Changes in the pattern of DNA methylation associated with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res.* 20(2): 170-9.
102. Jeltsch, A. (2006). Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 301: 203-25.
103. Jones, P.A. (2010). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13(7): 484-492.
104. Jones, P. A. ja Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Rev. Genet.* 10: 805–811.
105. Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *ChemBioChem* 12(2): 206–222.
106. Kalinina, A. ja Matt, K. (2003). Autoantikehade osa naiseviljatuse tekkes. *Eesti Arst.* 82 (3): 172–176.

107. Kang, Y.L., Jeung, I.C., Park, A. ja teised. (2014). An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SPH-2 expression. *Hum Reprod.* 29: 2176-2189.
108. Khulan, B., Thompson, R.F., Ye, K. ja teised. (2006). Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res.* 16(8): 1046-55.
109. Kim, H., Yang, K., Dejsuphong, D. ja D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of Rev1 by the Fanconi anemia core complex. *Nat Struct Mol Biol.* 19(2): 164-70.
110. Kitawaki, J., Kado, N., Ishihara, H. ja teised. (2002). Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83: 149-155.
111. Kitawaki, J., Noguchi, T., Amatsu, T. ja teised. (1997). Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 57(3): 514-9.
112. Kobayashi, H. (2014) Imprinting genes associated with endometriosis. *EXCLI J.* 13: 252-64.
113. Koks, C.A.M., Dunselman, G.A.J., de Goeij, A.F.P.M. ja teised. (1997). Evaluation of a menstruaal cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril* 68: 560-564.
114. Koninckx, P.R. (1994). Is mild endometriosis a condition occurring intermittently in all women? *Hum Reprod.* 9: 2202-2205.
115. Kruitwagen, R.F.P.M., Poels, L.G., Willemsen, W.N.P. ja teised. (1991). Endometrial epithelial cells in peritoneal fluid during the early follicular phase. *Fertil Steril* 55: 297-303.
116. Kulp, J.L., Mamillapalli, R. ja Taylor, H.S. (2016). Aberrant HOXA10 Methylation in Patients With Common Gynecologic Disorders: Implications for Reproductive Outcomes. *Reprod Sci.* 23(4): 455-63.
117. Kyama, C.M., Debrock, S., Mwenda, J.M., D'Hooghe, T.M. (2003). Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 123.
118. Laufer, M.R. (2000). Premenarcheal Endometriosis Without an Associated Obstructive Anomaly: Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Fertil Steril.* 74: S15.

119. Lavoie, H.A. ja King, S.R. (2009). Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med.* 234: 880–907.
120. Levander, G. ja Normann, P. (1955). The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 34(4): 366-98.
121. Li, E., Bestor, T. H. ja Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915–926.
122. Li, Y., An, D., Guan, Y.X. ja Kang, S. (2016). Aberrant Methylation of the E-Cadherin Gene Promoter Region in Endometrium and Ovarian Endometriotic Cysts of Patients with Ovarian Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* [Epub ahead of print]
123. Liang, S., Huang, Y., Fan, Y. (2012). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 286(1): 139-46.
124. Lister, R. ja teised. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 462: 315–322.
125. Liu, Y., Sanoff, H.K., Cho, H. ja teised. (2009). INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One.* 4: e5027.
126. Lu, H., Yang, X., Zhang, Y. ja teised. (2013). Epigenetic disorder may cause downregulation of HOXA10 in the eutopic endometrium of fertile women with endometriosis. *Reprod Sci.* 20(1): 78-84.
127. Mahnke, J.L., Dawood, M.Y. ja Huang, J.C. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 73: 166-170.
128. Mak, C.H., Strandtmann, J. ja Wu, L.C. (1994). The V(D)J recombination signal sequence and kappa-B binding protein R $\kappa$  binds DNA as dimers and forms multimeric structures with its DNA ligands. *Nucleic Acids Res* 22: 383–390.
129. Maksimovic, J., Gordon, L. ja A. Oshlack. (2012). SWAN: Subset-quantile Within Array Normalization for Illumina ,Inc; Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biology* 13: R44.
130. Margulies, M., Egholm, M., Altman, ja teised. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 437: 376–380.
131. Martin, M. ja Herceg, Z. (2012). From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. *Genome Med.* 4: 8.

132. Martini, M., Ciccarone, M., Garganese, G. ja teised. (2002). Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int J Cancer*. 102(4): 398-406.
133. Matsuzaki, S., Canis, M., Pouly, J.L. ja teised. (2004). Cyclooxygenase-2 expression in deep endometriosis and matched eutopic endometrium. *Fertil Steril*. 82: 1309–1315.
134. Mayani, A., Barel, S., Soback, S., Almagor, M. (1997). Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum Reprod*. 12: 373–375.
135. Meissner, A. (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nature Biotech*. 28: 1079-1088.
136. Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 11: 31–46.
137. Meyer, J.L., Zimbardi, D., Podgaec, S. ja teised. (2014). DNA methylation patterns of steroid receptor genes ESR1, ESR2 and PGR in deep endometriosis compromising the rectum. *Int J Mol Med*. 33(4): 897-904.
138. Missmer, S.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D. ja teised. (2004). In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Fertil Steril*. 82: 1501-1508.
139. Moen, M.H. (1994). Endometriosis in monozygotic twins. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 73: 59-62.
140. Moen, M.H. ja Magnus, P. (1993). The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 72(7): 560-4.
141. Mohn, F., Weber, M., Schubeler, D. ja Roloff, T. C. (2009). Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods Mol. Biol*. 507: 55–64.
142. Moreau, J.L., Artap, S.T., Shi, H. ja teised. (2014). Cited2 is required in trophoblasts for correct placental capillary patterning. *Dev Biol*. 392(1): 62-79.
143. Muangsub, T., Samsuwan, J., Tongyoo, P. (2014). Analysis of methylation microarray for tissue specific detection. *Gene*. 553(1): 31-41.
144. Mueller, M.D., Vigne, J.L., Streich, M. ja teised. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases glycodeilin gene and protein expression in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(8): 4809-15.
145. Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A. ja teised. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 393: 386–389.

146. Nap, A. W. (2012). Theories on the Pathogenesis of Endometriosis. L.C. Giudice, J. L.H. Evers, D.L. Healy (Toim), *Endometriosis: Science and Practice* (lk 42-46). Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Chichester.
147. Naqvi, H., Ilagan, Y., Krikun, G. ja Taylor, H.S. (2014). Altered genome-wide methylation in endometriosis. *Reprod Sci.* 21(10): 1237-43.
148. Nasu, K., Kawano, Y., Tsukamoto, Y., Takano, M. ja teised (2011). Aberrant DNA methylation status of endometriosis: epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target. *J Obstet Gynaecol Res.* 37(7): 683-95.
149. Nayyar, T., Bruner-Tran, K.L., Piestrzeniewicz-Ulanska, D., Osteen, K.G. (2007). Developmental exposure of mice to TCDD elicits a similar uterine phenotype in adult animals as observed in women with endometriosis. *Reprod Toxicol.* 23(3): 326-36.
150. Ng, H. H. ja Bird, A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 158–163.
151. Nisolle, M., Casanas-roux, F., Anaf, V., Mine, J.M., Donnez J. (1993). Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril.* 59: 681-684.
152. Noble, L.S., Takayama, K., Zeitoun, K.M. ja teised. (1997). Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(2): 600-6.
153. Nyholt, D.R., Low, S.K., Anderson, C.A. ja teised. (2012). Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat Genet.* 44(12): 1355-9.
154. Okano, M., Xie, S. ja Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases [letter]. *Nat. Genet.* 19: 219–220.
155. Oliker, A.J., Harris, A.E. (1971). Endometriosis of the bladder in a male patient. *J Urol.* 106: 858-859.
156. Oosterlynck, D.J., Cornillie, F.J., Waer, M., Vandeputte, M., Koninckx, P.R. (1991). Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril.* 56: 45–51.
157. Ota, H., Igarashi, S., Sasaki, M. ja Tanaka, T. (2001). Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod.* 16: 561–566.

158. Oxholm, D.1., Knudsen, U.B., Kryger-Baggesen, N., Ravn, P. (2007). Postmenopausal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 86(10): 1158-64.
159. Pagliardini, L., Gentilini, D., Vigano, P. ja teised. (2013). An Italian association study and metaanalysis with previous GWAS confirm WNT4, CDKN2BAS and FN1 as the first identified susceptibility loci for endometriosis. *J Med Genet.* 50: 43–46.
160. Painter, J.N., Anderson, C.A., Nyholt, D.R. ja teised. (2011). Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet.* 43 (1):51-54.
161. Pankov, R. ja Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115: 3861-3863.
162. Parazzini, F., Vercellini, P., Pelucchi, C. (2012) Endometriosis: Epidemiology and Etiological Factors. L.C. Giudice, J. L.H. Evers, D.L. Healy (Toim), *Endometriosis: Science and Practice* (lk 19-21). Wiley-Blackwell Publishing Ltd, Chichester.
163. Parks, W.C., Wilson, C.L. ja Lopez-Boado, Y.S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 617-629.
164. Pasmant, E., Laurendeau, I., Héron, D. ja teised. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res.* 67: 3963-3969.
165. Portela, A., Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28(10): 1057-68.
166. Rahmioglu, N., Missmer, S.A., Montgomery, G.W., Zondervan, K.T. (2012). Insights into assessing the genetics of endometriosis. *Curr Obstet Gynecol Rep.* 1: 124-37.
167. Rahmioglu, N., Nyholt, D.R., Morris, A.P. ja teised. (2014). Genetic variants underlying risk of endometriosis: insights from meta-analysis of eight genome-wide association and replication datasets. *Hum Reprod Update.* 20(5): 702-16.
168. Rakyan V. K., T. A. Down, D. J. Balding, ja S. Beck. (2011). Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature Review Genetics.* 12: 529–541.

169. Razin, A. ja Cedar, H. (1977). Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 2725–2728
170. Redline, R.W., Hudock, P., MacFee, M. ja Patterson, P. (1994). Expression of AbdBtype homeobox genes in human tumors. *Lab Invest.* 71:663– 670.
171. Redwine, D.B. (1987). Age-related evolution in color appearance of endometriosis. *Fertil Steril.* 48: 1062-1063.
172. Reik, W., Dean, W. ja Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 293(5532): 1089-93.
173. Reik, W. (2010). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 447: 425-432.
174. Reinius, L. E., Acevedo, N., Joerink, M. ja teised . (2012). Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS One.* 7(7): e41361. doi: 10.1371/journal.pone.0041361
175. Ren, F., Wang, D.B., Li, T. ja teised. (2014). Identification of differentially methylated genes in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *J Ovarian Res.* 7: 73.
176. Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E., Dmowski, W.P., Becker, J.L. (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fund Appl Toxicol.* 21: 433-441.
177. Rier, S.E., Turner, W.E., Martin, D.C., Morris, R., Lucier, G.W., Clark, G.C. (2001) Serum levels of TCDD and dioxin-like chemicals in Rhesus monkeys chronically exposed to dioxin: correlation of increased serum PCB levels with endometriosis. *Toxicol Sci.* 59(1): 147-59.
178. Rier, S. ja Foster, W.G. (2003). Environmental dioxins and endometriosis. *Semin Reprod Med* 21: 145–153.
179. Saare, M., Modhukur, V., Suhorutshenko, M. ja teised. (2016). The influence of menstrual cycle and endometriosis on endometrial methylome. *Clin Epigenetics.* 8: 2.
180. Saha, R., Pettersson, H.J. ja Svedberg, P. (2015). Heritability of endometriosis. *Fertil Steril.* 104 (4): 947-52.
181. Sampson, J.A. (1921). Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary: their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial type (adenomyoma of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc). *Arch Surg.* 3: 245-323.

182. Sampson, J. (1927). Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol.* 3: 93–109
183. Sampson, J.A. (1940). The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 40(4): 549–557.
184. Sapkota, Y., Low, S-K., Attia, J. ja teised. (2015). Association between endometriosis and the interleukin 1A (IL1A) locus. *Hum Reprod.* 30:239–248.
185. Seli, E. ja Arici, A. (2003). Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems. *Semin Reprod Med.* 21 (2): 135-144.
186. Senthong, A., Kitkumthorn, N., Rattanatanyong, P. ja teised. (2014). Differences in LINE-1 methylation between endometriotic ovarian cyst and endometriosis-associated ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 24(1): 36-42.
187. Serre, D., Lee, B. H. ja Ting, A. H. (2010). MBD-isolated genome sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 38: 391–399.
188. Seto, K.K. ja Andrulis, I.L. (2015). Atypical protein kinase C zeta: potential player in cell survival and cell migration of ovarian cancer. *PLoS One.* 10(4): e0123528.
189. Signorile, P.G., Campioni, M., Vincenzi, B., D'Avino, A., Baldi, A. (2009). Rectovaginal septum endometriosis: an immunohistochemical analysis of 62 cases. *In Vivo.* 23: 459-64.
190. Signorile, P.G., Baldi, A. (2015). New evidence in endometriosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 60C: 19-22.
191. Simpson, J.L., Elias, S., Malinak, L.R., Buttram, V.C. Jr. (1980). Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol.* 137: 327–31.
192. Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D. ja teised. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 15: 342-355.
193. Singh, H ja Aplin, J.D. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *J Anat.* 215(1): 3–13.
194. Sofo, V., Götte, M., Laganà, A.S., Salmeri, F.M. ja teised. (2015). Correlation between dioxin and endometriosis: an epigenetic route to unravel the pathogenesis of the disease. *Arch Gynecol Obstet.* 292(5): 973-86.

195. Sonnenschein, C. ja Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 65(1-6): 143-50.
196. Szczepańska, M., Wirstlein, P., Luczak, M. ja teised. (2010). Reduced expression of HOXA10 in the midluteal endometrium from infertile women with minimal endometriosis. *Biomed Pharmacother.* 64(10): 697-705.
197. Szczepańska, M., Wirstlein, P., Skrzypczak, J. ja Jagodziński, P.P. (2012). Expression of HOXA11 in the mid-luteal endometrium from women with endometriosis-associated infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 10: 1.
198. Szyłło, K., Tchorzewski, H., Banasik, M. ja teised. (2003). The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators. Inflamm.* 12: 131-138.
199. Steele, R.W., Dmowski, W.P., Marmer, D.J. (1984). Immunologic aspects of endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 6: 33-36.
200. Suginami, H. (1991). A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol.* 165(1): 214-218.
201. Sundqvist, J., Xu, H., Vodolazkaia, A. ja teised. (2013). Replication of endometriosis-associated single-nucleotide polymorphisms from genome-wide association studies in a Caucasian population. *Hum Reprod.* 28: 835–839.
202. Zanatta, A., Rocha, A.M., Carvalho, F.M. ja teised. (2010). The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet.* 27(12): 701-10.
203. Zhang, Y.L., Xia, Y., Yu, C. ja teised. (2014). CBP-CITED4 is required for luteinizing hormone-triggered target gene expression during ovulation. *Mol Hum Reprod.* 20(9): 850-60.
204. Zhao, Z.Z., Nyholt, D.R., Thomas, S. ja teised. (2008). Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 14: 531–8.
205. Zhou, H., Li, J., Podratz, K.C., Tipton, T. ja teised. (2014). Hypomethylation and activation of syncytin-1 gene in endometriotic tissue. *Curr Pharm Des.* 20(11): 1786-95.

206. Zidan, H.E., Rezk, N.A., Alnemr, A.A. ja Abd El Ghany, A.M. (2015). COX-2 gene promoter DNA methylation status in eutopic and ectopic endometrium of Egyptian women with endometriosis. *J Reprod Immunol.* 112: 63-7.
207. Zilberman, D. ja Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development.* 134: 3959-65.
208. Zondervan, K.T., Treloar, S.A., Lin, J., ja teised. (2007). Significant evidence of one or more susceptibility loci for endometriosis with near-Mendelian inheritance on chromosome 7p13-15. *Hum Reprod.* 22: 717-728.
209. Zuo, T., Tycko, B., Liu, T.M. ja teised. (2009). Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics.* 1(2): 331-45.
210. Tate, P. H. ja Bird, A. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Biol.* 3: 226-231.
211. Treloar, S.A., O'Connor, D.T., O'Connor, V.M. ja Martin, N.G. (1999). Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril.* 71: 701-710.
212. Treloar, S.A., Wicks, J., Nyholt, D.R. ja teised. (2005). Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet.* 77: 365-376.
213. Trovó de Marqui, A. B. (2012). Genetic polymorphisms and endometriosis: contribution of genes that regulate vascular function and tissue remodeling. *Rev Assoc Med Bras.* 58(5): 620-32.
214. Tsudo, T., Harada, T., Iwabe, T. ja teised. (2000). Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil. Steril.* 73: 205-211.
215. Turkyilmaz, E., Guner, H., Erdem, M. ja teised. (2012). NLF2 gene expression in the endometrium of patients with implantation failure after IVF treatment. *Gene.* 508(1): 140-3.
216. Uno, S., Zembutsu, H., Hirasawa, A. ja teised. (2010). A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet.* 42(8): 707-710.
217. Uzan, C., Cortez, A., Dufournet, C. ja teised (2004). Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometriotic tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-2, -3 and -11, and of tissue inhibitor metalloproteinases-1 and -2. *Virchows. Arch.* 445: 603-609.

218. Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A. ja teised. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 397: 405-409.
219. Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I. ja Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*. 90(1): 7-24.
220. Wang, D., Chen, Q., Zhang, C. ja teised. (2012). DNA hypomethylation of the COX-2 gene promoter is associated with up-regulation of its mRNA expression in eutopic endometrium of endometriosis. 17: 12. doi: 10.1186/2047-783X-17-12.
221. Warner, M., Eskenazi, B., Mocarelli, P. ja teised.(2002). Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect* 110:625–628.
222. Wellbery, C. (1999). Diagnosis and treatment of endometriosis. *Am Fam Physician*. 60(6): 1753-62.
223. Witz, C.A. (1999). Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol*. 42: 566-585.
224. Wu, Y., Halverson, G., Basir, Z. ja teised. (2005). Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 193(2): 371-80.
225. Wu, M.H., Lin, S.C., Hsiao, K.Y. ja Tsai, S.J. (2011). Hypoxia-inhibited dual-specificity phosphatase-2 expression in endometriotic cells regulates cyclooxygenase-2 expression. *J Pathol*. 225(3): 390-400.
226. Wu, Y., Strawn, E., Basir, Z. ja teised. (2006). Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics*. 1(2): 106-11.
227. Xu, B., Geerts, D., Bu, Z. ja teised. (2014). Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes. *Hum Reprod*. 29(4):781-90.
228. Xue, Q., Lin, Z., Cheng, Y.H. ja teised. (2007). Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod*. 77(4): 681-7.
229. Xue, Q., Lin, Z., Yin, P. ja teised. (2007). Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(8):3261-7.
230. Xue, Q., Zhou, Y.F., Zhu, S.N. ja Bulun, S.E. (2011). Hypermethylation of the CpG island spanning from exon II to intron III is associated with steroidogenic factor 1 expression in stromal cells of endometriosis. *Reprod Sci*. 18(11): 1080-4.

231. Xue, Q., Xu, Y., Yang, H. ja teised. (2014). Methylation of a novel CpG island of intron 1 is associated with steroidogenic factor 1 expression in endometriotic stromal cells. *Reprod Sci.* 21(3): 395-400.
232. Yamagata, Y., Nishino, K., Takaki, E. ja teised. (2014). Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One.* 9(1): e83612. doi: 10.1371/journal.pone.0083612. eCollection 2014.
233. Yang, M., Park, M.S., Lee, H.S. ja teised. (2006). Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 24(2): 183-224.
234. Ylikorkala, O. ja Kauppila, A. (2008). Endometriosis. A. Kauppila (toim). *Sünnitusabi ja günekoloogia.* (lk. 99-108). Tallinn: Medicina.

### **Kasutatud veebiaadressid**

[http://www.endo-resolved.com/surgical\\_procedures.html](http://www.endo-resolved.com/surgical_procedures.html)

[http://www.affymetrix.com/catalog/131461/AFFY/Human+Promoter+1.0R+Array#1\\_1](http://www.affymetrix.com/catalog/131461/AFFY/Human+Promoter+1.0R+Array#1_1)

[http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet\\_dna\\_methylation\\_analysis.pdf](http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_dna_methylation_analysis.pdf)

[http://www.illumina.com/products/methylation\\_450\\_beadchip\\_kits.html](http://www.illumina.com/products/methylation_450_beadchip_kits.html)

## **Lihtlitsents**

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

Mina, Kertu Liis Krigul (09.12.1992),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „DNA metülatsioonimustri roll endometrioosi kujunemises,“ mille juhendajad on Merli Saare ja Liis Leitsalu

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

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

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 09.05.2016