

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

Kaisa Aruaas

**Endometrioosi harvade ja sagedaste variantide ülegenoomsed
assotsiatsiooniuuringud Eesti populatsioonis**

Magistritöö

30 EAP

Juhendaja: Reedik Mägi, PhD

TARTU 2016

SISUKORD

Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 Endometriosis.....	5
1.2 Endometriosisi staadiumid.....	6
1.3 Endometriosisi diagnoosimine ning ravi	7
1.4 Endometriosisi kujunemise teooriad	8
1.5 Endometriosisi patogeneesimehhanismid.....	10
1.6 Endometriosis ja infertiilsus	13
1.7 Geneetilised tegurid haiguse kujunemises	14
1.7.1 Kandidaatgeenidel põhinevad assotsiatsiooniuuringud (CGAS).....	14
1.7.2 Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringuid (GWAS)	15
1.8 Endometriosisi seotus kehamassiindeksiga	17
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1 Töö eesmärk.....	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1 Valim.....	19
2.2.2 Genotüüpiseerimine	20
2.2.3 Kvaliteedikontroll	21
2.2.4 Imputatsioon	21
2.2.5 Statistiline analüüs	22
2.2.5.1 Sagedaste variantide analüüs.....	22
2.2.5.1 Harvade variantide analüüs.....	23
2.3 Tulemused	24
2.3.1 GWAS.....	24
2.3.2 Harvade variantide analüüs.....	25
2.3.3 Mittesünonüümsed variandid geeni kaupa.....	27
2.3.4 LOF variandid geeni kaupa.....	28
2.4 Arutelu.....	29
Kokkuvõte	34
Resümee/Summary	36
Tänuõnad	38
Kasutatud kirjandus.....	39

Kasutatud lühendid

CGAS–kandidaatgeenidel põhinevaid assotsiatsioonianalüüsid (*Candidate Gene Association Study*)

COX-2–tsüklooksügenaas (*cyclooxygenase-2*)

CR–markerite protsentuaalne osakaal (*Call Rate*)

DAG–diatsüülglütserool (*diacylglycerol*)

DEHP–di(2-etiül-heksüül)ftalaat (*Bis(2-ethylhexyl) phthalate*)

DES–dietiülstilböstrool ehk sünteetiline östrogeen (*diethylstilboestrol*)

EDC–endokriinsüsteemi kahjustavad kemikaalid (*endocrine disrupting chemicals*)

EGCUT– Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (*Estonian Genome Center, University of Tartu*)

GWAS–ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (*Genome-Wide Association Study*)

HWE–Hardy-Weinbergi tasakaalustatus (*Hardy-Weinberg equilibrium*)

IBD–eellaselt päritud alleelid (*identical by descent*)

IL–interleukiin (*interleukin*)

IP3–inositooltrifosfaat (*Inositol trisphosphate*)

KMI–kehamassiindeks (*body mass indeks*)

MAF–harvema alleeli sagedus (*Minor Allele Frequency*)

MRT– magnetresonatstomograafia (*Magnetic Resonance Tomography*)

NK-rakkud– loomulikud tapjarakkud (*natural killer cells*)

PGE₂–prostaglandiin E₂ (*prostaglandin E₂*)

RFC1–membraanvalk (*reduced folate carrier*)

SNP–ühenukleotiidsed polümorfismid, (*single nucleotide polymorphism*)

TNF- α –tuumornekroosifaktor α (*Tumor necrosis factor α*)

TGF- β –kasvufaktor β (*Transforming growth factor β*)

TCDD–2,3,7,8-tetraklorodibenso-para-dioksiin (*2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin*)

UBR2–E3 ubikvitiinsõltuv valgu ligaas (*E3 ubiquitin-protein ligase*)

VEGF–vaskulaarne endoteeli kasvufaktor (*vascular endothelial growth factor*)

Sissejuhatus

Endometriosis on günekoloogiline haigus, mis mõjutab naiste reproduktiivtervist ning elukvaliteeti. Haigus esineb 7–10% noortest naistest ning taandub menopausiga. Endometriosisi iseloomustab endomeetriumi sarnase koe asumine ning talitlemine väljaspool emakat. Kuigi mõnedel naistest möödub haigus asümptomaatiliselt, kaasneb enamusel endometriosisiga valulik menstruatsioon, alakõhuvalud ning ka viljatus.

Vaatamata endometriosisi suhteliselt kõrgele esinemissagedusele, ei ole haiguse etioloogia ja patogeenes täielikult teada. Tõenäoliselt on endometriosis multifaktoriaalne haigus, mida põhjustavad mitmete erinevate tegurite koosmõju. Välja on toodud erinevaid teooriaid, kuid ükski ei suuda haiguse olemust ja tekkimist täielikult selgitada. Endometriosisi teket ja kulgu võivad mõjutada geneetilised tegurid, hormonaalsed muutused, immuunsüsteemi häired kui ka keskkonnafaktorid. Lisaks on pakutud välja, et erinevatel endometriosisi haigustüüpidel võivad olla erinevad tekkepõhjused.

Üheks peamiseks endometriosisi kujunemist mõjutavaks teguriks peetakse geneetilisi faktoreid. Endometriosisihaigete esimese astme sugulastel on risk haigestuda seitse korda kõrgem kui üldpopulatsioonil. Endometriosisi geneetilise tausta väljaselgitamiseks on kasutatud erinevaid uurimismeetodeid. Läbi on viidud suur hulk kandidaatgeenidel põhinevaid kui ka ülegenoomseid assotsiatsioonianalüüse. Enamus haigusega seotud variantidest iseloomustavad raske taseme endometriosisi geneetilisi faktoreid.

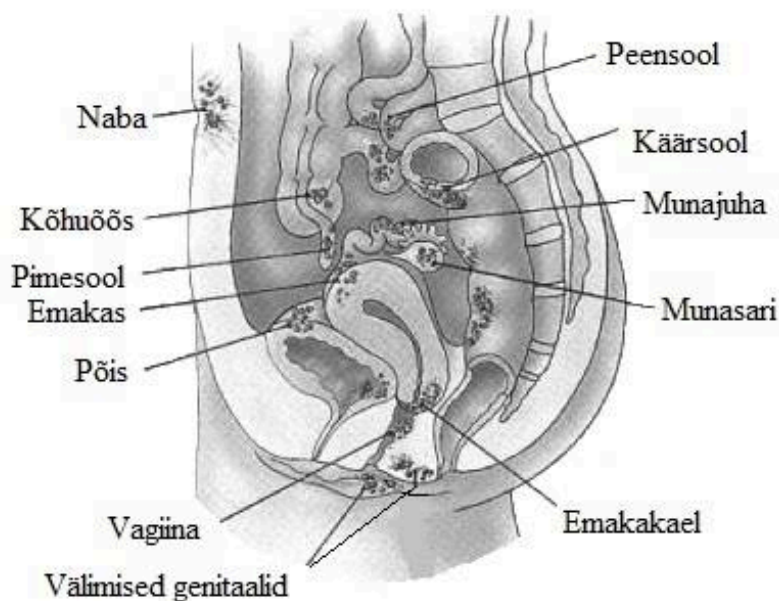
Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida endometriosisi seost sagedaste ja harvade geneetiliste variantide vahel Eesti populatsioonis, viies läbi ülegenoomse assotsiatsiooniuringu. Lisaks identifitseerida endometriosisi tekke riski tõstvaid harvu geneetilisi variante. Selleks teostati ühe markeri põhised analüüsid ja geenipiirkondade põhised analüüsid vaadeldes harvasid variante antud geenipiirkonnas. Töö on osa suuremast konsortsiumi metaanalüüsist.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Endometriosis

Endometriosis on günekoloogiline haigus, kus endomeetriumi sarnane kude asub ja talitleb väljaspool emakaõõnt (Kennedy jt., 2005). Endometriosisi peetakse östrogeen-sõltuvaks haiguseks, millele on iseloomulik endometrioidse strooma ja näärmete esinemine endometriosisikolletes. Väljaspool emakat paiknev kude allub organismi tsüklilistele hormonaalse tasakaalu muutustele ning kasvab ja irdub perioodiliselt. Kõhuõõnde kogunenud veri tekitab põletikulisi ja liitelisi protsesse, mille tagajärjel tekivad alakõhuvalud. Endometriosisiga seotud alakõhuvalud esinevad enamasti juhtudest menstruaaltsükli algul, kuid võivad kulgeda kogu menstruaaltsükli vältel (Kennedy jt., 2005). Lisaks alakõhuvalule esinevad sümptomid nagu valulik menstruatsioon, valulik suguühe, valulik urineerimine, vaagnapiirkonna kroonilised valud ja sageli ka viljatus (Berkley jt. 2005; Giudice ja Kao, 2004). Samas 20–25% juhtudest kulgeb haigus asümptomaatiliselt (Bulletti jt., 2010).

Reproduktiivses eas olevate naiste üldpopulatsioonis on endometriosisi sagedus 5–10%. Kuni 55% viljatutest naistest, kellele tehakse laparoskoopia uuring, diagnoositakse endometriosis (Cramer jt., 1986). Haiguskoldeid võib esineda kõikidel kõhuõõne elunditel. Kõige sagedamini leiab haiguskoldeid munasarjades, emakal, munajuhadel, kõhukelmel, soolestiku pinnal, põies, kusejuhadel ning väikese vaagna sidekoes (Giudice ja Kao, 2004). Sagedased haiguskolded on näidatud joonisel 1. Harvemini on koldeid leitud kopsudel, kesknärvisüsteemis, rinnakelmel, diafragmal, südamepaunal ja operatsiooniarmidel (Comiter, 2002; Giudice ja Kao, 2004). Harvadel juhtudel on ka meestel, kes on eesnäärmevähi raviks saanud östrogeenipreparaate, leitud kõhuõõnes endometriosisikoldeid (Martin ja Hauck, 1985). Teismeliseeas enne menstruaaltsükli algust on endometriosis haruldane ning haigus enamasti taandub menopausi järel (Kauppila ja Ylikorkala, 2008).



Joonis 1. Sagedasemad endometriosisikollete esinemise kohad. Haiguskoldeid võib esineda kõikidel kõhuõõne elunditel. Kõige sagedamini leiab haiguskoldeid munasarjades, munajuhadel, põies, kusejuhadel, sooltepiindadel, kõhukelmel ning väikese vaagna sidekoes. (Muudetud joonis pärineb veebilehelt http://www.familyhealthonline.ca/fho/womenshealth/WH_painfulmens_FHd95.asp)

1.2 Endometriosisi staadiumid

Endometriosisi haiguskolde peamised tunnused on endometriaalsed rakud, krooniline veritsus ja põletikuline reaktsioon, mis põhjustab kõhuõõne armistumist ja adhesioonide moodustumist. Tänapäeval on kasutusel Ameerika Reproduktiivmeditsiini Ühingu poolt välja töötatud klassifitseerimissüsteem. Tänu sellele saab erinevate tunnuste ja haiguse tõsiduse järgi jagada endometriosisi nelja raskusastmesse (ASRM, 1997). Eristatakse I taseme ehk minimaalse astme, II astme ehk kerge astme, III astme ehk mõõduka astme ja IV astme ehk raske astme endometriosisi. Kõige sagedasemad on minimaalne või kerge endometriosis, mille korral leitakse kõhust üksikuid pindmisi koldeid. Munajuhad on läbitavad, kuid munasarjade ümber võib leida endometriiumi liiteid. Kerge endometriosisi puhul võib esineda viljatust, kuid kaebused võivad ka puududa. Mõõduka astme endometriosisi korral on koldeid rohkem ning nad on sügavamad ja liidete hulk kõhuõõnes suurenenud. Munajuhad võivad olla adhesiooni tõttu läbimatud ning munasarjad tsüstide tõttu kahjustunud. Raske astme endometriosisi korral on sümptomid veelgi võimendunud ning lisaks munasarjadele ja -

juhadele on ka emakas tõsiselt kahjustatud (ASRM, 1997). Antud klassifitseerimissüsteemi abil on võimalik küll määrata haiguse tõsidus, kuid ei saa hinnata haige valu ulatust, rasestumisvõimalust ning viljatuse riski (Audebert jt., 1991).

Tavaliselt eristatakse kolme tüüpi endometrioosi, vastavalt nende kollete paiknemisele: peritoneaalne ehk kõhuõõne endometrioos, ovariaalne ehk munsasarja endometrioos ja rektovaginaalne endometrioos (Nisolle ja Donnez, 1997). Peritoneaalse endometrioosi iseloomustavad punakad, sinakas-mustjad ning valkjad pindmised kolded kõhuõõne elunditel. Noored kolded on punast värvi. Iga menstruatsiooniga eritub kolletest verd, mis jääb põletikureaktsiooni tõttu kapslisse kinni, mille tulemusel kolded kasvavad ning eraldunud veri värvib punakad kolded sinakas-mustjaks (Nisolle jt., 1993). Siiani teadmata põhjustel vahel endometrioosikolded paranevad ning nendest jäävad alles valkjaskollased armitaolised kolded, mis võivad siiski mõne aja pärast taas kasvama hakata (Nisolle ja Donnez, 1997). Ovariaalse endometrioosi korral on tüüpiliseks leiuks vanast verest ja rakumassist tekkinud tumepruunid põisjad moodustised ehk tsüstid, mis on munasarjade sisse sopistunud (Hudgesdon, 1957). Lisaks põhjustavad tsüstid ka põletikke, mille tulemusel võivad munasarjade ja emaka ümber kasvada liidesed (Brosens, 1994). Sügava nodulaarse endometrioosi korral võivad kolded tekkida uterosakraalsidemetel, retrovaginaalses vaheseinas, utero-ovariaalsidemetel ja vaagna elundite lihaselises seinas. Kollete erinevad alatüübid võivad esineda kas ühe alatüübiga või siis omavahel kombineeritult (Burney ja Giudice, 2012).

1.3 Endometrioosi diagnoosimine ning ravi

Haigust on raske diagnoosida, sest sageli aetakse sümptomid ja tunnused segamini teiste haigustega või kulgeb haigus ilma sümptomiteta. Sageli ei pöörata noortel naistel tähelepanu valusatele menstruatsioonidele ning haiguse diagnoosimiseni võib minna aastaid (Huang jt., 2011). Esmasel uuringul kasutatakse kollete ulatuse kindlaks tegemiseks ultraheli (American Fertility Society, 1979). Ultraheli on küllaltki ebatäpne meetod, kuid asendamatu munasarja tsüstide tuvastamiseks. Kõige täpsem ning enim kasutatud diagnoosimise meetod on laparoskoopia. Uuring võimaldab ka eemaldada kõhuõõnes paiknevaid endometrioosikoldeid (Ballard jt., 2006). Laparoskoopia on invasiivne meetod ja tihti on tulemuseks hilinenud diagnoos ja ravi, eriti just sümptomaatiliste puberteedieas neiu ning noorte naiste puhul. Selle tulemusel on haigus levinud ja esineb rohkem koldeid. Lisaks on laparoskoopia puhul

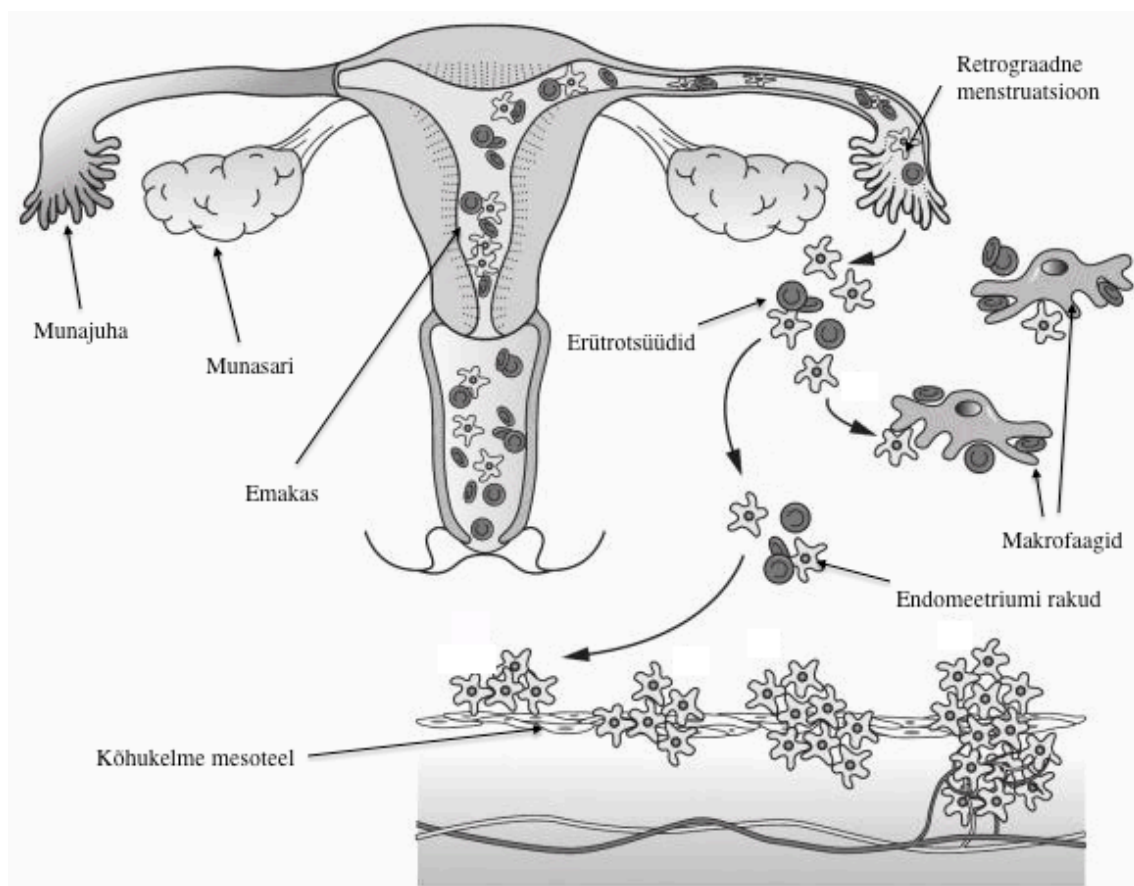
suured piirangud kõhuõõne ja retroperitoneaalsete kahjustuste visuaalsel kontrollil (Brosens jt., 2003). Seetõttu kasutatakse laparoskoopia kõrval ka vajadusel magnetresonatstomograafiat (MRT). Selle abil saab visualiseerida organitel olevaid haiguskoldeid ning hinnata kaudselt haiguse raskustaset. Kuna tehnoloogia areneb kiiresti üritatakse pidevalt parandada visualiseerimise erinevaid tehnikaid ning leida haiguse diagnoosimiseks sobilikke molekulaarseid markereid (Aznaurova 2014).

Endometrioosi tuleks vaadelda kui kroonilist haigust, mida iseloomustab vaagna valu ja viljatus. Ravi määratakse igale naisele personaalselt olenevalt haiguse raskusastmest, viljatuse tõenäosusest ning vanusest (Bulletti jt, 2010). Olenevalt haiguse keerukusest määratakse kas erinevad ravimid, operatsioon või nende kombinatsioon. Peamiselt kasutatakse hormonaalseid preparaate vähendamaks menstruatsioonil endomeetriumi eralduva vere kogust. Tänu preparaatidele vähenevad ka kõhuõõnes olevate endometriosikollete veritsus ning haigusest põhjustatud valu (Huang 2008). Endometriosist tekkinud probleeme ja kahjustusi on võimalik leevendada, aga siiani ei osata haigust täielikult välja ravida. Pikaajase hormonaalse ravi tulemusel vähenevad endometriosikolded ja võib ka paraneda rasestumisvõime. Sageli endometrioos siiski taasägeneb pärast ravi lõpetamist (Kennedy jt., 2005).

1.4 Endometrioosi kujunemise teooriad

Vaatamata endometrioosi suhteliselt kõrgele esinemissagedusele, ei ole haiguse etioloogia ja patogenees täielikult teada. Välja on toodud erinevaid teooriaid, kuid ükski ei suuda haiguse olemust ja tekkimist täielikult selgitada. Tuntuimad nendest on implatatsiooniteooria ja tsöloomse metaplaasia teooria. Implatatsiooniteooria kohaselt liiguvad endomeetriumi rakud retrograadsel ehk äraspidisel menstruatsioonil läbi munajuhade kõhuõõnde kus kinnitub sealsetele organitele ning moodustab haiguskoldeid (Sampson, 1927a). Implatatsiooniteooria on visuaalselt selgitatud joonisel 2. Teooria kasuks räägib see, et menstruatsiooniverest ning peritoneaalsest vedelikust on leitud elujõuliseid endomeetriumi rakke ning haigus esineb sageli naistel, kellel esineb retrograadne menstruatsioon (Olive ja Henderson, 1987). Sampson pakkus välja ka teooria, et endometrioosi rakud võivad levida verega ja lümfivedelikuga (Sampson, 1927b). Seda toetavad endomeetriumi koe leiud emaka veresoontes, lümfisoontest ja –sõlmedest ning sellega põhjendas Sampson kollete esinemist ebatüüpilistes asukohtades nagu näiteks kopsudel või kesknärvisüsteemis (Aoki, 1967; Sampson, 1927a). Ilmselt pole

siiski endometriosirakkude liikumine verega või lümfiga kõige olulisem haiguse kujunemisel, sest maksa, kopsu ja rindkere endometrioos on pigem harv nähtus (Donnez jt, 2012). Kumbki teooria ei suuda ära põhjendada miks esineb endometrioos meestel, menopausis naistel ning noortel naistel, kellel pole veel menstruatsioon alanud (Brosens jt., 2013b). Lisaks esineb endometrioos vaid 10-15% naistest kellel on retrograadne menstruatsioon (Halme jt., 1984). Seega peavad haiguse kujunemisel rolli mängima ka teised tegurid, mida Sampsoni poolt pakutud teooriad ei selgita.



Joonis 2. Implatatsiooniteoorial põhinev endometrioosi rakkude liikumine kõhuõõnde.

Retrograadse menstruatsiooni käigus liiguvad endomeetriimirakud koos erütrotsüütidega läbi munajuhade kõhuõõnde. Endomeetriimirakud suudavad vältida indutseeritud põletikusignaali ning tänu makrofaagidele on võimelised vältima kõhuõõnes apoptoosi. Seejärel kinnituvad rakud kõhukelme või mõne organi mesoteelile ning prolifereeruvad. Mesoteelil arenevad haiguskolded teadmata mehhanismide abil vajaliku verevarustuse ning kasvavad ja irduvad menstruatsiooni ajal nagu emakasisene endomeetrium (aluseks Donnez jt., 2012).

Tsöloomse metaplaasia teooria järgi võib tsöloomne kude transformeeruda endomeetriumi sarnaseks koeks. Kuna tsöloomsest epiteelist areneb välja nii Mülleri juhad kui ka rinna- ja kõhukelme, siis seletab see ka kollete paiknemist väljaspool vaagnapiirkonda (Donnez jt, 2012). Metaplaasia tekkepõhjusteks võivad olla tundmatud stiimulid,

hormonaalse tasakaalu muutused, endokriinsüsteemi kahjustavad kemikaalid või põletikulised protsessid (Burney ja Giudice, 2012; Crain jt., 2008). Tsöloomne metaplaasia seletaks endometriosikollete esinemist meestel, eelpuberteedi eas tüdrukutel ja naistel, kellel on menopaus (Oliker ja Harris 1971; Schiffrin jt., 1973). Selles teoorias esineb vasturääkivusi. Noortel naistel, kellel pole veel menstruatsioon alanud ei toimu östrogeeni tootmist. See on aga oluline hormoon endomeetriumi kasvamiseks ning irdumiseks. Seega võib eelpuberteediealistel naistel esinev endometrios erineda reproduktiiveas esinevast vormist (Figueira jt., 2011). Samuti peaks endometrioosi sagedus vanusega tõusma koos metaplaasia esinemissagedusega (Burney ja Giudice, 2012). Kuna endometrioosi esineb ka väljaspool rinnakut ning kõhukelmet ei pruugi antud teooria erinevaid endometrioosi vorme selgitada (Brosens jt., 2013a).

Endometrioosi kujunemise vähem tõestatud teooriad on embrüonaalsete rudimentide, induktsiooni- ja tüvirakkude teooriad. Tuginedes embrüonaalsete rudimentide teooriale, võivad kolded tekkida embrüonaalse arengu ajal Mülleri juha migratsioonil alles jäänud rakkudest östrogeeni mõjul (Burney ja Giudice, 2012). Induktsiooniteooria kohaselt eritab kõhuõõnde sattunud endomeetriumi rakud endogeenset tundmatut biokeemilist või immunoloogilist ainet, mis stimuleerib mesenhümaalseid rakke diferentseeruma endomeetriumilaadseks koeks (Szczepanska jt., 2003; Shanti jt., 1999). Endomeetriumi tüvirakud aitavad kaasa uue endomeetriumi kasvamisele pärast menstruatsiooni. Tüvirakkude teooria järgi satuvad retrograadsel menstruatsioonil endomeetriumi tüvirakud läbi munajuhade ning lümfi- ja veresoonte kaudu emakavälisesse piirkonda (Sasson ja Taylor, 2008). Kinnituses kõhuõõne organitele, põhjustavad rakud uute kollete tekkimist ning suurenemist. Kõigil mainitud teooriatel on puudused, mistõttu ei saa kindlalt väita, milline neist haigust põhjustab. Kindlasti mängivad suurt rolli haiguse patogeneesimehhanismid ning on ka võimalus, et erinevates piirkondade endometriosikolletel võivad olla erinevad tekkepõhjused.

1.5 Endometrioosi patogeneesimehhanismid

Erinevad patogeneesi teooriad näitavad, et endometrios on keeruline ja multifaktoriaalne haigus, mille väljakujunemises ja levikus mängivad rolli hormonaalsed, geneetilised, immuunsüsteemi ning keskkonna komponendid. Üks võimalus, miks endomeetriimirakud saavad kõhukelmele kinnituda, on organismi immuunsüsteemihäireid. Immuunsüsteemi

häirete korral ei suuda immuunsüsteem hävitada väljaspoole emakat sattunud endomeetriumi rakke. Selle põhjustajaks peetakse T-rakkude vahendatud tsütotoksilisuse vähenemist ja NK-rakkude (*natural killer* ehk loomulike tapjarakkude) aktiivsuse vähenemist (Dmowski jt, 1981; Somigliana jt., 1996). Lisaks on täheldatud B lümfotsüütide aktiivsuse tõusu, mille tulemusel on endometriosisihaige naise vereseerumist leitud autoantikehi mis on suunatud emaka ja endomeetriumi antigeenide vastu (Mathur , 2000). Antikehad võivad mõjutada nii endometriosisi patogeneesi, emaka limaskesta kúpsemist kui ka põhjustada endometriosisihaigel naisel raseduse katkemist (Inagaki jt., 2005). Sageli on endometriosisi põdeval naisel ka mõni muu vähenenud autoimmuunsusega seotud haigus, näiteks põletikuline soolehaigus, kilpnäärme alatalitus või erinevad allergiad. Ei ole teada, kas need haigused põhjustavad endometriosisi või tekivad endometriosisi tüsistustest (Sinaii jt., 2002; Jess jt., 2012).

Endometriosisi korral on kõhuõõne vedelikus täheldatud põletikufaktorite taseme ning makrofaagide hulga tõusu. Makrofaagid mängivad olulist rolli fagotsütoosis, põletikureaktsioonis ja homöostaasis (Murray ja Wynn, 2011). Katsed hiirudelitel on näidanud, et endomeetriumi rakke kinnitub ka ilma makrofaagideta kõhukelmele, kuid ei ole võimeline sellel kasvama. Seega on nad vajalikud haiguskollete kasvamiseks ning makrofaagid on mitmete kemokiinide allikateks, mis aitavad kolletel kõhuõõnes areneda (Bacci jt., 2009). TGF- β (kasvufaktor β) on üks peamisi tsütokiine, mille sekretsioon on tänu makrofaagidele suurenenud. TGF- β kontsentratsioon tõuseb tavaliselt operatsioonijärgselt haava piirkonnas ning aitab kaasa rakkude adhesioonile. Arvatakse, et ka endometriosisi puhul aitab TGF- β kaasa endometriosisi liideste tekkimisele. Lisaks on peritonealvedelikus suurenenud tsütokiinide IL-1 (interleukiin-1), IL-6 (interleukiin-6), IL-10 (interleukiin-10) tase (Wieser jt., 2002). IL-1 vastutab põletikureaktsiooni eest. IL-1 α ja IL-1 β vabanemine epiteelirakkudest ja seondumine omavahel tekitab põletikureaktsiooni. IL-1 antagonist IL-1Ra takistab kahe subühiku seondumist ning sellega hoiab ära põletikureaktsiooni signaali edasi kandumise. Endometriosisihaigetel naistel on endometriosisi varajases staadiumis täheldatud antagonistide taseme langust (Kondera-Anasz jt., 2005). Bergqvisti töögrupp avastas, et väljaspool emakat asuvates endomeetriumi kolletes on IL-1 β tase kõrgem kui haigete ja tervete naiste eutoopilises endomeetriumis (Bergqvist jt., 2001). Sellest saab järeldada, et IL-1 tsütokiinide põletikuvastus küll indutseeritakse haiguskolletes, kuid immuunsüsteemi rakkude võime põletiku vastu võidelda on vähenenud. Lisaks sekreteerivad makrofaagid ka tsütokiini TNF- α (tuumornekroosifaktor α), mida on leitud kõhuõõne vedelikus kerge taseme või alles algstaadiumis oleva endometriosisi korral (Harada jt., 1997). Seega arvatakse, et TNF- α aitab

kaasa uute haiguskollete kasvamisele ning on leitud ka korrelatsioon TNF- α kontsentratsiooni ning haiguskollete suuruse vahel (Pizzo jt., 2002). IL-1 ja TNF- α mõlemad indutseervad COX-2 (tsüklooksügenaas, *cyclooxygenase-2*) ekpressiooni, mis omakorda reguleerib PGE₂ (prostaglandiin E₂) sünteesi. PGE₂ vähendab makrofaagide tsütotoksilisust ning soodustab östrogeeni sünteesi, raku proliferatsiooni ja angiogeneesi (Wu jt., 2010). Makrofaagid toodavad IL-1 abil ka VEGF-i, mis on veresoonte endoteeli kasvufaktor. VEGF osaleb veresoonte loomises, koevigastuste parandamises ja fibroosi moodustamises (Bourlev jt., 2006) ja seega võib VEGF olulist rolli mängida endometriosikollete verevarustuse loomisel. Erinevad tsütokiinid käituvad endometriosikollete lähedal erinevalt. IL-6 mõjutab endometriosikollete kasvamist ning IL-1 ja TNF- α sekreteerimist, kuid samas vähendab NK-rakkude tsütotoksilisust endomeetriumorakkude vastu (Kang jt., 2014). Tsütokiinide ja kemokiinide käitumine ning vajalikkus haiguse arengul on veel segane, kuid arvatakse, et neid on vaja erinevatel endometriosikollete arenguetaapidel (Aznaurova jt., 2014).

Endomeetriumi koe kasvu reguleerivad östrogeen ja progesteron. Östrogeeni tootavad munasarjad ning väheses koguses ka nahk ning adipoosne kude. Bioaktiivse östrogeenil ehk östradioolil on tähtis roll endomeetriumi funktsionaalkihi taastamisel pärast menstruatsiooni. Endometriosi korral sünteesitakse östradiooli ka haiguskolletes, kus hormoon aitab kaasa endometriosikoe implatatsioonile ning PGE₂ kõrge kontsentratsioon võimendab hormooni tootmist (Noble jt., 1997). Östrogeeni toimet inhibeerib progesteron (Graham ja Clarke, 1997). Küll aga on leitud, et haiguskolletes on progesterooni retseptorite arv vähenenud ning kolded on hormooni vastu resistentsemad. See omakorda tähendab, et östrogeeni tootmist haiguskolletes ei kontrollita ning östrogeeni kõrge tase võib tuua kaasa kollete kasvamise (Herington jt., 2011).

Keskkonnafaktoritest seostatakse endometriosi kujunemisega endokriinsüsteemi kahjustavaid kemikaale (*endocrine disrupting chemicals*, EDC). EDC-d häirivad hormoonsüsteemi funktsioone, käitudes nagu endogeensed hormoonid. Nad võivad mõjutada hormoonide sünteesi, sekreteerimist, lagudamist ja ka transporti. On leitud, et naised, kes puutusid looteas kokku dietüülstilböstrooliga (DES) ehk sünteetilise östrogeeniga, haigestusid 80% tõenäosusega endometriosi (Missmer jt., 2004c). Reesusmakaakidel tehtud uuringutes leiti doos-sõltuv seos 2,3,7,8-tetraklorodibenso-para-dioksiini (TCDD) ja kõhuõõne endometriosi vahel (Rier jt., 1993). Mida suurema doosi ning pikemaajaliselt TCDD-d reesusmakaagile anti, seda suurem oli tõenäosus endometriosi tekkeks. Makaakidel, kellele implanteeriti inimese endomeetriumi kude tõestati, et TCDD-ga

kokkupuude mõjutab immuunsüsteemi ning selle tulemusel mõjutab endometrioosi kulgu ning haiguse süvenemist (Yang jt., 2000). Uuringud inimestega on siiani olnud vastuolulised. Endometrioosihaigetel naistel on leitud vereseerumis kõrgem TCDD tase kui kontrollidel (Mayani jt., 1997). Samas on uuringuid, mis väidavad, et TCDD ei mõjuta endometrioosi teket (Pauwels jt., 2000; Lebel jt., 1998). Leitud on ka korrelatsioon ftalaatide tasemega plasmas ja endometrioosi vahel. Uuringus leiti endometrioosihaigete naiste plasmas kõrge di(2-etiülheksüül)ftalaadi (DEHP) kontsentratsioon ning india naiste uuringus leiti seos haiguse ja ftalaadi estrite vahel (Cobellis jt., 2003; Reddy jt., 2006). Leiud keskkonna kemikaalide ja haiguse seose kohta on siiani pigem oletuslikud. Tehtud on palju katseid, kuid uuringute meetodid on erinevad ning ka valimi suurused on siiani olnud väikesed, et kinnitada leide (Birnbaum ja Cummings, 2002). Hetkel saab vaid väita, et keskkonna toksilisus mõjutab haiguse teket ja kulgu, kuid ei ole teada millisel tasemel ja kuidas.

1.6 Endometrioos ja infertiilsus

Endometrioos põhjustab sageli naistel viljakuse vähenemist. Tervetel naistel on tõenäosus rasestuda 15–20% piires ja alaneb vanuse suurenedes. Ravimata naistel on endometrioosi ja viljatuse korral vastav näitaja 2–20%; raske endometrioosi korral tõenäosus isegi väiksem kui 2% (Ozkan jt., 2008; Bulletti jt., 2010). Varasemad uuringud on näidanud, et viljatutel naistel esineb endometrioosi 25–50% juhtudest ning 30–50% endometrioosiga patsientidest on infertiilsed (Balasch jt., 1996). Endometrioosiga seotud viljatuse kui põhjuse ja tagajärje vahelise seose selgitamiseks on esitatud mitmeid patogeneesi hüpoteese. III-VI taseme endometrioosi puhul arvatakse viljatus olevat põhjustatud liidetest väikevaagnas ning kahjustustest emakas. Haiguskolded häirivad munaraku irdumist, liikumist munajuhas ja kinnitumist emakaseinale (Ozkan jt., 2008; Carvalho jt., 2012). Siiski esineb viljatust ka I ja II taseme endometrioosi korral, mis paneb aluse arvamusele, et haigust mõjutavad erinevad mehhanismid. Nende sekka kuuluvad endokriinsüsteemi ja ovulatsiooni häired, peritoneaalfunktsiooni muutused ning immuunvastuse häired kõhuõõnes. Need mehhanismid võivad kaasa tuua kahjuliku mõju nii viljastamata kui ka juba viljastatud munarakule, spermatotsüüdile, mõjutada negatiivselt munajuha motoorikat ja takistada sügoodi liikumist munajuhast emakasse (ASRM 2012). Lisaks võivad hormonaalse ja rakulise immuunsuse eripärad eutoopilises endomeetriumis häirida sügoodi kinnitumist emaka seinale.

1.7 Geneetilised tegurid haiguse kujunemises

Üheks peamiseks endometrioosi kujunemist mõjutavaks teguriks peetakse geneetilisi faktoreid. Endometrioosi perekondlikku klasterdumist on kirjeldatud nii inimestel kui ka reesusahvidel (Kennedy, 1999). Geneetilisest eelsoodumusest annab märku see, et raske astme endometrioosiga naise esimese astme sugulastel on keskmiselt seitse korda kõrgem risk endometrioosi kujunemiseks, võrreldes esimese astme sugulastega tervel naisel (vastavalt 6.9% ja 1.0%) (Moen ja Magnus, 1993). Lisaks on rasket endometrioosi vormi esinemisel täheldatud tunduvalt sagedamini perekondades kui üksikute haigusjuhtude puhul (61% vs 23%) (Bischoff ja Simpson 2004). Ka kaksikutel läbi viidud uuringud kinnitavad, et ühemunakaksikutel on kaks korda suurem risk saada endometrioos võrrelduna erimunakaksikutega, mistõttu peetakse pärilikkuse määraks umbes 50% (Moen, 1994; Treloar jt, 1998; Saha jt, 2015; Hadfield jt., 1997).

1.7.1 Kandidaatgeenidel põhinevad assotsiatsioonuuringud (CGAS)

Endometrioosi geneetilise tausta väljaselgitamiseks on kasutatud erinevaid uurimismeetodeid. Läbi on viidud suur hulk kandidaatgeenidel põhinevaid assotsiatsioonianalüüse (*candidate gene association study*, CGAS), kus otsiti ühenukleotiidseid polümorfisme (*single nucleotide polymorphism*, SNP) geenides, millel võiks olla seos haiguse avaldumisega (Rahmioglu jt., 2012a). Kokku on endometrioosi geneetilise tagapõhja mõistmiseks uuritud üle 70 kandidaatgeeni, millest kõige sagedamini uuritud geenide grupid on adhesioonimolekulide ja maatriksi ensüümide geenid, apoptoosis, DNA reparatsioonis, onkogeneesis ja rakutsükli regulatsioonis osalevad geenid ning põletikureaktsioonidega või tsütokiinidega seotud geenid, mis ühtlasi moodustavad suurima uuritud grupi (Falconer jt., 2007). Veel on uuritud steroide sünteesivate ensüümide, detoksifikatsiooni ensüümide ja retseptoritega, östradioli metabolismiga ja kasvufaktoritega seotud gene. Lisaks eelnevatele on vaadeldud ka inimese immuunsüsteemi komponentidega seotud gene ning veel teisi ensüüme ja metaboolseid radu (Rahmioglu jt., 2012). Enamik kandidaatgeeniuuringutes leitud assotsiatsioone ei replitseeru. Peamisteks põhjusteks võivad olla erinev haiguse määratlus, madal kandidaatgeenide katvus, väike valim ning ebapiisav kontrollide hulk või ka populatsiooni geneetilised erinevused uuringutes (Rahmioglu jt., 2012).

Siiani pole ükski üle 70 uuritud geenidest näidanud läbi mitme uurimistöö tugevat seost

endometriosisiga. Üks enim uuritud ning usaldusväärsemaid tulemusi andnud gene on vaskulaarse endoteeli kasvufaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Erinevate uuringute põhjal tehtud metaanalüüs näitas, et VEGF-i viiest polümorfismist üks (rs3025039) suurendab statistiliselt oluliselt endometriosisi kujunemise riski (Liang jt., 2012). Siiski ei leitud Austraalias läbi viidud mahukas uuringus haiguse seost selle polümorfismiga (Zhao jt., 2008). Kuigi paljud leitud geenid võivad olla haiguse kulgemisega seotud, ei ole siiani leitud ühelegi leiule tugevat kinnitust (Rahmioglu jt., 2012a). Kandidaatgeenide uuringud on olemuselt limiteerivad, sest eeldavad, et haiguse bioloogilised mehhanismid on teada. Endometriosisi uuringuteks sellised analüüsid ei sobi, sest haiguse etioloogia ei ole veel lõpuni kindlaks tehtud ning uurides vaid oletuslikult haigusega seotud gene, võivad jääda leidmata palju olulisemad haiguse kujunemise faktorid (Zondervan jt., 2007).

1.7.2 Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringuid (GWAS)

Endometriosisiga seotud geneetiliste variantide tuvastamiseks on kasutatud ka ülegenoomseid assotsiatsiooniuuringuid (*genome-wide association study*, GWAS) leidmaks seoseid sagedaste geenivariantidega. GWA uuringute korral võrreldakse SNP mikrokiibi andmeid patsientide ja tervete kontrollide vahel, et leida kas mõni uuritav SNP alleel esineb haigust kandvate indiviidide seas sagedamini ja võiks seega olla haiguse kujunemisega seotud. Olulisimad arengud, mis võimaldavad GWAS tänapäeval laialdaselt kasutada on sagedaste SNP dokumenteerimine ning leitud SNP-ide aheltasakaalutuse mustrite uurimine erinevate populatsioonide vahel (The International HapMap C., 2005). Esimene endometriosisi GWAS analüüs põhines Jaapani valimil. Selles leiti kaks varianti, mis seostusid endometriosisiga. Üks variant asus *DKN2B-AS1* geeni 6 intronis (rs10965235) ning teine 1p36 lookuses *WNT4* geeni läheduses (rs16826658) (Uno jt., 2010). Siiani on läbi viidud mitmeid GWAS-e, replikatsiooniuuringuid ning uuringute metaanalüüse. GWA uuringud on tänaseks seonud endometriosisiga üksteist SNP-i üheksas lookuses, mis on ülegenoomselt statistiliselt olulised ($p < 5 \times 10^{-8}$) (Uno jt., 2010; Painter jt., 2011; Nyholt jt., 2012; Albertsen jt., 2013; Treloar jt., 2005; Zondervan jt., 2007). Viimane metaanalüüs, mis kaasas varem uuringutes kinnitatud variandid, leidis 7 statistiliselt olulist SNP-i, mille efekti suund oli kõigis töodes ühesuunaline (Rahmioglu jt., 2014). Peamiselt on antud SNP-d seotud keskmise ja raske tasemega endometriosisiga (III ja IV tase). Lisaks leiti kaks integreenset lookust kromosoomis 2 (rs4141819 ning rs6734792), mille efektide suunad olid uuringute lõikes erinevad (Rahmioglu jt., 2014).

Antud metaanalüüs tõi välja mitmeid huvipakkuvaid geene nagu näiteks *WNT4*, *CDKN2B-ASI*, *GREB1*, *ID4*, *FNI* ja *IL1A*, mis võiksid olla seotud haiguse kujunemisega. SNP rs7521902 lähedal paiknev geen *WNT4* kodeerib valku, mis on oluline naiste suguorganite arenguks. Hiirtel, kellel oli *WNT4* geeni ekspressioon mahasurutud, ei arenendud välja Mülleri juha ja selle derivaadid (Vainio jt, 1999). *WNT* signaalrada on oluline endomeetriumis epiteeli ja stroomarakkude vaheliseks kommunikatsiooniks ning tõenäoliselt mängib tähtsat rolli endomeetriumi arengus, diferentseerumises ja ka embrüo implatatsioonil (Tulac jt., 2003). *FNI* geen ehk fibronektiin-1 on seotud embrüogeneesi, rakkude adhesiooni, haavade paranemise, vere hüübimise, peremeesraku kaitsevõime ja metastaasidega (Pankov ja Yamada, 2002). Leitud on, et munasarjavähi korral mängib suurt rolli FN1 regulatsioon SOX2 transkriptsioonifaktori poolt (Lou jt., 2013). See mõjutab rakkude migratsiooni ning ka adhesiooni, mis võib viia vähirakkude arenguni. *GREB1* on östrogeensõltuv geen, mis reguleerib rinnavähirakkude kasvamist. *GREB1* ekspressioon on kõrgem kõhuõõnest leitud endometriosikolletes kui emaka endomeetriumis. See võib põhjendada kollete östrogeenist sõltuvat kasvamist väljaspool emakat (Pellegrini jt., 2012). Arvatakse, et *VEZT* on kasvaja supressorgeen, mille kaudu reguleeritakse rakkude migratsiooni ja invasiooni, kasvu ja rakkude adhesiooni geene (Miao jt., 2013). Leitud on, et *VEZT* reguleerib geeni nimega *TCF19*, mis võib olla seotud immuunsüsteemi tasakaalu hoidmisega (Ferreira jt., 2009). *CDKN2B-ASI* lookus osaleb tuumorsupressor geenide nagu *CDKN2B*, *CDKN2A*, *ARF* regulatsioonis (Liu jt, 2009). Endometrioosi ja emakakaelavähi patsientidel on leitud inaktiveerunud *CDKN2B-ASI* (Goumenou jt., 2000; Martini jt, 2002). *ID4* on munasarja onkogeen ning see geen on üleekspressioneeritud munasarja, endomeetriumi ja rinnavähi rakkuliinides (Ren jt., 2012). SNP rs4141819 ja rs6734792 asuvad integreenses alas, kuid nende lähedal on geenid *ETAA1* ja *NFE2L3*. *ETAA1* kodeerib kasvajaspetsiifilist rakumembraani antigeeni Ewing sarkoomi kasvajat (Borowski jt., 2006). *NFE2L3* on transkriptsioonifaktor, mis on seotud rakkude diferentseerumisega, põletikureaktsioonidega kehas ja kartsinogeneesiga. On leitud, et *NFE2L3* ekspressioon on suurenenud rinnavähi ning munandivähi koeproovides (Rhee jt., 2008; Almstrup jt., 2007). Värskeim uuring leidis ka kaheksa SNP-i *IL1A* geenis, millest kolm olid tugevalt seotud endometrioosi III ja IV tasemega (Sapkota jt., 2014). *IL1A* geen kuulub interleukiin-1-tsütokiinide perekonda ja on seotud põletikuliste protsessidega kehas ning vereloomega.

GWAS uuringud on andnud olulist infot endometrioosiga seotud geneetiliste variantide kohta, kuid seostatud variantide efektsuurused on siiski väikesed ning seetõttu pole neid võimalik kasutada molekulaarsete markeritena otsesteks diagnostilisteks testideks (Visscher jt, 2012).

1.8 Endometriooosi seotus kehamassiindeksiga

Mittegeneetilistest faktoritest, mis mõjutavad endometriooosi haigestumist, on seni leitud kehamassiindeks (KMI). Erinevates uuringutes on täheldatud pöördvõrdelist seost KMI ja endometriooosi vahel. Tugevalt rasvunud naistel (KMI > 40) oli 39% madalam endometriooosi sagedus võrreldes ala- ja normaalkaalus olevate naistega (Shah jt., 2013). Lisaks on leitud seos KMI ja viljatute endometriooosihaigete vahel, mille kohaselt suureneb viljatuse sagedus madalama KMI-ga naiste seas (Shah jt., 2013). Kuigi kirjanduses on järjekindlalt näidatud pöördvõrdelist seost endometriooosi ja kehakaalu vahel, puudub ühtne seisukoht küsimuses, kas saledus on tekkinud haiguse tulemusel või põhjustab endometriooosi (Cramer jt., 1986; Missmer jt., 2004a,b; Parazzini jt., 2004; Ferrero jt., 2005). Samas Nagle näitas oma uuringus, et lapsepõlves kõrge KMI suurendab riski endometriooosi haigestuda (Nagle jt., 2009), kuid Vitonise uuring andis vastupidise tulemuse leides, et naised, kes olid lapsepõlves rasvunud, haigestuvad harvemini endometriooosi kui lapsepõlves saledad olnud naised (Vitonis jt., 2010). Sarnaselt endometriooosi ja KMI vahelisele seosele on leitud, et ka menopausieelne rinnavähk ning kehakaal on pöördvõrdeliselt lapsepõlve kehakaaluga seotud. (Trentham-Dietz jt., 1997; Harris jt., 2011). Seega ei saa välistada, et lapsepõlve kehakaal mõjutab haigestumise riski. Keeruline on kinnitada, et inimeste kaal või kehakuju mõjutaks endometriooosi tekkimist või kulgu, sest raske on teha selgeks, millal sai haigus alguse ning kuidas seda mõjutas elustiil või kehakaal (Shah jt., 2013).

Huvipakkuv on ka intergeenne lookus kromosoomis 7p15.2 (rs12700667). Nimelt seostatakse antud SNP-i nii endometriooosi kui ka rasva jaotumisega kehal. Kuigi siiani on väidetud, et endometriooosi tekkimine ning KMI on omavahel seotud, lükkavad värskemad GWAS ning metülatsiooniuuringud väite ümber (Rahmioglu jt., 2015). Uurides lookuse 7p15.2 poolt põhjustatud endometriooosi ja rasva jaotumise tegurite seotust, leiti, et nendevaheline korrelatsioon on tugevam kui endometriooosi ning KMI vahel. Siiski näitasid uuringud, et mida madalam on puusa-talje suhe, seda tugevam on antud lookuse efekt endometriooosi III/IV taseme tekkeks.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida seoseid endometrioosi ning sagedaste ($MAF \geq 1\%$) ja harvade geneetiliste variantide ($MAF < 1\%$) vahel kasutades uurimuses Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (EGCUT) andmestikku ning prof. Andres Salumetsa töögrupi poolt kogutud endometrioosi proove. Lisaks võrrelda varem leitud variantide replitseeritust antud valimis.

2.2 Materjal ja metoodika

Uuringu käigus viidi läbi sagedaste geneetiliste variantide ülegenoomne assotsiatsiooniuring, kasutades 1000 Genoomi Projekti (1000 Genomes Project¹) referentsile imputeeritud andmeid ning harvade variantide markeri- ja geenipõhised analüüsid, kasutades eksoomipiirkondades olevaid genotüpiseeritud harvu variante. Geneetiliste variantide defineerimiseks on antud töös kasutatud nivood, kus sagedaste variantide vähemesineva alleeli sagedus on vastavalt suurem või võrdne 1%-ga ja harvaesinevate variantide vähemesineva alleeli sagedus on väiksem kui 1%. Uuringu käigus katsetati erinevaid mudeleid, kasutades kovariaatidena indiviidide vanust, kehamassi indeksi ja suguluste maatriksi põhjal leitud nelja esimest peakomponenti, et kahandada võimalikku populatsiooni stratifikatsiooni. Analüüsiti erinevaid mudeleid:

1. vanus ja neli esimest peakomponenti
2. KMI ja neli esimest peakomponenti
3. neli esimest peakomponenti
4. vanus, KMI ja neli esimest peakomponenti

Efektihinnangud erinevatest mudelitest tulid sarnased - seepärast kirjeldan töös ainult mudelit, mis sisaldas kovariaatidena vanust, KMI ja nelja peakomponenti. Analüüsides tulemustes vastas p-väärtuse jaotus juhuslikule jaotusele, mis näitas, et populatsiooni stratifikatsioon ei mõjutanud oluliselt leitud seoseid.

2.2.1 Valim

Uurimuse läbiviimiseks kasutati prof. Andres Salumetsa töögrupi poolt kogutud endometrioosi proove ning Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonoritelt kogutud DNA proove. Valim koosneb ainult naistest. Kokku on kvaliteedikontrolli läbinud valimis 3 138 indiviidi: 326 haiget ja 2 812 kontroll. Valimis osalevatel haigetel oli endometrioos kliiniliselt kinnitatud. Küll aga puudub haiguse raskusastme iseloomustus ning ka asukoha kirjeldus. Haigete ja kontrollindiviidide vanuseline ja ealine jaotus on välja toodud tabelis 1.

¹ <http://www.1000genomes.org>

Tabel 1. Valimi ealine jaotus koos KMI-ga.

	EGV endometriooosi- haiged	Prof. Salumetsa töörupi kogutud endometriooisihaiged	EGV kontrollid	Kokku
Arv	57	269	2 812	3 138
Keskmine vanus (standardhälve)	44,7 (6,2)	32,3 (5,8)	31,5 (7,6)	36,2 (7,4)
Vanusevahemik	25-73	18-46	20-44	18-73
Keskmine KMI (standardhälve)	27,3 (5,5)	22,2 (3,5)	23,1 (5,5)	24,2 (5,4)
KMI vahemik	18,4-46,1	16,6-37,6	14,5-58,4	14,5-58,4

Käesoleva töö raames teostatavate uuringute läbiviimiseks on geenidonorid andnud informeeritud nõusoleku ning olemas on Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee kooskõlastus (luba 234/T-12).

2.2.2 Genotüpiseerimine

Indiviidide ülegenoomi genotüpiseerimine viidi läbi kasutades Illumina Infinium II tehnoloogiat (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Genotüpiseerimine teostati Illumina Infinium PsychArray BeadChip kiibiga, kasutades tootja poolt valmistatud reaktiivide komplekte ja järgides tootjafirma poolt välja töötatud standardprotokolle (www.illumina.com).

Antud kiibiga on võimalik inimese genoomist genotüpiseerida umbes 277 000 eksoomide uurimisele fokuseeritud varianti, 271 000 *tag*SNP-i (omavahel aheldunud markereid kirjeldav üksik SNP kõrge aheldusega genoomi regioonis) ning umbes 60 000 markerist, mida seostatakse sagedaste psühhiaatriliste haigustega nagu näiteks bipolaarsus, anoreksia ja skisofreenia².

Genotüpiseerimine viidi läbi Eesti Geenivaramu tuumiklaboris ajavahemikul mai- september 2014.

² <http://www.cidr.jhmi.edu/supported/Infinium%20PsychArray%20Data%20Sheet.pdf>

2.2.3 Kvaliteedikontroll

Genotüpiseerimise järgselt läbis uuritav andmestik kvaliteedikontrolli järgnevate parameetrite ning näitajate osas:

- 1) edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal (*Call Rate*, CR) nii indiviidi kui iga markeri kohta;
- 2) harvema alleeli sagedus (*Minor Allele Frequency*, MAF);
- 3) Hardy-Weinbergi tasakaalustatus (*Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE);
- 4) indiviididevaheline sugulus;
- 5) genotüübi põhjal leitud soo mitte-kokkulangevus proovi fenotüübi andmetega;
- 6) heterosügootsus.

Edasistest analüüsides jäeti välja individid, kelle CR oli $< 95\%$, liigne heterosügootsus (keskmine $+ (3 \times \text{SD})$), MDS analüüsil eurooplastest eraldi klasterduvad proovid kasutades HapMap2 (The International Hapmap Consortium, 2003) referentsi. Lähisugulusastme tuvastamiseks hinnati ühiselt eellaselt päritud alleelide (*identical by descent*, IBD) osakaalu genoomis ning madalama CR-iga vähemalt kolmanda põlve sugulane jäeti edasisest analüüsist välja. Samuti eemaldati individid, kelle raporteeritud fenotüübi sugu ei vastanud geneetiliste andmete põhjal ennustatud soole. Kokku eemaldati andmestikust 124 inimest.

Kvaliteedikontrolli käigus eemaldati SNP-d, mis ei vastanud järgnevatele kriteeriumitele: CR $< 95\%$, HWE testi p-väärtus $< 1 \times 10^{-6}$, mitte-autosomaalsed markerid ning markerid, mille genotüpiseerimisel ei suudetud usaldusväärset genotüüpe klasterdada (klastrid eraldusskoor $< 0,4$, GenTrain skoor vastavalt andmetele $< 0,6$). Sagedaste variantide imputatsiooni eelselt eemaldati uuringus markerid, mille MAF $< 1\%$ ja SNP-d, mille alleelideks olid A/T või C/G. Andmete kvaliteedikontroll ja filtreerimine viidi läbi kasutades programme Illumina GenomeStudio versioon 3.1, PLINK v1.8 (Purcell jt., 2007) ja R3.0.2 (R Core Team, 2013). Peale kvaliteedikontrolli läks sagedaste variantide analüüsi 214 287 genotüpiseeritud varianti, mille põhjal tehti imputeerimine. Kvaliteedikontrolli teostas EGCUT vanemteadur Reedik Mägi.

2.2.4 Imputatsioon

Imputeerimise abil on võimalik hinnata lisaks genotüpiseeritud markeritele ka neid, mille kohta on puudulik info. Selleks vaadeldakse lähedal olevad imputeeritud andmeid ja läbi selle ennustatakse korreleerunud geneetiliste variantide genotüüpe. Imputatsiooniks kasutatakse

referentsandmestikku, mille abil ennustatakse variantide genotüüpe ning tänu sellele tõstetakse uuringu võimsust (Spencer jt., 2009). Puuduvate genotüüpide imputatsioon viidi antud uuringus läbi programmidega SHAPEIT v2 (imputatsioonile eelnev haplotüüpide faasimine) (Delaneau jt., 2013) ja Impute v2.2.2 (Howie jt., 2009). Referentsvalimina kasutati imputatsioonil 1000 Genoomi Projekti referentshaplotüüpe (1000 Genomes Phase 3 integrated haplotypes, Oct. 2014), mis koosnesid 5008 Euroopa päritolu haplotüübist³ (Abecasis jt., 2012). Imputatsiooni järgselt eemaldati analüüsist markerid imputatsiooni kvaliteediskoori (proper_info) ja MAF-i alusel (proper_info > 0.8 ja MAF > 0.01). Pärast imputatsioon oli andmestikus 214 287 genotüpiseeritud ja imputeeritud 6 937 337 markerit.. Imputatsioon viidi läbi EGCUT teaduri Evelin Mihailovi poolt.

2.2.5 Statistiline analüüs

2.2.5.1 Sagedaste variantide analüüs

Geneetiliste markerite ja fenotüübi vahelised assotsiatsioonianalüüsid viidi läbi programmiga SNPTTEST v2.5 (Marchini jt., 2007) kasutades genotüpiseeritud ja imputeeritud geneetilisi variante MAF-ga üle 1%. Sagedaseid geneetilisi variante analüüsiti kasutades logistilist regressiooni ning kasutades aditiivset alleeliefektide mudelit. Uuringus kasutati autosomaalsete kromosoomide andmeid.

Stratifikatsiooni korrigeerimisel arvutati kasutades proovide omavahelise suguluse MDS meetodid peakomponendid programmiga PLINK. MDS meetodiga antakse populatsiooni geneetilisest varieeruvusest kvantitatiivsed näitajad, visualiseeritakse substruktuurid, ning identifitseeritakse populatsiooniväliseid indiviide. GWAS-des kasutatakse populatsiooni struktuuri hindamiseks sagedasi omavahel mitte-korreleeritud ($r^2 < 0.2$) SNP-de andmeid (Purcell jt., 2007).

Mitmesest testimisest tulenevate võimalike vale-positiivsete tulemuste vähendamiseks, loeti sagedaste variantide analüüsis statistiliselt oluliseks tulemused, mille p-väärtused olid väiksemad kui 5×10^{-8} (Pe'er jt., 2008).

³ www.1000genomes.org

2.2.5.2 Harvade variantide analüüs

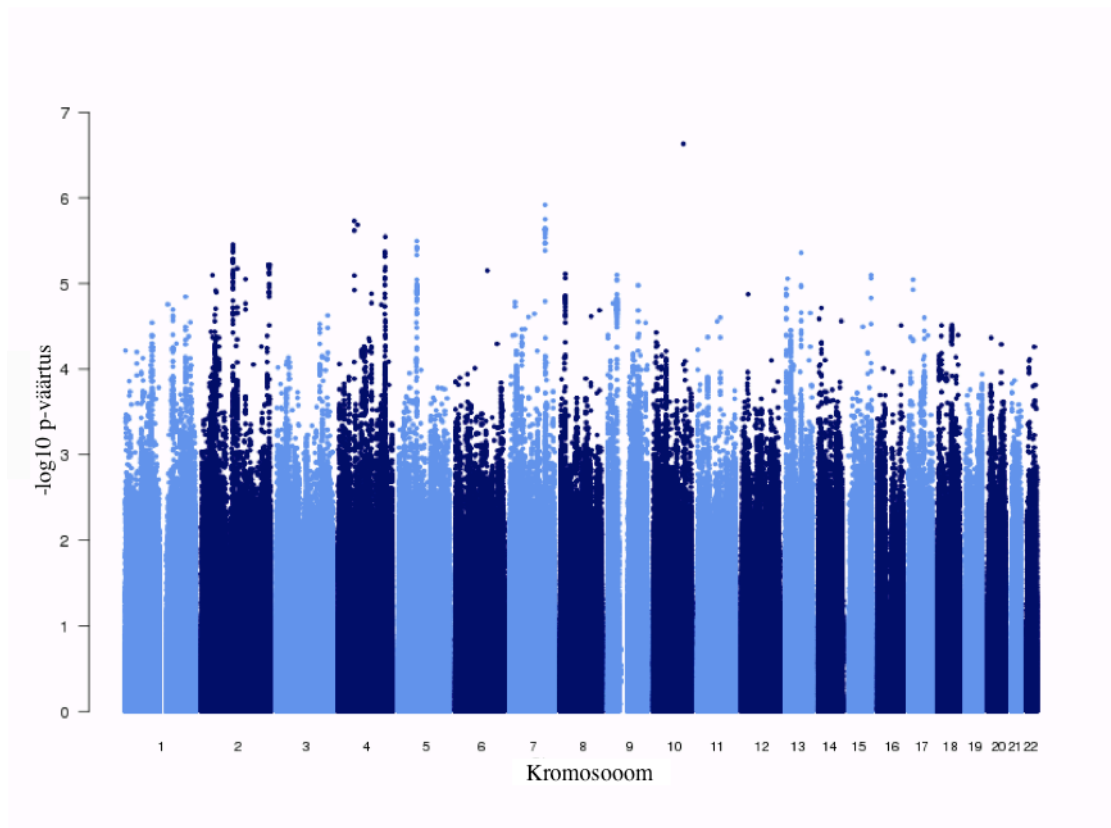
Markeri kaupa tehtud harvade variantide analüüs teostati genotüpiseeritud markeritega, mille MAF oli $< 1\%$. (EPACT genotüpiseeritud harvad variandid eksoomides (MAF $<1\%$)). Geeni kaupa analüüsides valiti geenipiirkondadest geneetilised variandid, mis olid mittesünonüümsed ja funktsioonikaoga variandid. Kovariaatidena kasutati vanust, kehamassiindeksi ja nelja esimest peakomponenti. Tööks kasutati programmi EPACTS v3.2.6 - markeri kaupa analüüsi viidi läbi kasutades logistilist Wald testi ning geeni kaupa analüüs kasutades SKAT-O testi (Lee jt., 2012).

Mitmesest testimisest tulenevate võimalike vale-positiivsete tulemuste vähendamiseks kasutati Bonferroni korrektsiooni. Bonferroni korrektsiooni kasutatakse kui samaaegselt viiakse ühel andmekogul läbi mitu sõltuvat või sõltumatut testi. Selline korrektsioon võimaldab leida olulisi tulemusi kui hüpoteeside arv testimisel suureneb. Korrektsiooni läbiviimiseks jagatakse statistiline p -väärtus (α) läbi sõltumatute testide arvuga. Antud uuringus jagatakse p -väärtus ($\alpha=0.05$) läbi kas markerite arvuga uuringus (sagedaste variantide ja harvade marker-põhiste variantide leidmisel) või geenide arvuga uuringus (harvade variantide geenipõhiste uuringutel: mittesünonüümsed ja funktsioonikaoga). Uus statistilise olulisuse piir on antud jagatise tulemus (Pe'er jt., 2008).

2.3 Tulemused

2.3.1 GWAS

Antud uurimuse GWAS-sis identifitseeriti 3138 naise (326 endometrioosihaget ja 2812 kontrolli) põhjal potentsiaalseid endometrioosiga seotud geneetilisi variante. Sagedaste variantide analüüsi raames leiti 438 varianti p-väärtusega $< 1 \times 10^{-5}$, kuid ei leitud ülegenoomselt statistiliselt olulisi ($p < 5 \times 10^{-8}$) assotsiatsioone. Ülegenoomse assotsiatsioonianalüüsi tulemused on visualiseeritud joonisel 3.



Joonis 3. Ülegenoomse assotsiatsioonianalüüsi tulemused visualiseeritud Manhattan joonisena. X-teljel on assotsieerunud markerite genoomsed positsioonid ning Y-teljel nende p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.

Eelnevalt on endometrioosiga seotud GWAS-dest leitud geneetilised variandid 1, 2, 6, 7, 9, 10, 12 kromosoomides. Variandid asuvad vastavalt geenipiirkondades: *WNT4* (1p36.12), *GREB1* (2p25), *ID4* (6p22.3), *CDKN2B-AS1* (9p21.3), *VEZT* (12q22), *FNI* (2q34) ning intergeensed piirkonnad *ETAA1* (2p14), *RDN3* (2q23.3) ja *NFE2L3* (7p15.2) geenide lähedal. Võrdlesin antud SNP-e oma tööga ja tõin välja leitud p-väärtuse ning ka nende efekti suurused. Tedaolevast 10 variandist kahe variandi (rs1537377 ja rs1333049) p-väärtused olid alla 0.05. Mõlemad variandid asuvad *CDKN2B-AS1* geenis ning nende efekt oli võrreldes Rahmioglu

metaanalüüsis välja toodud efektiga samasuunaline. Võrreldes Rahmiogu jt. metaanalüüsis leitud variantide efekte, siis olid kaheksa variandi efektid minu analüüsis sama suunaga kui metaanalüüsis ning kahe variandi (rs1250248 ja rs12700667) suunad erinevad (Tabel 1.).

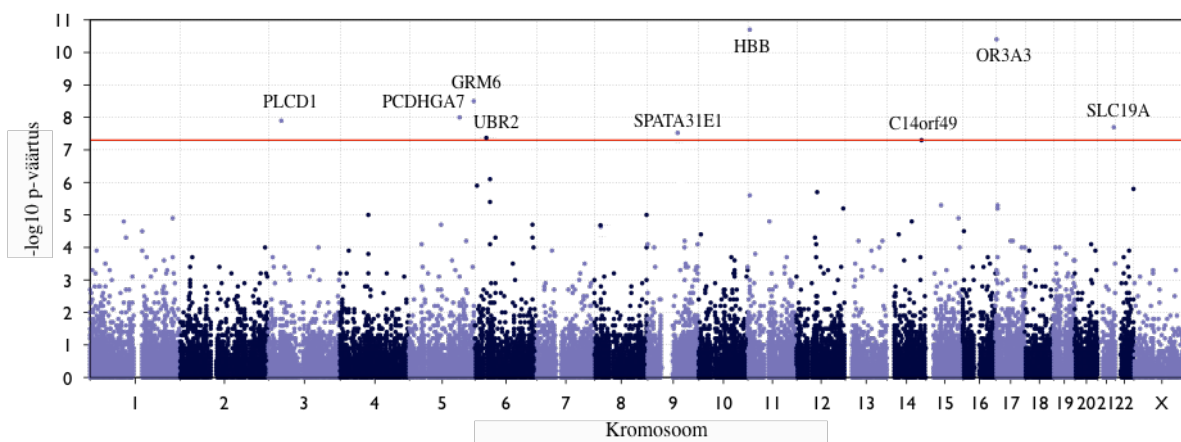
Tabel 1. Teadaolevad lookused mis mõjutavad endometriooosi kulgu. Näidatud on variantide p-väärtused ning efekti suurused meie analüüsis. Tulemusi on kõrvutatud Rahmiogu jt. metaanalüüsis leitud efekti suundadega (Rahmiogu jt., 2014).

SNP	Lähim geen	efekti alleel/ teine alleel	efekt (std. viga)	p-väärtus	efekti suund võrreldes Rahmiogu artikliga
rs7521902	WNT4	A/C	0.14 (0.09)	0.13	sama
rs1250248	FN1	G/A	0.07 (0.10)	0.46	erinev
rs13394619	GREB1	A/G	-0.05 (0.08)	0.55	sama
rs4141819	intergeenne	T/C	-0.09 (0.09)	0.31	sama
rs6734792	intergeenne	T/C	-0.06 (0.08)	0.50	sama
rs7739264	ID4	T/C	0.06 (0.08)	0.44	sama
rs12700667	Intergeenne	A/G	-0.01 (0.09)	0.96	erinev
rs1537377	CDKN2B-AS1	C/T	0.18 (0.09)	0.04	sama
rs1333049	CDKN2B-AS1	C/G	-0.17 (0.09)	0.04	sama
rs10859871	VEZT	C/A	0.10 (0.09)	0.25	sama

2.3.2 Harvade variantide analüüs

Harvade variantide ühe-markeri põhises analüüsis leiti 9 varianti, mille p-väärtus oli statistiliselt oluline peale mitmese testimise korrektsiooni ($p < 5 \times 10^{-7}$, kasutades Bonferroni korrektsiooni (0.05/markerite arv (198 472))). Markeripõhise analüüsi tulemused on visualiseeritud Manhattan joonise abil joonisel 4. Kõige madalama p-väärtusega geneetiline variant oli lookuses 11p15.5 olev chr11:5247914 (p-väärtusega 1.92×10^{-11}), mis asus *HBB* geeni teises eksonis. Lisaks olid statistiliselt olulised ka *OR3A3* geenis olev variant positsiooniga chr17:3324574 (p-väärtusega 3.6×10^{-11}), *GRM6* geenis variant chr5:178413163 (p-väärtusega 2.98×10^{-9}), *PCDHGA7* geenis variant chr5:140762533 (p-väärtusega 1.07×10^{-8}), *PLCD1* geenis variant chr3:38052041 (p-väärtusega 1.41×10^{-8}), *SLC19A1* geenis variant chr21:46951968 (p-väärtusega 2.19×10^{-8}), *C14orf49* geenis variant 14:95923590 (p-väärtusega 5.22×10^{-8}), *SPATA31E1* geenis variant chr9:90500747 (p-väärtusega 4.95×10^{-7}) ja

UBR2 geenis variant chr6:42626026 (p-väärtusega 7.10×10^{-7}). Varem pole antud variante ja genee endometrioosiga seostatud. Markeripõhise harvade geneetiliste variantide analüüsis



tuvastatud genoomsed regioonid on näidatud tabelis 2.

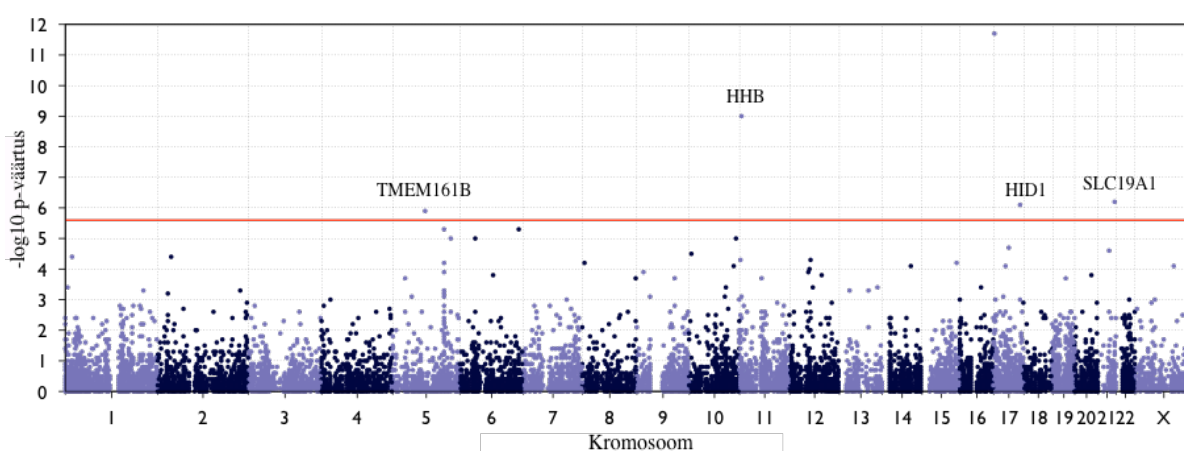
Joonis 4. Markeripõhise harvade geneetiliste variantide analüüsi tulemused visualiseeritud Manhattan joonisena. Ülegenoomselt statistilise olulisuse piiriks leiti $p < 1 \times 10^{-7}$. X-teljel on assotsieerunud markerite genoomsed positsioonid ning Y-teljel nende p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.

Tabel 2. Markeripõhise harvade geneetiliste variantide analüüsis tuvastatud genoomsed regioonid, kus leidis markereid p-väärtusega $< 1 \times 10^{-7}$.

Markeri ID	Geeni nimi	Efektialleeli sagedus haigetel	Efektialleeli sagedus kontrollidel	p- väärtus
exm882341	HBB	0.0061	0	1.92×10^{-11}
exm1277716	OR3A3	0.0107	0.0002	3.60×10^{-11}
exm509064	GRM6	0.0061	0.0002	2.98×10^{-9}
exm488613	PCDHGA7	0.0138	0.0012	1.07×10^{-8}
exm299900	PLCD1	0.0061	0.0002	1.41×10^{-8}
exm2235149	SLC19A1	0.0061	0	2.19×10^{-8}
exm1125331	C14orf49	0.0046	0	5.22×10^{-8}
exm759493	SPATA31E1	0.0138	0.0027	4.95×10^{-7}
exm547101	UBR2	0.0077	0.0005	7.10×10^{-7}

2.3.3 Mittesünonüümised variandid geeni kaupa

Mittesünonüümsete variantide geeni-põhises analüüsis leiti 4 geeni, mille p-väärtus oli statistiliselt oluline ($p < 3,0 \times 10^{-6}$ kasutades Bonferroni korrektsiooni ($0.05/\text{geenide arv}$ ($16\ 480$))). Analüüsi tulemused on visualiseeritud Manhattan joonise abil joonisel 5. Mittesünonüümsete harvade variantide analüüsis oli kõige madalama p-väärtusega *HBB* geen, mille p-väärtus on 1.00×10^{-9} . Statistilise olulisuse piiri ületasid ka lookuses 21q22.3 asuv geen *SLC19A1* (p-väärtusega 6.13×10^{-7}), lookuses 17q25.1 asuv geen *HID1* (p-väärtusega 7.99×10^{-7}) ning lookuses 5q14.3 asuv *TMEM161B* geen (p-väärtusega 1.13×10^{-6}). Statistiliselt oluliste geenide tulemused on näidatud tabelis 3.



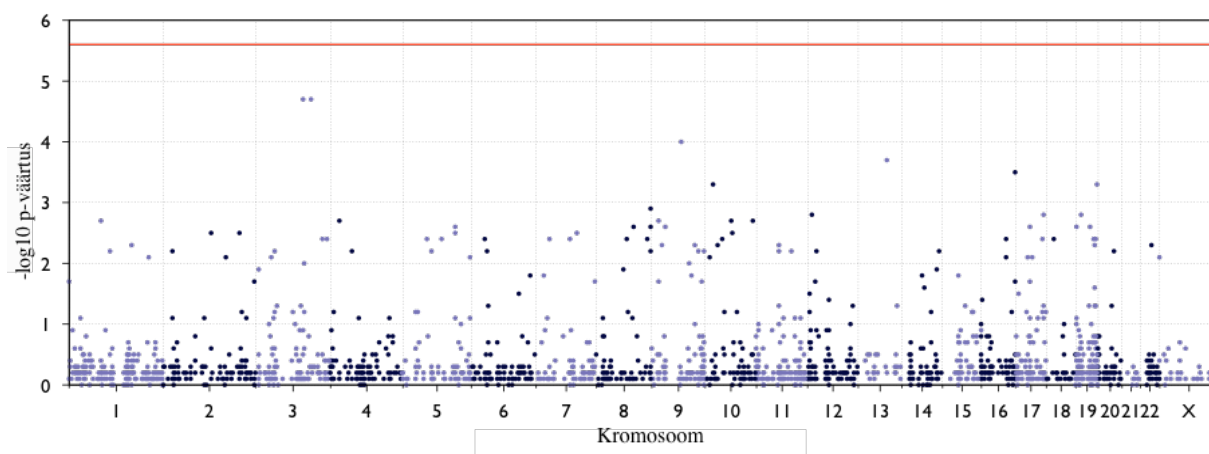
Joonis 5. Manhattan joonis harvade variantide analüüsist. Läbi viidud geeni kaupa ja kasutades mittesünonüümseid geneetilisi variante. Pärast mitmese testimise korrektsiooni leiti statistilise olulisuse piiriks $p < 3,0 \times 10^{-6}$. X-teljel on analüüsitud geenide geoomsed positsioonid ning Y-teljel nende geenide p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm. Geeni *OR3A3*, mis asub lookuses 17p13.2 osales markeripõhises harvade variantide analüüsis, kuid testi tehti ainult ühe variandi pealt ja seetõttu on ära märgitud joonisel, kuid tulemustest välja filtreeritud. Antud varianti käsitletakse juba üksikute variantide analüüsis.

Tabel 3. Markeripõhise harvade geneetiliste variantide analüüsi tulemused. Analüüsis kasutati mittesünonüümseid geneetilisi variante ning on tuvastatud geoomsed regioonid, kus leidsid markereid p-väärtusega $< 3,0 \times 10^{-6}$.

Geeni nimi	Keskmine variantide alleelisagedus	Variantide arv	p-väärtus
HBB	0.0013	2	1.00×10^{-9}
SLC19A1	0.0054	6	6.13×10^{-7}
HID1	0.0025	4	7.99×10^{-7}
TMEM161B	0.0019	2	1.13×10^{-6}

2.3.4 LOF variandid geeni kaupa

Funktsioonikaoga harvade markeritega geenipõhises analüüsis ei leitud gene, mille p-väärtused oleksid väiksemad pärast mitmese testimise korrigeerimise leitud statistilise olulisuse piirist ($p < 1,1 \times 10^{-5}$, kasutades Bonferroni korrigeerimise ($0.05/\text{markerite arv (4299)}$)). Analüüsi tulemused on visualiseeritud Manhattan joonise abil joonisel 5.



Joonis 6. Manhattan joonis geeni kaupa tehtud harvade variantide analüüsist kasutades funktsioonikaoga geneetilisi variante. Pärast mitmese testimise korrigeerimise leiti statistilise olulisuse piiriks $1,1 \times 10^{-5}$. X-teljel on analüüsitud geenide genoomsed positsioonid ning Y-teljel nende geenide p-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.

2.4 Arutelu

Endometriosis on pärilik kompleksne haigus, mida mõjutavad mitmed geneetilised ning keskkonnategurid. Geneetiliste faktorid identifitseerimine aitaks paremini mõista haiguse olemust ning põhjuseid. Alates 2010. aastast on läbi viidud mitmeid assotsiatsiooniuringuid ning enim on endometriosisiga seostatud variante geenides *WNT4* (1p36.12), *GREB1* (2p25), *ID4* (6p22.3), *CDKN2B-AS1* (9p21.3), *VEZT* (12q22), *FNI* (2q34) ning ka intergeensetes piirkondades geenide *ETAA1* (2p14), *RDN3* (2q23.3) ja *NFE2L3* (7p15.2) lähedal. Siiani on suudetud kõige kindlamalt seostada varasemalt leitud variante III ja IV tasemega endometriosisiga. Käesolevas töös viidi läbi assotsiatsiooniuringud Eesti populatsioonis endometriosisi tekkimist mõjutavate ja põhjustavate potentsiaalsete sagedaste ja harvade geneetiliste variantide leidmiseks. Valim koosnes 326 endometriosisi juhust ning 2812 kontrollist. Võrreldes tulemusi varem endometriosisiga seotud lookustega, leiti kaks varianti 9p21.3 lookuses p-väärtusega alla 0.05. Variandid rs1537377 ja rs1333049 asuvad geenis *CDKN2B-AS1*, mida on seostatud III ja IV taseme endometriosisiga (Uno jt., 2010). *CDKN2B-AS1* kodeerib RNA-d mis on seotud *CDKN2B*, *CDKN2A* ja *ARF* geenide reguleerimisega (Pasmant jt., 2007; Jarinova jt., 2009; Liu jt., 2009). *CDKN2A* geeni sünteesi allasurumist promotori hüpermetülatiooni kaudu on varem seostatud endometriosisi ning endomeetriumi vähiga (Goumenou jt., 2000; Martini jt., 2002; Guida jt., 2009). *CDKN2B-AS1* geenis leitud SNP-e on seostatud ka glaukoomiga, erinevate vähivormidega, ateroskleroosiga, südamehaigustega ning ka glioomiga (Osman jt., 2012; Rajaraman jt., 2012; Wild jt., 2011; Burd jt., 2010). Kuna antud geeniga on seotud palju erinevaid haigused, tuleks antud lookust ja selle funktsiooni lähemalt uurida.

Antud töös läbiviidud sagedaste variantide GWAS ei andnud statistiliselt olulisi tulemusi. See võib olla tingitud väikesest valimist ning ka faktist, et antud töös ei vaadeldud eraldi endometriosisi raskuse tasemeid ega ka alatüüpe. Kategooriate mitteamestamine on olnud kõige suuremaks takistuseks enamustes siiani tehtud uuringutes (Rahmioglu jt., 2014). Kui koguda rohkem informatsiooni kollete paiknemise ja haiguse raskusastme kohta ning suurendada valimit, võimaldaks see uurida eraldi igat haigustaset ning ka alatüüpe. Põhjalikum uurimine võimaldaks luua parema ülevaate erinevate geneetiliste variantide ja bioloogiliste radade seosest haigusega.

Tänaseks on GWAS-iga leitud üle kahe tuhande erinevate haigustega seotud sagedase variandi. Vaatamata suurele assotsiatsioonide arvule, on suur osa haiguste geneetilistest põhjustest endiselt teadmata (Hindorff jt., 2010). Üks võimalikke "peidetud" pärilikkuse allikaid võiks olla harvad, ent suure efektiga variandid (Lee, 2014). Sarnaselt

Mendeliaalsetele haigustele, leidub ka sagedastel haigustel perekondlikke vorme, mida põhjustavad väga tugevate efektidega harvad variandid (Gibson, 2011).

Harvade variantide analüüsiks on vajalik suur valim, sest nende analüüside võimsus on väiksem võrreldes sagedaste variantide analüüsiga - suures uuringus võib olla vaid üksikuid mutatsioonikandjaid. Samas eeldades, et haigust põhjustavad harvad variandid peaksid omama suuremat efekti uuritavale, siis võib siiski loota, et seoseid võib leida ka väiksemas uuringus. Viimasel ajal on suurt rõhku pandud statistiliste meetodite arendamiseks, nagu näiteks geenidepõhised analüüsid, et suurendada harvade variantide assotsiatsioonianalüüside võimust (Lee jt., 2014).

Käesolevas töös viidi läbi ühe-markeri põhised ning geenipõhised uuringud mittesünonüümsete ja funktsioonikaoga harvade variantidega. Markerpõhises analüüsis leiti 9 varianti, mille p-väärtus oli peale mitmese testimise korrektsiooni statistiliselt oluline ($p < 5 \times 10^{-7}$, kasutades Bonferroni korrektsiooni). Kõige madalama p-väärtusega geneetiline variant oli lookuses 11p15.5 olev chr11:5247914 (p-väärtusega 1.92×10^{-11}) ning see asub *HBB* geenis. *HBB* ehk hemoglobiin beeta sünteesib beeta-globiini, mis koos alfa-globiiniga moodustab punases verelibles hemoglobiini. *HBB* geenis on leitud sadu erinevaid mutatsiooni variante. Osad mõjutavad otseselt vere hapniku transpordivõimet ning teised kahjustavad inimese tervist (Bunn, 1997). Kõige rohkem uuritud beeta-globiini mutatsioonist tekkinud haiguseid on sirprakuline aneemia ning beeta-talasseemia (Ashley-Koch jt., 2000; Giardine jt., 2014). *HBB* geeni mutatsioonid pole varem endometriosisiga seostatud. On leitud, et kõrge hemoglobiini ning raua derivaatide kontsentratsioon endometriosisi tsüstides viib DNA mutatsioonide kuhjumisele, mis omakorda võib viia munasarjavähi tekkeni (Iwabuchi jt., 2015).

OR3A3 geen kodeerib haistmisretseptori valku. Haistmisretseptorid interakteeruvad lõhnaaine molekulidega ninas ning käivitavad neuronite vastuse, mille tulemusel tekib inimesel lõhnataju. Haistmisretseptorid on seotud läbi seitsme transmembraanse domeeni paljude neurotransmitterite ja hormoonide retseptoritega ning vastutavad lõhnasignaali tekkimise ja edastamise eest (Malnic jt., 2004). Siiani ei ole haistmisretseptoreid endometriosisiga seostatud, kuid on leitud, et endomeetriumi rakkudes on ekspresseeritud mitmed haistmissignaalraja geenid (Worley jt., 2015).

Lookuses 5q35.3 asuv *GRM6* geen kodeerib glutamaadi retseptorit mGluR6, mis on vajalik saatmaks visuaalset signaali silmadest ajju. Antud neurotransmitter retseptorit leidub vaid silma reetinas olevates pimedas hüperpolariseeritavate ON bipolaarsete rakkude sünapsites dendriitide läheduses (Nakajima Y jt., 1993). Mutatsioonid *GRM6* geenis põhjustavad

peamiselt vaid kanapimedust ning on kirjeldatud ka variante, mis on seotud raske müoopia vormiga (Xu jt., 2009).

PCDHGA7 geen asub 5q31.3 lookuses ning kuulub protokaderiin gamma perekonda. Protokaderiini alfa, beeta ja gamma geeniklastrid sünteesivad transmembraanvalke, mis ekspresseeruvad erinevates inimese närvirakkudes ning vastutavad ajus rakkudevaheliste ühenduste eest (Kohmura jt., 1998). Katsed hiirtega on tõestanud, et erinevad protokaderiini geeniklastrid on vajalikud kesknärvisüsteemi normaalseks arenguks. Protokaderiin gamma mutatsioonid põhjustavad seljanärvi sünapsites häireid, neuronite apoptoosi ning silmas reetina kahjustusi (Lefebvre jt., 2008; Prasad jt., 2008). Endometrioosihaigetel naistel on leitud protokaderiin-17 geeni ekspressioon emaka endomeetriumis, mille tase on kõige kõrgem luteaalses menstruaaltsükli faasis (Sherwin jt., 2008).

Lookuses 3p22-p21.3 asuv *PLCD1* geen kuulub fosfolipaas C perekonda. Fosfolipaas C isoensüümid on tähtsad rakumembraanil, hüdrolüüsides fofatidülinositool-4,5-bisfofaati diatsüülglütserooliks (DAG) ning inositoltrifosfaadiks (IP3). See mängib suurt rolli eukarüootide plasmamembraanses signaalrajas, mis mõjutab ka raku kasvamist ning rakuaktiivsust (Berridge, 1993). *PLCD1* valk toimib kasvajakude supressorina, kuid on leitud, et mutatsioonid antud geenis põhjustavad portselanküünte sündroomi ning hiirtel karvakasvu puudumist (Kiuru1 jt., 2011; Nakamura jt., 2008). Lo Vasco jt. töös on leitud *PLCD1* geeni ekspressioon ka endomeetriumis. Pakutud on välja, et geen mõjutab endometrioosi arengul rakkudevahelisi signaalülekanneid (Lo Vasco jt., 2012).

SLC19A1 geen sünteesib membraanvalku RFC1 (*reduced folate carrier*), mis vastutab folaatide transpordi eest rakku ning osaleb rakusisesel folaatide kontsentratsiooni regulatsioonis. Folaatide kontsentratsioon rakus ja rakuvahelises ruumis on seotud homotsüsteiini kontsentratsiooniga plasmas. Uuringud on avastanud kolm SNP-i *SLC19A1* geenis (-43C>T, 80A>G, 696T>C), mis põhjustavad folaadi transportimise vähenemist ja sellega homotsüsteiini kontsentratsiooni tõusu (Cho jt., 2015). Arvatakse, et foolhappe transpordi vähenemine kehas võib tekitada erinevaid vähi vorme, dementsust, sünnidefekte ning ka mõjutada naise rasestumist ja selle kulgu (Lucock, 2000). Uuritud on ka seost endometrioosi ja erinevate folaatide metabolismiga seotud geenide vahel, kuid statistiliselt olulisi tulemusi ei ole saadud (Szczepanska jt., 2011).

C14orf49 sünteesib valku nespriin-3, mis on tuuma välimembraanil asuv transportvalk. Nespriin-3 valku esineb kõigis inimrakkudes ning kinnituses plektiinile, seob omavahel tuuma ning tsütoskeleti filamendid, aktiinifilamendid ja mikrotuubulid (Wilhelmsen jt., 2005). Arvatakse, et tuuma ja tsütoskeletti kommunikatsioon toimib läbi erinevate nespriini

valkude (nespriin-1, nespriin-2, nespriin- 3 ja nespriin-4), mis on tuuma välismembraanil (Ketema jt., 2007). Värskeimad uuringud on vaadelnud lähemalt inimese aordi endoteelirakkudes nespriin-3 funktsiooni ning leidnud, et nespriin-3 reguleerib vaskulaarse endoteeli rakkude kuju, perinukleaarse tsütoskeleti arhitektuuri ning tuuma- ja tsütoskeletivahelist kommunikatsiooni (Morgan jt., 2011). Siiani pole *C14orf49* geeni endometriosisiga seostatud.

SPATA31E1 asub 9q22.1 lookuses ja sünteesib valku mis mõjutab meestel spermatogeneesi. Hiirtel tehtud uuringud on näidanud, et *SPATA31* geeni aktiivsuse mahasurumisel väheneb märgatavalt isastel hiirtel spermatoosidide arv ning põhjustab azoospermiat ning steriilsust. *SPATA31* puudumine vähendab adhesiooni valgu nektiin-3 ja tsütoskeleti valgu β -aktiini ekspressiooni munandites. Selle tulemusel on epiteelkude väänilistes seenetorukestes deformeerunud ning seemnetorukestesse vabanevad küpsemata spermid. Kuigi siiani on geeni uuritud vaid hiirtel, usutakse, et *SPATA31* geeni ortoloogid võivad ka meestel põhjustada viljatust. Naistel pole *SPATA31E1* geeni mutatsioone haigustega veel seostatud.

UBR2 geenis leiti variant chr14:95923590, mida varem pole avaldatud. *UBR2* geen sünteesib ensüümi nimega E3 ubikvitiinsõltuv valgu ligaas (*UBR2*). Ensüüm kontrollib regulatsioonivalkude, millel on N-terminaalses otsas degradatsiooni signaal kontsentratsiooni (Kwon jt., 2002). Selline proteolüüsi regulatsioonisüsteem on olemas kõigil organismidel alates imetajatest ja taimedest kuni seente ja prokarüootideni (Kwon jt., 2000; Kwon jt., 2001). Uurides geeni hiirtel, leiti, et mahasurutud *UBR2* põhjustab emaste hiirte embrüote suremise kusjuures isased *UBR2* mutandid on steriilsed. Hiirte testised ja spermatogoonid olid terved ning elujõulised, kuid sügoteeni ja pahhüteeni vahel spermatotsüüdid surevad. Sellest tulenevalt on leitud, et *UBR2* on vajalik spermatogeneesi täielikuks toimimiseks ning emaste embrüote arenguks (Kwon, jt.,2003). *UBR2* puudulikes somaatilistes rakkudes esineb palju kromosoomanomaaliaid, sealhulgas hüperprolifereerumist, kromosoomide ebastabiilsust ning ülitundlikkust DNA-d kahjustavate reagentide vastu (An jt., 2012).

Analüüsis mittesünonüümsete harvade variantidega geenianalüüsis oli kõige madalama p-väärtusega *HBB* geen. Lisaks sellele ületasid statistiliselt olulisuse piiri ka *SLC19A1* (21q22.3) ja *HIDI* (17q25.1), *TMEM161B* (5q14.3) geenid olevad harvad variandid. *HIDI* geeni ekspressiooni vähenemine võib mängida rolli erinevate inimese kudede vähkkasvaja arengul. *HIDI* geen on maha surutud rinnavähi, kopsuvähi, endomeetriumi, emakakaela ja paljude teiste vähirakuliinides (Harada jt., 2001). Huffmann jt. uuringus avastati seos *HIDI* geeni harvade variantide ning hemostaasi regulatsiooni vahel (Huffman jt., 2015). See mõjutab vere hüübimist ning veretrombide teket. *TMEM161B* geen kodeerib

transmembraanset valku 161B. Antud geeni on vähe uuritud ning tema funktsioon on teadmata. Funktsioonikaoga harvade markeritega geenipõhises analüüsis ei leitud peale mitmese testimise korrektsiooni statistiliselt olulisi piirkondi ($p < 1.1 \times 10^{-5}$).

Magistritöö tulemused iseloomustavad endometrioosi keerulist geneetikat. Assotsiatsiooniuuringud leidsid nominaalse seose varem endometrioosiga seotud geeni *CDKN2B-AS1* ja antud tulemuste vahel. Markeripõhises harvade variantide analüüsis leiti haigusega seos 9 variandi korral *HBB*, *OR3A3*, *GRM6*, *PCDHGA7*, *PLCD1*, *SLC19A1*, *C14orf49*, *SPATA31E1* ja *UBR2* geenides. Geenipõhises mittesünonüümsete harvade variantidega leiti endometrioosiga seos *HBB*, *SLC19A1*, *C17orf28*, *TMEM161B* geenides. Leitud variante ning geene ei ole varem endometrioosiga seostatud. Küll aga on leitud, et mõne geeni perekonnad on mõjutanud erinevates analüüsides haiguse teket või haigusega seotud signaalradasid. Kuna valim oli väga väike ning informatsioon haiguse taseme ning alamtüüpide kohta puudus, tuleks leitud variante edasi uurida ning kinnitada sõltumatus kohordis nende seost haigusega.

Kokkuvõte

Endometriosis on günekoloogiline haigus, mis mõjutab miljoneid naisi üle maailma. Haigusega kaasnevad tugevad alakõhuvalud ning olenevalt endometriosisi raskuse astmest ka viljatus. Endometriosis on multifaktoriaalne haigus ning arvatakse, et geneetilised tegurid mängivad suurt rolli selle tekkimisel. Endometriosisi geneetilise tausta uurimine võib aidata kaasa paremini mõista haiguse patogeneesimehhanisme ning erinevate raskusastmete haigustegureid.

Käesoleva magistritöö raames teostati GWAS identifitseerimaks 3138 naise ((326 endometriosisihaige ja 2812 kontrolli) põhjal potentsiaalseid endometriosisiga seotud geneetilisi variante. Uurimuse läbiviimiseks kasutati prof. Andres Salumetsa töögrupi poolt kogutud endometriosisi proove ning Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidonoritelt kogutud DNA proove. Ülegenoomne assotsiatsiooniuuringul kasutati 1000 Genoomi Projekti (1000 Genomes Project) referentsile imputeeritud andmeid. Harvade variantide markeri- ja geenipõhises analüüsis kasutati eksoomipiirkondades genotüpiseeritud harvu variante. Markerikaupa harvade variantide analüüs teostati markeritega, mille $MAF < 1\%$. Geeni kaupa analüüsid teostati mittesünonüümsete ja funktsioonikaoga geneetiliste variantide analüüsid, võttes MAF -ks $< 1\%$. Kovariaatidena kasutati vanust, kehamassiindeksi ja nelja esimest peakomponenti.

Sagedaste variantide GWAS uuringus leiti 438 varianti p -väärtusega $< 1 \times 10^{-5}$, millest ükski ei ületanud ülegenoomset statistilise olulisuse piiri p -väärtusega $< 5 \times 10^{-8}$. Võrreldes varem endometriosisiga seotud lookusi, leiti nominaalne seos (p -väärtusega < 0.05) kahe variandiga. Variandid rs1537377 ja rs1333049 asuvad geenis *CDKN2B-AS1*, mida on seostatud III ja IV taseme endometriosisiga (Uno jt., 2010).

Harvade geneetiliste variantide markeripõhises analüüsis leiti 9 tulemust, mille p -väärtused olid statistilise olulisuse piirist madalamad. Kõige madalama p -väärtusega variant oli lookuses 11p15.5 olev chr11:5247914, mis asus *HBB* geeni teises eksonis. Geenipõhises mittesünonüümsete harvade geneetiliste variantide analüüsis leiti neli geeni, mille p -väärtus oli statistiliselt oluline. Kõige madalama p -väärtusega oli *HBB* geen ning statistilise olulisuse piiri ületasid ka lookuses 21q22.3 asuv geen *SLC19A1*, lookuses 17q25.1 asuv geen *HIDI* ning lookuses 5q14.3 asuv *TMEM161B* geen. Funktsioonikaoga harvade geneetiliste

variantide analüüsis ei leitud tulemusi, mis ületaks statistilise olulisuse piiri. Harvade variantide uuringul leitud geene ei ole varem endometriosisiga seostatud.

Ülelennuksed assotsiatsiooniuuringud antud töös ei andnud olulisi tulemusi endometriosisiga seotud sagedaste geneetiliste variantide kohta. Siiski on tähtis uurida harvade variantide uuringutes leitud geene mõistmaks, kuidas on need seotud haiguse tekke ja arenguga. See aitaks paremini aru saada endometriosisi etioloogiast ja patogeneesist ning võimaldaks parandada diagnostikat või välja töötada paremaid ravimeetodeid.

Resümee/Summary

Genome-Wide Association Study to find common and rare genetic variants for endometriosis in Estonian population.

Kaisa Aruaas

Endometriosis is a chronic gynaecological disease affecting millions of women worldwide. This disease leads to severe abdominal pain and depending on the severity of the lesions, to infertility. Endometriosis is a multifactorial disease, and it is believed that genetic factors play a major role. Identification of these genetic factors will lead to the better understanding of the underlying biology of the disease.

The aim of this study was to identify common and rare genetic variants associated with the endometriosis. In the current study, 3138 women (326 cases and 2812 controls) were tested for common genetic variants using logistic regression analysis in Genome-Wide Association Study (GWAS) setting, using the 1000 Genome Project reference based imputed data. Single variant and gene based analysis was carried out using rare variants (minor allele frequency < 1%).

As a result of common variants in GWAS, no genetic variant exceeded the genome-wide significance threshold $p < 5 \times 10^{-8}$. Compared to the previous endometriosis associated loci, we found two variants that had a nominal association ($p < 0.05$) with the disease in our study. These variants, rs1537377 and rs1333049, in *CDKN2B-AS1* locus have previously shown to be associated with Stage III and IV endometriosis.

Single variant based analysis of rare variants showed 9 associated variants. The SNP with the lowest p-value was chr11:5247914 in the second exon of *HBB* gene. *HBB* gene codes hemoglobin- β that is important for oxygen transportation in blood. Gene-based analysis with rare non-synonymous variants found four genes of which p-value was statistically significant. The gene with the lowest p-value was *HBB* gene. Other genes that exceeded the significance threshold were *SLC19A1* in locus 21q22.3, *HIDI* in 17q25.1 and *TMEM161B* in locus 5q14.3. Gene-based analysis with rare non-synonymous variants didn't give result that exceeded the significance threshold. Genes that were found in this study have not been associated with endometriosis before.

In conclusion Genome-Wide Association Study of common variants did not give any statistically significant results. Nevertheless, it is important to investigate genes found in the studies of rare genetic variants to inspect how those are connected to the origin and further development of the disease. This would lead to better understanding of the etiology and pathogenesis of endometriosis, which in turn could possibly improve the diagnostics of the disease and develop better treatments.

Tänuõnad

Sooviksin südamest tänada oma juhendajat Reedik Mägi kannatlikkuse ja innustuse eest. Samuti sooviks tänada Maire Petersit ning Kristi Lälli konstruktiivse kriitika eest töö valmimise ajal. Lisaks tänan Evelin Mihailovit ning Viljo Sood abi eest eksperimentaalosa tegemise juures.

Kasutatud kirjandus

- Abecasis, G.R., Auton, A., Brooks, L.D., DePristo, M.A. jt. (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 491 (7422): 56–65.
- Albertsen, H.M., Chettier, R., Farrington, P. and Ward, K. (2013) Genome-wide association study link novel loci to endometriosis. *PLoS One* 8(3): e58257.
- Almstrup, K., Leffers, H., Lothe, R.A. jt. (2007) Improved gene expression signature of testicular carcinoma in situ. *Int. J. Androl.* 30, 292–302.
- American Fertility Society (1979) Classification of endometriosis. *Fertil Steril* 32: 633–45.
- An, J.Y., Kim, E., Zakrzewska, A., Yo, Y.D. jt. (2012) UBR2 of the N-End Rule Pathway Is Required for Chromosome Stability via Histone Ubiquitylation in Spermatocytes and Somatic Cells. *PLoS One*. 7(5): e37414.
- Aoki, M. (1967) Endometriosis of the pelvic lymph nodes. *Pathol. Int.* 17: 217–234.
- Ashley-Koch, A., Yang, Q., Olney, R.S. (2000) Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151(9):839-45.
- ASRM (1997) Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil. Steril.* 67(5): 817–21.
- ASRM (2012). Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 98(3): 591–8.
- Audebert, A., Backstrom, T., Barlow, D.H., Benagiano, G. jt. (1991) Endometriosis 1991: a discussion document. *Hum. Reprod.* 7(3): 432-435.
- Aznaurova, Y.B., Zhumataev, M.B., Roberts, T.K., Aliper, A.M. jt. (2014) Molecular aspects of development and regulation of endometriosis. *Reprod. Biol. Endoc.* 12:50.
- Bacci, M., Capobianco, A., Monno, A., Cottone, L. jt. (2009) Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am. J. Pathol.* 175:547–556.
- Balash J., Creus M., Fabregues F., Carmona F. jt. (1996) Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum. Reprod.* 11(2):387- 391.
- Ballard, K., Lowton, K., Wright, J. (2006) What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertil. Steril.* 86:1296-301.
- Bergqvist, A., C. Bruse, C., Carlberg, M., Carlstrom, K. (2001) "Interleukin 1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in endometriotic tissue and in endometrium," *Fertil. Steril.* 75(3):489–495.

- Berkley, K.J., Rapkin, A.J., Papka, R.E. (2005) The pains of endometriosis. *Science* 308:1587–1589.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361(6410):315-25.
- Birnbaum, L.S. ja Cummings, A.M. (2002) Dioxins and Endometriosis: A Plausible Hypothesis. *Environ. Health Perspect* 110:15–21.
- Bischoff, F. ja Simpson, J.L. (2004) Genetic basis of endometriosis. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1034:284–99.
- Borowski, A., Dirksen, U., Lixin, L., Shi, R.L. jt. (2006) Structure and function of ETAA16: a novel cell surface antigen in Ewing’s tumours. *Cancer Immunol. Immunother.* 55:363–374.
- Bourlev, V., Volkov, N., Pavlovitch, S., Lets, N. jt. (2006) The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 132:501–509.
- Brosens, I.A. (1994) Is mild endometriosis a disease? Is mild endometriosis a progressive disease? *Hum. Repr.* 9:2209-11.
- Brosens, I. ja Benagiano, G. (2013a) “Is neonatal uterine bleeding involved in the pathogenesis of endometriosis as a source of stem cells?” *Fertil. Steril* 100:622–623.
- Brosens, I., Gordts, S., Benagiano, G. (2013b) “Endometriosis in adolescents is a hidden, progressive and severe disease that deserves attention, not just compassion,” *Human Repr.* 28:2026–2031
- Brosens, I., Puttemans, P., Campo, R., Gordts, S. jt. (2003) Non-invasive methods of diagnosis of endometriosis. *Curr .Opin. Obstet. Gynecol.* (6):519-522.
- Bulletti, C., Coccia, M.E., Battistoni, S., Borini, A., (2010) Endometriosis and infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27:441–447.
- Bunn, H.F. (1997) Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 337:762-769.
- Burd, C. E., Jeck, W. R., Liu, Y., Sanoff, H. K. jt.(2010) Expression of Linear and Novel Circular Forms of an *INK4/ARF*-Associated Non-Coding RNA Correlates with Atherosclerosis Risk. *PLoS Genet.* 6(12):e1001233.
- Burney, R. O. ja Giudice, L.C. (2012) Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis. *Fertil Steril.* 98(3): 511-9.
- Carvalho, L.F., Below, A., Abrao, M.S., Agarwal, A. (2012) Minimal and mild endometriosis negatively impact on pregnancy outcome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58(5): 607–14.
- Cho, Y., Kim, Y.O., Lee, J.H., Park, H.M. jt. (2015) Association of Reduced Folate Carrier-1 (RFC-1) Polymorphisms with Ischemic Stroke and Silent Brain Infarction. *PLoS One.* 10(2):

e0115295.

Cobellis, L., Latini, G., De Felice, C., Razzi, S. jt. (2003) High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 18:1512–1515.

Comiter, C.V. (2002) Endometriosis of the urinary tract. *Urol. Clin. North. Am.* 29(3): 625–635.

Crain, D.A., Janssen, S.J., Edwards, T.M., Heindel, J. jt. (2008). Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil. Steril.* 90:911–40.

Cramer, D.W., Wilson, E., Stillman, R.J., Berger, M.J. jt. (1986) The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA* 255:1904–1908.

Delaneau, O., Zagury, J.-F., Marchini, J. (2013) Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nat. Methods.* 10 (1): 5–6.

Dmowski, W.P., Steele, R.W. ja Baker, G.F. (1981) Deficient cellular immunity in endometriosis *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141: 377–383.

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.

Falconer, H., D’Hooghe, T., Fried, G. (2007) Endometriosis and genetic polymorphisms. *Obstet. Gynecol. Surv.* 62:616–28.

Ferreira, M.A., Hottenga, J.J., Warrington, N.M., Medland, S.E. jt. (2009) Sequence variants in three loci influence monocyte counts and erythrocyte volume. *Am. J. Hum. Genet.* 85:745–749.

Ferrero, S., Anserini, P., Remorgida, V., Ragni, N. (2005) Body mass index in endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 121:94–98.

Figueira, P. G. M., Abr̃ao, M. S., Krikun, G., Taylor, H. (2011) “Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis,” *An. N. Y. Acad. of Sci.* 1221(1):10–17.

Giardine, B., van Baal, S., Kaimakis, P., Riemer, C. (2014) HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Research* 42:1063–1069.

Gibson G. (2011) Rare and common variants: twenty arguments. *Nat. Rev. Genet.* 13:135–145.

Giudice, L.C. ja Kao, L.C. (2004) Endometriosis. *Lancet* 364:1789–99.

Goumenou, A.G., Arvanitis, D.A., Matalliotakis, I.M., Koumantakis, E.E. jt (2000) Loss of heterozygosity in adenomyosis on hMSH2, hMLH1, p16Ink4 and GALT loci. *Int. J. Mol. Med.* 6:667–671.

- Graham, J.D. ja Clarke, C.L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18(4): 502–19.
- Guida, M., Sanguedolce, F., Bufo, P., Di Spiezio Sardo, A. jt. (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.
- Hadfield, R.M., Mardon, H.J., Barlow, D.H., Kennedy, S.H. (1997) Endometriosis in monozygotic twins. *Fertil. Steril.* 68(5): 941–2.
- Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F. (1984) Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet. Gynecol.* 64:151-154.
- Harada, T., Yoshioka, H., Yoshida, S. jt. (1997) “Increased interleukin- 6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis,” *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176(3):593–597.
- Harada, H., Nagai, H., Tsuneizumi, M., Mikami, I. jt. (2001) Identification of DMC1, a novel gene in the TOC region on 17q25.1 that shows loss of expression in multiple human cancers. *J. Hum. Genet.* 46(2):90-5.
- Harris, H.R., Tamimi, R.M., Willett, W.C., Hankinson, S.E., Michels, K.B.(2011) Body size across the life course, mammographic density, and risk of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 74:909–918.
- Hindorff, L.A., Junkins, H.A., Manolio, T.A. (2010) A catalog of published genome-wide association studies. *Andmekataloog, viidatud kasutatud internetilehekülgedes.*
- Herington, J.L., Bruner-Tran, K.L., Lucas, J.A. and Osteen, K.G. (2011) Immune interactions in endometriosis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 7(5): 611–26.
- Howie, B.N., Donnelly, P. Marchini, J. (2009) A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics.* 5 (6): e1000529.
- Huang, H.Y. (2008) Medical treatment of endometriosis. *Chang Gung Med. J.* 31(5):431-440.
- Huang Y.H., Liou J.D., Hsieh C.L., Shiau C.S., Lo L.M., Chang M.Y. (2011) Long-term follow-up of patients surgically treated for ruptured ovarian endometriotic cysts. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 50 (3):306-311.
- Hudgesdon, P.E. (1957) The structure of endometrial cysts of the ovary. *J. Obstet. Gynaecol. Br. EMP.* 44:69-84.
- Huffman, J.E., de Vries, P.S., Morrison, A.C., Sabater-Lleal, M. jt. (2015) Rare and low-frequency variants and their association with plasma levels of fibrinogen, FVII, FVIII, and vWF. *Blood.* 126(11): e19–e29.
- Inagaki, J., Kondo, A., Lopez, L.R., Shoenfeld, Y., Matsuura, E. (2005) Pregnancy loss and endometriosis: pathogenic role of anti-laminin-1 autoantibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1051:174–184.

Iwabuchi, T., Yoshimoto, C., Shigetomi, H., Kobayashi, H. (2015) Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Endometriosis and Its Malignant Transformation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015: 848595.

Jess, T., Frisch, M., Jorgensen, K.T., Pedersen, B.V., Nielsen, N.M. (2012) Increased risk of inflammatory bowel disease in women with endometriosis: a nationwide Danish cohort study. *Gut.* 61:1279–1283.

Kang, Y.L., Jeung, I.C., Park, A. jt. (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.

Kauppila, A. ja Ylikorkala, O. (2008) Endometriosis. A. Kauppila (toim). *Sünnitusabi ja günekoloogia.* (lk. 99-108). Tallinn: Medicina

Ketema, M., Wilhelmsen, K., Kuikman, I., Janssen, H. jt. (2007) Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell. Sci.* 120(19):3384-94.

Kiuru, M., Kurban, M., Itoh, M., Petukhova, L. jt. (2011) Hereditary Leukonychia, or Porcelain Nails, Resulting from Mutations in PLCD1. *Am. J. Hum. Genet.* 88(6):839-44.

Kennedy, S. (1999) The genetics of endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 82(2): 129–33.

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D’Hooghe, T. jt. (2005) ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum. Reprod.* 20:2698–704.

Kondera-Anasz, Z., Sikora, J., Mielczarek-Palacz, A., Jońca, M. (2005) “Concentrations of interleukin (IL)-1 α , IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis,” *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 123(2):198–203.

Kohmura, N., Senzaki, K., Hamada, S., Kai, N. jt. (1998) Diversity revealed by a novel family of cadherins expressed in neurons at a synaptic complex. *Neuron.* 20:1137–1151.

Kwon, Y. T., Balogh, S. A., Davydov, I. V., Kashina, A. S., jt. (2000) Altered activity, social behavior, and spatial memory in mice lacking the NTAN1 amidase and the asparagine branch of the N-end rule pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20:4135-4148.

Kwon, Y. T., Kashina, A. S., Davydov, I. V., Hu, R.-G. jt. (2002) An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* 297:96-99.

Kwon, Y. T., Xia, Z., Davydov, I. V., Lecker, S. H. jt. (2001) Construction and analysis of mouse strains lacking the ubiquitin ligase UBR1 (E3 α) of the N-end rule pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21:8007-8021.

Kwon, Y.T., Xia, Z., An, J.Y., Tasaki, T. jt. (2003) Female Lethality and Apoptosis of Spermatocytes in Mice Lacking the UBR2 Ubiquitin Ligase of the N-End Rule Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23(22):8255–8271.

- Lebel, G., Dodin, S., Ayotte, P., Marcoux, S. jt. (1998) Organochlorine exposure and the risk of endometriosis. *Fertil. Steril.* 69(2):221–28.
- Lee, S., Abecasis, G.R., Boehnke, M., Lin, X. (2014) Rare-Variant Association Analysis: Study Designs and Statistical Tests. *Am. J. Hum. Genet.* 95 (1): 5–23.
- Lee, S., Wu, M.C., Lin, X. (2012) Optimal tests for rare variant effects in sequencing association studies. *Biostatistics.* 13 (4): 762–775.
- Lefebvre, J.L., Zhang, Y., Meister, M., Wang, X. jt. (2008) gamma-Protocadherins regulate neuronal survival but are dispensable for circuit formation in retina. *Development* 135:4141–4151.
- 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.
- Liu, T.M., Zuo, T., Tycko, B. (2009) Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics.* 1(2): 331-45.
- Lo Vasco, V.R., Leopizzi, M., Chiappetta, C., Businaro, R. jt. (2012) Expression of phosphoinositide- specific phospholipase C enzymes in normal endometrium and in endometriosis. *Fertil. Steril.* 98(2):410-4.
- Lou, X., Han, X., Jin, C. jt. (2013) SOX2 targets fibronectin 1 to promote cell migration and invasion in ovarian cancer: new molecular leads for therapeutic intervention. *OMICS* 17(10):510–518.
- Lucock, M. (2000) Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.* 71(1-2):121-38.
- Malnic, B., Godfrey, P. A., Buck, L. B. (2004) The human olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(8): 2584–2589.
- Marchini, J., Howie, B., Myers, S., McVean, G. jt. (2007) A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat. Genet.* 39 (7): 906–913.
- Mathur, S.P. (2000) Autoimmunity in endometriosis: relevance to infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44:89–95.
- Martin, J.D. Jr. ja Hauck, A.E. (1985) Endometriosis in the male. *Am. Surg.* (7):426-30.
- Martini, M., Ciccarone, M., Garganese, G., Maggiore, C. jt. (2002) Possible involvement of hMLH1, p16INK4a and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int. J. Cancer.* 102:398–406.
- Mayani, A., Barel, S., Soback, S., Almagor, M. (1997) Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 12(2):373–375.
- Miao, R., Guo, X., Zhi, Q. (2013) VEZT, a novel putative tumor suppressor, suppresses the growth and tumorigenicity of gastric cancer. *PLoS ONE* 8, e74409.

- Missmer, S.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Barbieri, R.L. jt. (2004a) Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 104(1):965–974.
- Missmer, S.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Barbieri, R.L. jt. (2004b) Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am. J. Epidemiol.* 160:784–796.
- Missmer, S.A., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Barbieri, R.L. jt (2004c) In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Fertil. Steril.* 82:1501–1508.
- Moen, M.H. (1994) Endometriosis in monozygotic twins. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 73(1): 59–62.
- Moen, M.H. ja Magnus, P. (1993) The familial risk of endometriosis. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 72(7): 560–4.
- Morgan, J.T., Pfeiffera, E.R., Thirkill, T.L., Kumarb P. jt. (2011) Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. *Mol. Biol. Cell.* 22(22): 4324–4334.
- Murray, P.J. ja Wynn, T.A. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11:723–737.
- Nagle, C.M., Bell, T.A., Purdie, D.M., Treloar, S.A. (2009) Relative weight at ages 10 and 16 years and risk of endometriosis: a case-control analysis. *Hum. Reprod.* 24:1501–1506.
- Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H. jt. (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* 268(16):11868-73.
- Nakamura, Y., Ichinohe, M., Hirata, M., Matsuura, H. jt. (2008) Phospholipase C-delta1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nudemutation, in normal hair development. *FASEB. J.* 22(3):841-9.
- Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Anaf, V., Mine, J.M. jt. (1993) Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil. Steril.* 59:681-4.
- Nisolle, M. ja Donnez, J. (1997) Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.* 68(4):585-596.
- Noble, L.S., Takayama, K., Zeitoun, K.M., Putman, J.M. jt. (1997) Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(2):600-6.
- Nyholt, D.R., Low, S.K., Anderson, C.A., Painter, J.N. jt. (2012) Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat. Genet.* 44(12):1355–9.
- Oliker, A.J. ja Harris, A.E. (1971) Endometriosis of the bladder in a male patient. *J. Urol.* 106(6):858-9.

- Olive, D.L. ja Henderson, D.Y. (1987) Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstet. Gynecol.* 69(1): 412–5.
- Osman, W., Low, S.K., Takahashi, A., Kubo, M. jt. (2012) A genome-wide association study in the Japanese population confirms 9p21 and 14q23 as susceptibility loci for primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.* 21:2836–2842.
- Ozkan, S., Murk, W., Arici, A. (2008) Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1127: 92–100.
- Painter, J.N., Anderson, C.A., Nyholt, D.R., Macgregor, S. jt. (2011) Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat. Gen.* 43(1):51–4.
- Pankov, R. ja Yamada, K.M. (2002) Fibronectin at a glance. *J. Cell. Sci.* 115:3861–3863.
- Parazzini, F., Chiaffarino, F., Surace, M., Chatenoud, L. jt. (2004) Selected food intake and risk of endometriosis. *Hum. Reprod.* 19:1755–1759.
- Pauwels, A., Cenijn, P.H., Schepens, P.J.C., Brouwer, A. (2000) Comparison of chemical-activated luciferase gene expression bioassay and gas chromatography for PCB determination in human serum and follicular fluid. *Environ. Health Perspect* 108:553–557.
- Pe'er, I., Yelensky, R., Altshuler, D., Daly, M.J. (2008) Estimation of the multiple testing burden for genomewide association studies of nearly all common variants. *Genet. Epidemiol.* 32 (4): 381–385.
- Pellegrini, C., Gori, I., Ahtari, C., Hornung, D. jt. (2012) The expression of estrogen receptors as well as GREB1, c-MYC, and cyclin D1, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is increased in peritoneal endometriosis. *Fertil. Steril.* 98:1200–1208.
- Pizzo, A., Salmeri, F.M., Ardita, F.V., Sofo, V. jt. (2002) Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 54:82–87.
- Prasad, T., Wang, X., Gray, P.A., Weiner, J.A. (2008) A differential developmental pattern of spinal interneuron apoptosis during synaptogenesis: insights from genetic analyses of the protocadherin-gamma gene cluster. *Development.* 135:4153–4164.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L. jt. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* (3):559–75.
- Rahmioglu, N., Macgregor, S., Drong, A.W., Hedman A.K, jt (2015) Genome-wide enrichment analysis between endometriosis and obesity-related traits reveals novel susceptibility loci. *Hum. Mol. Genet.* 24(4): 1185–1199.
- 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.
- Rahmioglu, N., Nyholt, D.R., Morris, A.P., Missmer, S. A. jt. (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.

- Rajaraman, P., Melin, B.S., Wang, Z., McKean-Cowdin, R. jt. (2012) Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Hum. Genet.* 131:1877–1888.
- Rhee, D.K., Park, S.H. ja Jang, Y.K.(2008) Molecular signatures associated with transformation and progression to breast cancer in the isogenic MCF10 model. *Genomics* 92, 419–428
- Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E., Becker, J.L. (1995) Immunoresponsiveness in endometriosis: implications of estrogenic toxicants. *Environ. Health Perspect.* 103(7): 151–156.
- Reddy, B.S., Rozati, R., Reddy, B.V., Raman, N.V. (2006) Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG* 113:515–520.
- Ren, Y., Cheung, H.W., von Maltzhan, G. jt. (2012) Targeted tumorpenetrating siRNA nanocomplexes for credentialing the ovarian cancer oncogene ID4. *Sci. Transl. Med.* 4:147ra112.
- Sampson, J.A. (1927a) Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am. J. Pathol.* 3(2):93–110.
- Sampson, J.A. (1927b) Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 14: 442–69.
- Saha, R., Pettersson, H.J., Svedberg, P. (2015) Heritability of endometriosis. *Fertil. Steril.* 104(4):947-52.
- Sapkota, Y., Low, S. -K., Attia, J., Gordon, S.D. jt. (2015) Association between endometriosis and the interleukin 1A (IL1A) locus. *Hum. Reprod.* 30:239–248.
- Sasson, I.E. ja Taylor, H.S. (2008) Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1127:106-15.
- Schiffrin, B.S., Erez, S., Moore, J.G. (1973) Teen-age endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 116(7):973-80.
- Shah, D.K., Correia, K.F., Vitonis, A.F., Missmer, S.A. jt. (2013) Body size and endometriosis: results from 20 years of follow-up within the Nurses' Health Study II prospective cohort. *Hum. Reprod.* 28(7):1783-92.
- Shanti, A., Santanam, N., Morales, A.J., Parthasarathy, S. jt. (1999) Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil. Steril.* 71:1115–1118.
- Sherwin, J.R.A., Sharkey, A.M., Mihalyi, A., Simsa, P. jt. (2008) Global gene analysis of late secretory phase, eutopic endometrium does not provide the basis for a minimally invasive test of endometriosis. *Hum. Reprod.* 23(5):1063-8.

- Sinaii, N., Cleary, S.D., Ballweg, M.L., Nieman, L.K., Stratton, P. (2002) High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum. Reprod.* 17:2715–2724.
- Spencer, C.C.A., Su, Z., Donnelly, P., Marchini, J. (2009) Designing genome-wide association studies: sample size, power, imputation, and the choice of genotyping chip. *PLoS genetics.* 5 (5): e1000477.
- Somigliana, E., Vigan`o, P., Gaffuri, B. (1996) Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis,” *Am. J. Reprod. Im.* 36(5):295–300.
- Szczepanska, M., Kozlik, J., Skrzypczak, J., Mikolajczyk, M. (2003) Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil. Steril.* 79:1288–1293.
- Szczepanska, M., Mostowska, A., Wirstlein, P., Lianeri, M. jt. (2011) Polymorphic variants of folate and choline metabolism genes and the risk of endometriosis-associated infertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 157(1):67-72.
- The International HapMap C. (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature.* 437:1299–320.
- Treloar, S.A., Wicks, J., Nyholt, D.R., Montgomery, G.W. jt. (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(3): 365–76.
- Treloar, S.A., O'Connor, D.T., O'Connor, V.M. Martin, N.G. (1998) Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil. Steril.* 71(4):701–10.
- Trentham-Dietz, A., Newcomb, P.A., Storer, B.E., Longnecker, M.P. jt. (1997) Body size and risk of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.* 145:1011–1019.
- Tulac, S., Nayak, N.R., Kao, L.C., VanWaes, M. jt. (2003) Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:3860–3866.
- Uno, S., Zembutsu, H., Hirasawa, A., Takahashi, A. jt. (2010) A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nature Genetics* 42(8):707–10.
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. jt. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405–409.
- 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.
- Vitonis, A.F., Baer, H.J., Hankinson, S.E., Laufer, M.R. jt. (2010) A prospective study of body size during childhood and early adulthood and the incidence of endometriosis. *Hum. Reprod.* 25:1325–1334.
- Wieser, F., Fabjani, G., Tempfer, C., Schneeberger, C. jt. (2002) Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms and endometriosis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 9:313-318.

Wild, P.S., Zeller, T., Schillert, A., Szymczak, S. jt. (2011) A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 4:403–412.

Wilhelmsen, K., Litjens, S.H.M., Kuikman, I., Tshimbalanga, N. jt. (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell. Biol.* 171(5): 799–810.

Worley, M.J. Jr., Liu, S., Hua, Y., Kwok, J. S.-L. jt. (2015) Molecular changes in endometriosis-associated ovarian clear cell carcinoma. *Euro. J. Cancer* 51:1831–1842.

Wu, M. H., Lu, C.W., Chuang, P. C., Tsai, S. J. (2010) “Prostaglandin E2: the master of endometriosis?” *Exper. Biol. Med.* 235(6):668–677.

Xu, X., Li, S., Xiao, X., Wang, P. jt. (2009) Sequence variations of GRM6 in patients with high myopia. *Mol. Vis.* 15:2094–2100.

Zhao, Z.Z., Nyholt, D.R., Thomas, S., Treloar, S.A. (2008) Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of familial endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* 14: 531–8.

Zondervan, K.T., Treloar, S.A., Lin, J., Weeks, D.E. jt. (2007) Significant evidence of one or more susceptibility loci for endometriosis with near-Mendelian inheritance on chromosome 7p13-15. *Hum. Reprod.* 22(3):717–28.

Yang, J.Z., Agarwal, S.K., Foster, W.G. (2000) Subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the pathophysiology of endometriosis in the cynomolgus monkey. *Toxicol. Sci.* 56:374–381.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.1000genomes.org>

<http://www.cidr.jhmi.edu/supported/Infinium%20PsychArray%20Data%20Sheet.pdf>

http://www.familyhealthonline.ca/fho/womenshealth/WH_painfulmens_FHd95.asp

[http://www.genome.gov/gwastudies/.](http://www.genome.gov/gwastudies/)

<http://www.illumina.com>

<http://www.illumina.com/applications/microarrays/microarray-software/genomestudio.html>