

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

***E2F8* geeni varieeruvuse määramine Eesti korduva raseduse
katkemise valimis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Marion Villemson

Juhendajad: Laura Kasak, PhD

Prof. Maris Laan

TARTU 2019

Infoleht

***E2F8* geeni varieeruvuse määramine Eesti korduva raseduse katkemise valimis**

Käesolevas töös anti ülevaade korduvat raseduse katkemist (KRK) põhjustavatest teguritest, transkriptsioonifaktoritest üldiselt ning E2F transkriptsioonifaktorite perekonnast. Töö eesmärgiks oli uurida seost E2F transkriptsioonifaktorite ja KRK vahel. Eksperimentaalses osas viidi KRK valimis läbi geneetilise varieeruvuse skriining transkriptsioonifaktor E2F8 DNA-ga seondumise domeenis.

Töö tulemusena leiti, et KRK valimis ühelgi indiviidil E2F8 DNA-ga seondumise domeenis varieeruvusi ei esinenud, kuid tuvastati 8 introonsetes regioonides paiknevat ühenukleotiidsset varianti (SNV). Neli tuvastatud harvaesinevat (alleelisagedus <0,01) SNV-d, rs72906006 A/G, rs199864182 T/C, rs76950800 C/T ja rs376159333 C/T esinesid KRK populatsioonis kordades sagedamini võrreldes *The Genome Aggregation Database* andmebaasis olevate eestlaste andmetega.

Märksõnad: korduv raseduse katkemine, transkriptsioonifaktorid, E2F8

CERCS: T490 biotehnoloogia

Identification of genetic variation in *E2F8* gene in Estonian recurrent pregnancy loss samples

In the current study, an overview was given about the etiology of recurrent pregnancy loss (RPL), transcription factors in general, and the family of E2F transcription factors. The aim of the study was to investigate the relationship between E2F transcription factors and RPL. In the experimental part, a genetic variation screening was performed in the DNA binding domain of the transcription factor E2F8 in Estonian recurrent pregnancy loss samples.

As a result of this work, no variation was detected in the DNA binding domain of E2F8 in the Estonian RPL samples; however, 8 single nucleotide variants were found in the intronic regions. Four of them were classified as rare variants (allele frequency <0,01), rs72906006 A/G, rs199864182 T/C, rs76950800 C/T and rs376159333 C/T, and were overrepresented in RPL samples compared to Estonian population samples in *the Genome Aggregation Database*.

Keywords: recurrent pregnancy loss, transcription factors, E2F8

CERCS: T490 biotechnology

Sisukord

| | |
|--|----|
| SISUKORD | 3 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 7 |
| 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 8 |
| 1.1 KORDUV RASEDUSE KATKEMINE | 8 |
| 1.1.1 Raseduse katkemise endokrinoloogilised põhjused | 10 |
| 1.1.2 Raseduse katkemise immunoloogilised põhjused | 11 |
| 1.1.3 Raseduse katkemise anatoomilised põhjused | 11 |
| 1.1.4 Mehe mõju raseduse katkemisele | 12 |
| 1.1.5 KRK tsütogeneetilised põhjused | 12 |
| 1.1.6 Geneetika mõju korduva raseduse katkemisele | 13 |
| 1.2 TRANSKRIPTSIOONI MASINAVÄRK JA TRANSKRIPTSIOONIFAKTORID..... | 14 |
| 1.2.1 E2F transkriptsioonifaktorite perekond | 18 |
| 1.2.2 Transkriptsioonifaktor E2F8..... | 22 |
| 2 EKSPERIMENTAALOSA | 24 |
| 2.1 TÖÖ EESMÄRGID | 24 |
| 2.2 MATERJAL JA METOODIKA..... | 24 |
| 2.2.1 Kandidaatgeeni väljavalimine | 24 |
| 2.2.2 Korduva raseduse katkemise valim | 28 |
| 2.2.3 DNA eraldamine | 28 |
| 2.2.4 PCR praimerite disain..... | 29 |
| 2.2.5 E2F8 geeni valitud piirkondade amplifikatsioon inimese genoomist | 30 |
| 2.2.6 Sekveneerimine | 31 |
| 2.2.7 Andmete analüüs | 32 |
| 2.3 TULEMUSED JA ARUTELU..... | 33 |
| 2.3.1 Sekveneerimisel tuvastatud ühenukleotiidsed variandid..... | 33 |
| 2.3.2 Arutelu | 36 |
| KOKKUVÕTE | 39 |
| RESÜMEE | 40 |
| KASUTATUD KIRJANDUS..... | 41 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID..... | 52 |
| LISAD | 53 |

| | |
|-------------------|----|
| LISA 1..... | 53 |
| LISA 2..... | 54 |
| LIHTLITSENTS..... | 55 |

Kasutatud lühendid

AD – aktivatsioonidomeen

AMH – Anti-Mülleri hormoon

aPL – antifosfolipiidantikeha (*antiphospholipid antibody*)

APS – antifosfolipiidsündroom (*antiphospholipid syndrome*)

ASRM – Ameerika Reproduktiivmeditsiini Ühing (*Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*)

CycA – tsükliin-A-ga seondumise sait (*cyclin A site*)

DBD – DNA-ga seondumise domeen (*DNA-binding domain*)

DP – dimeriseerumispartner

E2 – adenoviiruse varajane geen

E2F – geeniperekond, mis kodeerib sellesse perekonda kuuluvaid transkriptsioonifaktoreid kõrgemates eukarüootides

ESHRE – Euroopa Inimese Reproduktiivsuse ja Embrüoloogia Ühing (*European Society of Human Reproduction and Embryology*)

ExAC – *The Exome Aggregation*

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon

gnomAD – *The Genome Aggregation Database*

KRK – korduv raseduse katkemine

LoF – funktsioonikadu (*loss-of-function*)

LZ – leutsiini-tõmbluku motiiv (*leucine zipper*)

MAF – minoorse alleeli sagedus (*minor allele frequency*)

MB – markeeritud boksi motiiv

MGI – *Mouse Genome Informatics*

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)

NES – tuuma ekspordi signal (*nuclear export signal*)

PIC – preinitsiatsioonikompleks (*preinitiation complex*)

RB – retinoblastoomi geen

RPL – *recurrent pregnancy loss*

SNV – ühenukleotiidne variant (*single nucleotide variant*)

TF – transkriptsioonifaktor

TFIIA – RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor A

TFIIB – RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor B

TFIID – RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor D

TFIIE – RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor E

TFIIF – RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor F

TFIIH – RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor H

TFDP1 – transkriptsioonifaktori dimeriseerumispartner 1

TFDP2 – transkriptsioonifaktori dimeriseerumispartner 2

TFDP3 – transkriptsioonifaktori dimeriseerumispartner 3

TSS – transkriptsiooni alguskoht (*transcription start site*)

Sissejuhatus

2016. aastal lõppes Eestis 2,4% kõigist rasedustest spontaanabordiga ehk raseduse iseenesliku katkemisega (Allvee ja Karro, 2017). Korduv raseduse katkemine (KRK) on multifaktoriaalne haigus, mis on seotud anatoomiliste, immunoloogiliste kui ka endokrinoloogiliste kõrvalekalletega, infektsioonide, keskkonnategurite, sperma kvaliteedi ning ema ja isa vanusega (Hyde ja Schust, 2015). Kuigi eelpool nimetati mitmeid põhjuseid, mis on seotud KRK-ga, siis kuni 50% patsientidest jääb haiguse põhjus ebaselgeks (Jevé ja Davies, 2014), mis muudab ravimise keerukaks ja seetõttu last saada üritavatele paaridele psühholoogiliselt väga kurnavaks (Saravolos ja Li, 2012, Arias-Sosa *et al.*, 2018).

Vanemate arvulised ja struktuursed tsütogeneetilised kõrvalekalded on üks põhjalikumalt uuritud geneetilistest korduva raseduse katkemise põhjustest (Regan *et al.*, 2011). Geneetika mängib inimese reproduktiivsuse efektiivsuses keerukat rolli. Kui varasemalt arvati, et spontaanabordi peamiseks põhjuseks on kromosomaalsed vead, siis üha enam on leitud fakte, et ka üksiku geeni defektid omavad olulist rolli raseduse kulgemises (Hyde ja Schust, 2015). Viimasel ajal on seoses KRK-ga esile kerkinud E2F transkriptsioonifaktorite perekond. Söber *et al.* 2016. aastal avaldatud artiklis, kus kasutati RNA-seq analüüsi ning võrreldi KRK paaride ning normaalse raseduse kuluga platsentasid, leiti, et enamus genee, mis olid erinevalt avaldunud KRK puhul võrreldes normaalsete rasedustega, olid reguleeritud just E2F transkriptsioonifaktorite poolt. Lisaks näitas Kasak *et al.* 2017 töö, et võrreldes KRK platsentadega hõlmavad normaalselt kulgenud raseduse platsentades toimunud struktuursed ümberkorraldused genee, millest enamik omavad E2F transkriptsioonifaktorite seondumissaite, viidates nende olulisusele raseduse edukas kulgemises.

Käesoleva töö eesmärkideks on sissejuhatava ülevaate andmine KRK-d põhjustavatest teguritest, transkriptsioonifaktoritest üldiselt ning täpsemalt E2F transkriptsioonifaktorite perekonnast. Eksperimentaalses osas viiakse KRK valimis läbi geneetilise varieeruvuse määramine E2F8 DNA-ga seondumise domeenis.

Bakalaureusetöö valmis Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi geenitehnoloogia õppekava raames. Eksperimentaalsena sooritati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudis, biomeditsiini osakonnas, inimese geneetika õppetoolis.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Korduv raseduse katkemine

Mehhanismid raseduse tekkimiseks ja selle edukaks kulgemiseks on keerulised ning nõuavad koordineeritud koostööd ema ja loote vahel. Raseduse tekkimiseks peab viljastunud munarakk liikuma emakasse, pesastuma ja ema organism raseduse omaks võtma. Samas ei tähenda edukas viljastumine automaatselt terve loote arenemist ja elussündi (Webster ja Schuh, 2017). Kuigi raseduse katkemist on tuvastatud kõigil imetajatel, siis on inimeste puhul täheldatud äärmist ebaefektiivsust – ainult 30% kõigist rasedustest jõuab elussünnini (Macklon *et al.*, 2002; Hyde ja Schust, 2015).

Raseduse katkemised võib jaotada kaheks: spontaanseks ehk juhuslikuks ja korduvaks (Stirrat, 1990). Spontaanabordiga lõppevad kuni 15% kliiniliselt tuvastatud rasedustest. Sellest tulenevalt on statistiliselt leitud, et populatsiooni oodatud korduva raseduse katkemise esinemissageduseks on 0,34% kolme raseduse katkemisega paaridel. Praktika näitab, et tegelikult esineb KRK-d 1-2% kõigist last saada üritavatest paaridest (Bashiri *et al.*, 2016), mis on ~6 korda kõrgem oodatud KRK esinemissagedusest. Kuigi nii juhuslik kui ka korduv raseduse katkemine toimub sageli kromosomaalsete anomaaliate tõttu, siis korduvat raseduse katkemist esineb sageli just täiesti terve kromosoomistikuga loodete puhul (Sullivan *et al.*, 2004). On täheldatud, et mida rohkem katkemisi on esinenud, seda suurem on tõenäosus, et järgmise raseduse puhul on loote kromosoomistik normaalne (Ogasawara *et al.*, 2000).

Varasemalt loeti korduvaks raseduse katkemiseks juhud, kus rasedus on järjest katkenud kolm või enam korda enne 20. rasedusnädalat (Stirrat, 1990). *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) uuemate soovitude kohaselt loetakse aga KRK juhtumite hulka ka need individid, kellel on esinenud kaks järjestikust raseduse katkemist enne 24. rasedusnädalat ja tuvastatavad on teised KRK defineerimise tingimused (ESHRE, 2017). Teiste KRK tingimuste hulka loetakse *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) kohaselt loote südametegevuse kaotust, normaalset loote kromosoomistikku, ema kõrget vanust ja paari subfertiilsust (ASRM, 2008).

Korduv raseduse katkemine jaotub omakorda kaheks – primaarseks, mil patsiendil pole mitme raseduse katkemise kohta ühtegi elussündi ja sekundaarseks, mil patsiendil on esinenud varasemalt ka elussünde (Ansari ja Kirkpatrick, 1998, Shahine ja Lathi, 2015). Naised, kes on esimest korda rasedad kui ka need, kelle eelnevad rasedused on lõppenud elussünniga, omavad väiksemat nurisünnituse riski võrreldes spontaanaborti kogunud naistega (Regan *et al.*, 1989; Nybo Andersen *et al.*, 2000). Iga järjestikku toimunud raseduse katkemine suurendab riski, et

ka järgnev rasedus katkeb. Kui kolme raseduse katkemisega paaridel on järgmise raseduse puhul elussünni tõenäosus 70%, siis neil paaridel, kellel on esinenud 5-6 raseduse katkemist, on elussünni tõenäosus ainult 50% (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2014). Selle üheks põhjenduseks on asjaolu, et naistel, kellel on esinenud raseduse katkemisi, lükkub rasestumine sellest tingituna üha hilisemasse ikka (Nybo Andersen *et al.*, 2000; Sauer, 2015).

Mida hilisemas eas naine rasedaks jääb, seda suurem tõenäosus on korduvaks raseduse katkemiseks kromosomaalsete anomaaliatega tõttu (Grande *et al.*, 2012). Kui 30-34-aastastel on raseduse katkemise tõenäosus 15%, siis 45-aastastel ja vanematel on see juba 75% (tabel 1), seega üle 40-aastastel naistel on eduka raseduse tõenäosus oluliselt vähenenud. Lisaks raseduse katkemisele ohustavad neid emakaväline rasedus ja lapse surnultsünd suurema tõenäosusega kui 30-ndates naisi (Nybo Andersen *et al.*, 2000).

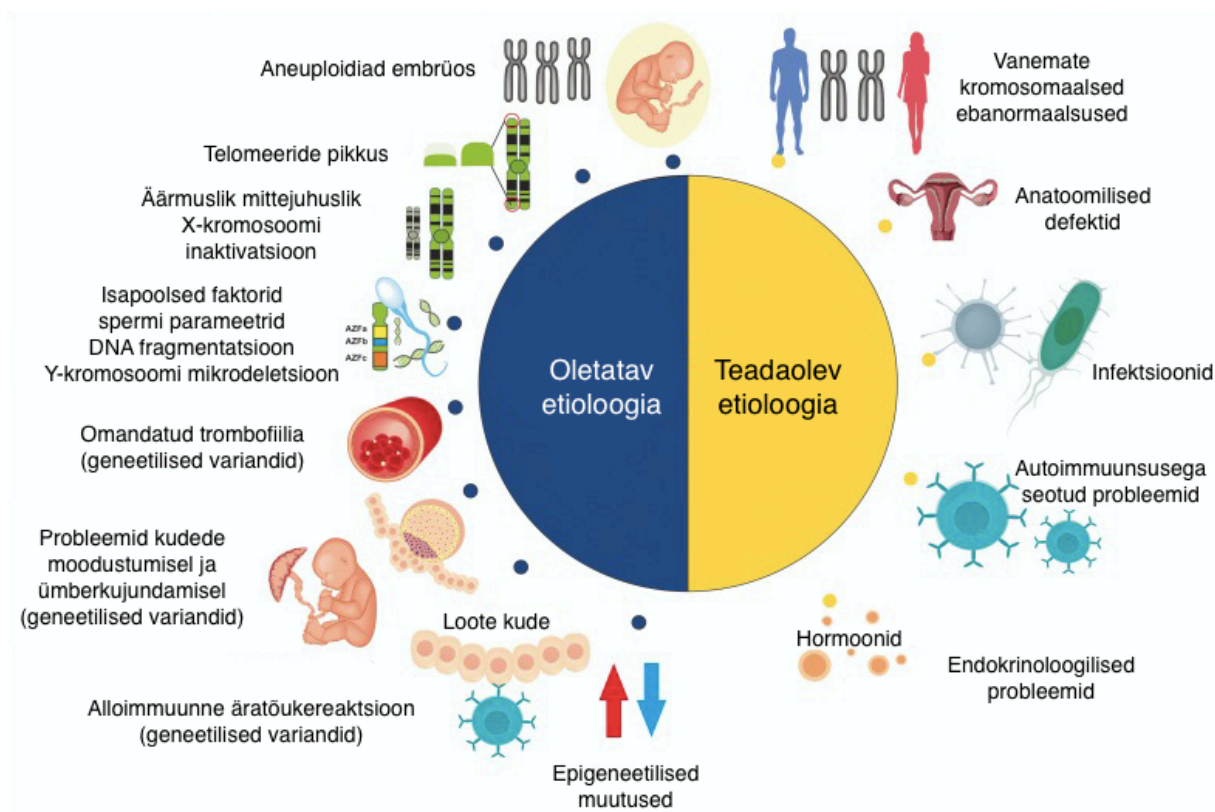
Tabel 1. Spontaanabordi määr sõltuvalt naise vanusest viljastamise hetkel (Nybo Andersen *et al.*, 2000 järgi).

| Kõigi raseduste arv | Naiste vanus aastates | Raseduse katkemisi (%) |
|---------------------|-----------------------|------------------------|
| 350395 | 20-24 | 9% |
| 414149 | 25-29 | 11% |
| 235049 | 30-34 | 15% |
| 93940 | 35-39 | 25% |
| 25132 | 40-44 | 51% |
| 1865 | ≥45 | 75% |

Andmed tabelis pärinevad Taani 1978-1992 aasta valimist, kus uuriti 634 272 naist, kellel esines kokku 1 221 546 rasedust.

Kuigi vanus mängib raseduse edukuse juures suurt rolli, on KRK siiski multifaktoriaalne haigus, mille põhjustajana on välja toodud mitmeid kõrvalekaldeid organismi normaalsest füsioloogiast ja geneetikast (Arias-Sosa *et al.*, 2018), kuid kuni 50% juhtudest jääb haiguse põhjus siiski ebaselgeks (Jeve ja Davies, 2014). KRK põhjuseid, mis on erinevates sõltumatutes teadusuuringutes leidnud korduvalt kinnitust võib defineerida kui teadaolevat KRK etioloogiat. Lisaks teadaolevale KRK etioloogiale on leitud kõrvalekaldeid, mille puhul on nähtud seost KRK-ga, kuid teadusuuringute tulemused on tihti üksteisega vastuolus ja teaduslikku konsensust nende kõrvalekallete ja haiguse etioloogia vahel veel saavutatud ei ole. Selliseid kõrvalekaldeid võib defineerida kui oletatavat KRK etioloogiat (Arias-Sosa *et al.*, 2018). Joonis

1 annab ülevaate KRK-ga seotud teadaolevast ja oletatavast etioloogiast, millest olulisemaid põhjusi kirjeldatakse käesoleva töö kirjanduse ülevaates.



Joonis 1. Korduva raseduse katkemisega seotud faktorid (Arias-Sosa *et al.*, 2018 järgi). Oletatav etioloogia, seos haigusega tuvastatud, kuid teaduslikku konsensust pole veel leitud; teadaolev etioloogia, tõestatud seos haigusega.

1.1.1 Raseduse katkemise endokrinoloogilised põhjused

KRK-ga on seotud mitmed endokrinoloogilised haigused. Naistel, kellel on esinenud 1-2 raseduse katkemist ning seerumis on tuvastatavad kilpnäärme autoantikehad, on suur tõenäosus ka tulevase raseduse katkemiseks (Prummel ja Wiersinga, 2004; Liu *et al.*, 2014), kuid otsest seost kilpnäärme autoantikehade kontsentratsiooni ja KRK esinemise vahel pole leitud (Ticconi *et al.*, 2011; Thangaratinam *et al.*, 2011).

KRK ühe põhjustajana on välja toodud ka prolaktiini madalat kontsentratsiooni basaalseerumis (Li *et al.*, 2013). Kuna prolaktiin omab rolli nii ovulatsiooni regulatsioonis kui ka endomeetriumi küpsemisel, siis põhjustab selle vähenenud kontsentratsioon nende oluliste protsesside häireid ja on seetõttu raseduse katkemisega tihedalt seotud (Hirahara *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2016).

KRK endokrinoloogilisi põhjuseid uurides on leitud, et folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) tase on KRK patsientidel võrreldes kontrollgrupi individidega kõrgem ($8,6 \pm 3,7$ U/l versus $7,1 \pm 3,9$ U/l), kuid Anti-Mülleri hormooni (AMH) tase on võrreldes kontrollidega

märgatavalt väiksem ($2,9 \pm 1,7$ ng/ml versus $3,6 \pm 1,7$ ng/ml). Märgatavalt rohkem on KRK patsientide hulgas ka vähenenud munarakkude reserviga naisi (defineeritud kui $FSH \geq 11$ U/l) ja naisi, kelle AMH tase on ≤ 1 ng/ml (Atasever *et al.*, 2016).

1.1.2 Raseduse katkemise immunoloogilised põhjused

Lisaks endokrinoloogilistele faktoritele on edukas raseduses oluline ka immuunsüsteemi roll. Loote kui poolallogeense organismi ellujäämine emaühis sõltub ema immuunsüsteemi ümberkorraldustest, ema immuunsüsteem ja loote antigeenid peavad tegema koostööd (Moffett-King, 2002; Sharma, 2014). Laialdaselt on uuritud loomulike tapjarakkude, mis on lümfotsüüdid ning osa kaasasündinud immuunsusest, ja reproduktiivse võimetuse vahelist seost. Perifeerne veri ja emaka limaskest sisaldavad mõlemad loomulikke tapjarakke, kuid nende rakkude fenotüüp ja funktsioon on erinevates kudedes erinev (Koopman *et al.*, 2003). Uuringutes on leitud, et võrreldes kontrollidega on KRK naiste veres CD56+ loomulike tapjarakkude arv raseduse eel märgatavalt kõrgem ning lisaks on neil suurenenud loomulike tapjarakkude tsütotoksilisus (Lee *et al.*, 2013; Karami *et al.*, 2012).

Antifosfolipiidsündroomi (APS) on juba pikka aega KRK-ga seostatud ning see on ka üks väheseid KRK põhjusi, mida on võimalik ravida. APS on KRK põhjuseks 5-20% paaridest (El Hachem *et al.*, 2017). APS-i puhul esinevad veres antifosfolipiidantikehad (aPL) – 20-liikmeline antikehade perekond, mis on suunatud fosfolipiide seondavate plasmavalkude vastu (Rai ja Regan, 2006; Lim, 2013). aPL esinemine põhjustab tromboosi, takistab trofoblasti diferentseerumist ja invasiooni ning võib esile kutsuda põletiku ja immuunvastuse ema-loote kokkupuutekohas (Di Simone *et al.*, 2001; Bashiri *et al.*, 2016). Kuni 90% diagnoositud antifosfolipiidsündroomiga juhtudest, mida ei ravita, lõpevad raseduse katkemisega (Rai *et al.*, 1995).

1.1.3 Raseduse katkemise anatoomilised põhjused

KRK patsientide puhul on täheldatud, et nii kaasasündinud kui ka elu jooksul tekkinud emaka anomaaliatega esinemissagedus on üldpopulatsiooniga võrreldes kuni 3 korda kõrgem (ASRM, 2012). On võrreldud emaka anatoomiliste iseärasuste esinemissagedust ≥ 2 ja ≥ 3 katkemisega indiviidide puhul ning leiti, et esinemissagedus on mõlemal juhul sarnane. KRK seisukohalt olulisteks kaasasündinud Mülleri juha väärarenguteks peetakse vaheseinaga emakat, nii ühe- kui ka kahesarvelist emakat ja kahekordset emakat (Saravolos *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2011). Elu jooksul tekkinud emaka anomaaliatega on KRK seisukohalt olulised submukoosne müoom, endomeetriumi polüüp ning Ashermani sündroom (emakasisesed liited) (Hooker *et al.*, 2014). 2013. aastal Jaslowi ja Kuttehi poolt läbi viidud uuring näitas, et kõige rohkem on KRK patsientidel täheldatud elu jooksul tekkinud emaka anomaaliaid (12,9%), seejärel

kaasasündinud emaka iseärasusi (7%) ning 0,6% KRK patsientidest esinesid nii kaasasündinud kui ka elu jooksul tekkinud emaka anomaaliad (Jaslow ja Kutteh, 2013).

1.1.4 Mehe mõju raseduse katkemisele

Mehe mõju on korduva raseduse katkemise puhul seostatud ebanormaalse spermi kromosoomistikuga (Giorlandino *et al.*, 1998), kuid ainult 7% loote trisoomiatest on tekkinud isa meiotiliste vigade tõttu (Robinson *et al.*, 1999). Võrreldes kontrollidega on täheldatud, et KRK patsientide seemnerakud on küll normaalse morfoloogiaga, kuid vähem elujõulised ja liiguvad ning neil esineb ka rohkem sperme, mille DNA on kahjustatud (Ruixue *et al.*, 2013, Bareh *et al.*, 2016). KRK patsientide puhul on täheldatud, et neil esineb DNA fragmenteeritust sagedamini, kui viljakatel meestel (Carlini *et al.*, 2017). Lisaks eelnevale on KRK patsientide spermides täheldatud rohkem sugukromosoomide disoomiaid, mis kujutavad endast täiendavat kromosoomi suguraku haploidses seisundis (Hyde ja Schust, 2015). Kui spermi kromosomaalsete aneuploidiate ja apoptoosi esinemist uuriti idiopaatilistel KRK patsientidel, nähti, et võrreldes kontrollidega on aneuploiduse määr märkimisväärselt suurem (Carrell *et al.*, 2003, Zidi-Jrah *et al.*, 2016). Lisaks eelnevale arvatakse, et KRK-ga on seotud ka Y-kromosoomi mikrodeletsioon azoospermia faktori regioonis, mis vastutab spermatogeneesi normaalse toimimise eest (Agarwal *et al.*, 2015). Kuigi ka mehe vanuse mõju raseduse edukusele on palju uuritud, siis nii selget mehhanismi ja seost kui naistel nende tunnuste vahel leitud ei ole (Kushnir *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2015).

1.1.5 KRK tsütogeneetilised põhjused

Üheks raseduse ebaõnnestumise põhjuseks on ootsüütide segregatsiooni käigus toimunud vead. On leitud, et alla 30-aastaste naiste ootsüütidest isegi kuni 61% ei ole normaalse kromosoomide arvuga (Webster ja Schuh, 2017). Kui aneuploidsed munarakud viljastuvad, tekib selle tagajärjel ka aneuploidne embrüo, mis enamasti funktsionaalset blastotsüsti ei moodusta (Macklon *et al.*, 2002; Hyde ja Schust, 2015).

Esimese trimestri raseduse katkemise kõige levinumaks põhjuseks on kromosomaalne anomaalia – autosomaalne trisoomia (3/5 juhtudest), X-kromosoomi monosoomia (1/5) ja polüploidus (1/5) (Silver ja Branch, 2007) ning 90% kõigist sellistest kromosomaalselt ebanormaalsetest loodetest aborteerub iseeneslikult (Jacobs ja Hassold, 1987; Shahine ja Lathi, 2015). Siiski on leitud, et ka normaalse kromosoomistikuga loodetest aborteerub 7% iseeneslikult (McFadyen, 1989).

KRK naiste puhul on täheldatud heterotrisoomia esinemist, see tähendab, et pärast üht trisoomiaga rasedust on neil oht järgmise raseduse ajal saada teist tüüpi trisoomiaga loode (Warburton *et al.*, 2004). Kromosomaalsete anomaaliade tüüp ja esinemissagedus on nii KRK

patsientidel kui ka kõrgemas vanuses rasedatel sarnased (Mantzouratou *et al.*, 2007). KRK patsientidel, kes läbisid kunstliku viljastamise, esines rohkem ebanormaalseid embrüoid kui sama vanadel kunstlikku viljastamist kasutanud kontrollgrupi indiviididel, kellel polnud KRK probleemi (Rubio *et al.*, 2003).

1.1.6 Geneetika mõju korduva raseduse katkemisele

KRK ja geneetika vahelisele seosele viitab, et idiopaatilise KRK patsientide lähisugulastel esineb KRK-d 6 korda suurema tõenäosusega, kui kontrollidel (Christiansen *et al.*, 1990). Lisaks sellele on näidatud, et võrreldes üldpopulatsiooniga ohustab idiopaatilise KRK patsientide õdesid-vendi raseduse katkemine 2 korda suurema tõenäosusega (Kolte *et al.*, 2011).

On näidatud, et vanemate kariotüüpsete kõrvalekallete, sealhulgas tasakaalustatud translokatsioonide, esinemissagedus on KRK paaridel kõrgem (2-5%) kui üldpopulatsioonil (0,2%) (Regan *et al.*, 2011). Translokatsioone on kaht tüüpi – tasakaalustatud ja tasakaalustamata. 3-4% KRK paaridest esineb vanematel tasakaalustatud translokatsioon (Stephenson ja Sierra, 2006). Tasakaalustatud translokatsioonide kandjatel tavaliselt haiguslikke sümptomeid ei esine, kuna neil on säilinud igas lookuses kogu vajaminev geneetiline informatsioon. Probleem võib esile kerkida gametogeneesi käigus, kus kromosoomide lahknemine võib tekitada tasakaalustamata translokatsioone. Sellised tasakaalustamata sugurakud võivad põhjustada raseduse katkemise riski suurenemist või tekitada lootele kaasasündinud väärarenguid (Ikuma *et al.*, 2015). Kuigi ebanormaalset kariotüüpi (enamasti tasakaalustamata translokatsiooni) kannavad 2/3 tasakaalustatud translokatsiooniga vanemate embrüotest, siis üldine sündimus ületab nende puhul siiski 60% (Franssen *et al.*, 2006).

Lisaks kariotüüpsetele kõrvalekalletele on uuritud ka üksikuid gene, mis hüpoteeside kohaselt võiksid KRK-ga seotud olla. KRK-d põhjustavate konkreetsete geenide väljaselgitamiseks on viidud läbi palju uuringuid, mille käigus on leitud, et enamik uuritud gene mängivad rolli immuunsüsteemi häirete ja põletike tekitamises, vere hüübimises, platsenta arengus ja funktsioneerimises (Rull, *et al.*, 2012; Pereza *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017). KRK-ga seotud ühe geeni uuringute süstemaatilises ülevaates käsitleti 428 juht-kontroll uuringut, mis uurisid geneetilisi seoseid idiopaatilise KRK-ga. Neis töödes keskenduti naiste puhul 187 geeni 472 variandile, millest KRK-ga seotuks tunnistati 21 varianti geenides, mis omasid rolli immuunvastuse tekkes (*IFNG*, *IL10*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *MBL*, *TNF*), vere koaguleerumises (*F2*, *F5*, *PAI-1*, *PROZ*), ainevahetuses (*GSTT1*, *MTHFR*) ja angiogeneesis (*NOS3*, *VEGFA*). Kuigi seoseid konkreetse geeni ja KRK vahel leidub, siis tihti on uuringud

vasturääkivad, puudub kontrollgrupp või raskendab seose kinnitamist erinevates uuringutes kasutatav KRK erinev defineerimine (Pereza *et al.*, 2017). Kogu eksoomi sekveneerimise abil uuriti SNV-de mõju KRK fenotüübile ning nähti, et geenides *DYNC2H1*, mida on seostatud loote letaalsusega ja *ALOX15*, mis on seotud platsenta häiretega, angiogeneesi ning põletikega, esinevad KRK patsientidel mutatsioonid (Qiao *et al.*, 2016).

Kuigi nii juhusliku kui ka korduva raseduse katkemise puhul on leitud mitmeid katkemise tõenäosust suurendavaid tegureid, nagu näiteks ülalpool kirjeldatud endokrinoloogilised, immunoloogilised ja anatoomilised faktorid, põetud infektsioonid ning vanemate kromosomaalsed anomaaliad, siis kuni 50% KRK juhtudest ei suudeta katkemise põhjust tuvastada (Ford ja Schust, 2009; Jaslow *et al.*, 2010; Bashiri *et al.*, 2016; Popescu *et al.*, 2018).

Uuringutest on välja tulnud, et korduvate raseduskatkemistega indiviidide platsentas on paljud rakkude ning genoomi põhiülesanded alareguleeritud. Sellest tulenevalt ei suuda platsenta rakud tagada replikatsiooniks, kromosoomide struktuuri loomiseks, transkriptsiooniks, RNA protsessimiseks, sünteesitud valkude transpordiks, geenide õigeaegseks avaldumiseks ning mitokondrite normaalseks töötamiseks vaja minevate valkude ning komplekside tootmist (Söber *et al.*, 2016). Häirete esinemine neis põhilistes rakuprotsessides põhjustab negatiivseid kõrvalekaldeid imetajate endotsükli. Endotsükkel kujutab endast trofoblasti rakkude proliferatsiooni ning diferentseerumist ehk rakkude spetsialiseerumist, mis on olulise tähtsusega raseduse algusperioodil, mil lühikese aja jooksul peab ühest viljastatud munarakust arenema töökorras platsenta ning normaalne loode (Chen *et al.*, 2012). On leitud, et nendel allareguleeritud geenidel on olemas E2F transkriptsioonifaktorite seondumissaidid (Söber *et al.*, 2016). E2F transkriptsioonifaktorid ongi seotud just imetajate endotsükli replikatsiooni masinavärgi reguleerimisega (Chen *et al.*, 2012).

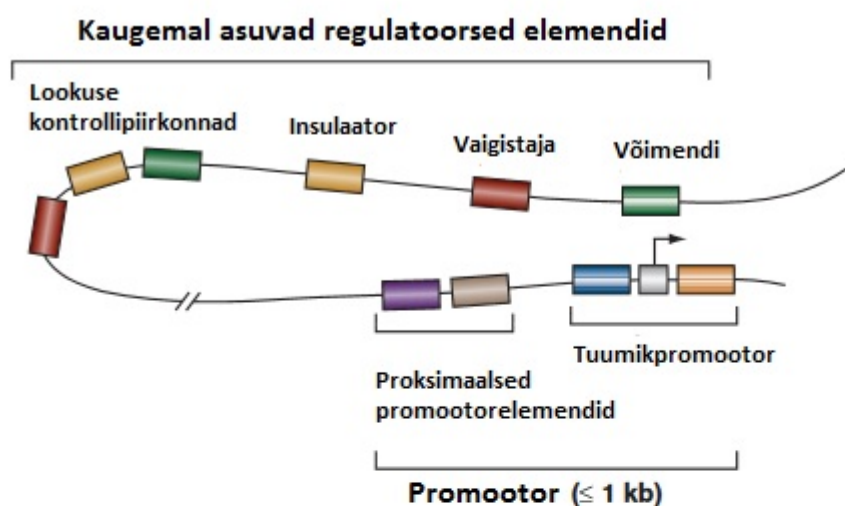
1.2 Transkriptsiooni masinavärk ja transkriptsioonifaktorid

Eukarüootide valku kodeerivate geenide ekspressiooni saab reguleerida mitmel erineval viisil, näiteks transkriptsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni reguleerimisega või siis kontrollides mRNA protsessimist, transporti, translatsiooni ja stabiilsust (Lee ja Young, 2013). Arvatakse, et peamine eukarüootsete geenide ekspressiooni reguleerimine toimub transkriptsiooni initsiatsiooni etapis järjestusspetsiifiliste transkriptsioonifaktorite seondumisega promootorile (Johnson *et al.*, 2007).

Eukarüootides viib mRNA transkriptsiooni läbi DNA seoseline RNA polümeraas II. Geenid sisaldavad tavaliselt kaht erinevat tüüpi *cis*-toimelisi transkriptsiooni reguleerivaid elemente, mis aitavad RNA polümeraas II-l transkriptsiooni läbi viia (Lelli *et al.*, 2012): 1) promootor,

mis koosneb tuumikpromootorist ning lähedalasuvatest promootorelementidest (Lenhard *et al.*, 2012); 2) kaugemal asuvad reguleerivad elemendid, milledeks võivad olla enhanserid ehk võimendid (Bulger ja Groudine, 2011), *silencer*-id ehk vaigistajad (Petrykowska *et al.*, 2008), insulaatorid ning lookuse kontrollipiirkonnad (Maston *et al.*, 2006).

Promootor on tavaliselt veidi alla 1 kbp pikk ning eelnevalt mainitud reguleerivad elemendid paiknevad tavaliselt kuni 1 Mbp kaugusel promootorist. Need reguleerivad elemendid võivad promootoripiirkonnaga kontakteeruda, kui DNA moodustab lingutaolise struktuuri (Krivega ja Dean, 2012). Joonisel 2 on välja toodud tüüpilise geeni reguleeriva piirkonna skeem (Maston *et al.*, 2006).



Joonis 2. Geeni reguleeriva piirkonna skeem (Maston *et al.*, 2006 järgi).

Eelnevalt välja toodud *cis*-toimelised elemendid, täpsemalt enhanserregioonid, sisaldavad endas mitmeid erinevaid *trans*-toimelisi DNA seondumissaite, millele seonduvad transkriptsioonifaktorid (TF). TF-ide seondumispiirkonnad on tavaliselt lühikesed, 6-12 aluspaari pikkused piirkonnad genoomis (Spitz ja Furlong, 2012), kusjuures seondumisspetsiifilisuse dikteerivad mitte rohkem kui 4-6 alust selles alas (Cassens ja Gewirth, 2004). Transkriptsioonifaktorid võivad olla nii transkriptsiooni aktivaatorid kui ka repressorid (Maston *et al.*, 2006). TF-id seonduvad tihti ka kofaktoritega, mis on valgulised kompleksid, millel DNA-ga seondumise võime puudub, kuid TF-idega koostöös võivad käituda aktivaatorite või repressoritena (Lee ja Young, 2013).

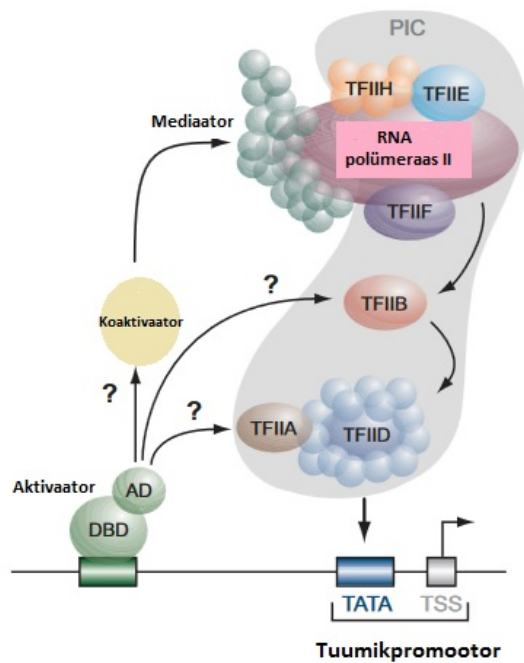
Promootori struktuur on keerukas, sisaldades tavaliselt mitmeid erinevaid reguleerivaid elemente. Keerulise ehituse vajalikkus tuleneb sellest, et igal geenil on talle iseloomulik aja-

ning koespetsiifiline avaldumismuster (Djebali *et al.*, 2012). Inimese genoomis on umbes 19000 valku kodeerivat geeni (Ezkurdia *et al.*, 2014) ja >1000 transkriptsioonifaktorit (Vaquerizas *et al.*, 2009), mida on eeldatavasti palju vähem kui genereeritavaid ekspressioonimustreid. Erinevate reguleerivate elementide esinemine promootoris annab võimaluse nende erinevaks omavaheliseks kombineerimiseks, mis kombinatoorika kohaselt kasvatab unikaalsete ekspressioonimustrite arvu eksponentsiaalselt (Venter *et al.*, 2001).

Eukarüoodi valke kodeerivate geenide transkriptsioonis osalevad faktorid võib jagada kolme gruppi: üldised transkriptsioonifaktorid, promootorispetsiifilised aktivaatorvalgud ehk lühidalt aktivaatorid ja koaktivaatorid.

Üldiste transkriptsioonifaktorite hulka kuuluvad RNA polümeraas II ise ning mitmed abistavad komponendid, nagu näiteks TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF ja TFIIH. Nende ülesandeks on moodustada preinitsiatsioonikompleks (PIC), mis suunab RNA polümeraasi transkriptsiooni alguskohta (TSS), kusjuures TFIID sisaldab TATA-seoselist valku, mis seondub TATA-järjestusega. Nad on hädavajalikud kõigi või peaaegu kõigi geenide transkriptsiooni läbiviimisel (Maston *et al.*, 2006).

Lisaks üldistele transkriptsioonifaktoritele on edukaks transkriptsiooniks vaja transkriptsiooni aktivaatoreid – järjestusspetsiifilisi DNAGA seonduvaid valke, mille äratundmisjärjestus asub tavaliselt tuumikpromootorist ülesvoolu. Lisaks DNA-ga seondumise domeenile (DBD) omavad tüüpilised aktivaatorid ka aktivatsioonidomeeni, mida on vaja transkriptsiooni stimuleerimiseks (Ptashne ja Gann, 1997). Joonisel 3 on kujutatud eukarüoodi transkriptsiooni masinavärgi skeemi (Maston *et al.*, 2006).



Joonis 3. Eukarüoodi transkriptsiooni masinavärgi skeem (Mason *et al.*, 2006 järgi). DBD, DNA-ga seondumise domeen; AD, aktivatsioonidomeen; TFIIIX, RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor X, kus X tähistab suvalist erinevatest faktoritest, mida märgitakse tähisega A-st H-ni; PIC, preinitsiatsioonikompleks; TSS, transkriptsiooni alguskoht; TATA, eukarüootsete geenide konserveerunud promootorjärjestus, mis määrab transkriptsiooni algussaidi.

Transkriptsiooni aktivatsioonil on oluliseks teguriks DNA-ga seondumine selleks spetsialiseerunud domeenide kaudu, mille abil jagatakse TF-id kolmeks (Pabo ja Sauer, 1992): tsinksõrmede motiivi omavad TF-id, heeliks-pööre-heeliks motiivi ehk homeodomeeni motiivi omavad TF-id ja heeliks-ling-heeliks motiivi omavad TF-id (Vaquerizas *et al.*, 2009). Transkriptsioonifaktorid võivad DNA-ga seonduda nii hetero- kui ka homodimeeridena ning seetõttu on nende seondumiskiirkonnad jaotunud kaheks poolikuks saidiks (Caessens ja Gewirth, 2004).

On teada, et suur osa transkriptsiooni masinavärgist on evolutsiooniliselt konserveerunud ja sarnane alates bakteritest kuni kõige keerulisemate eukarüootideni (Venter *et al.*, 2001), samas on näidatud, et näiteks E2F transkriptsioonifaktorid on konserveerunud nii taimedes kui ka loomades, kuid mitte pärmides (Lammens *et al.*, 2009). Nii nagu mitmedki teised valkude perekonnad, mis on inimesel selgrootutega sarnased, osalevad ka transkriptsioonifaktorid nii rakusisestes kui ka rakkudevahelistes signaaliradades, eriti just neis, mis on seotud arengu ja diferentseerumisega (Venter *et al.*, 2001).

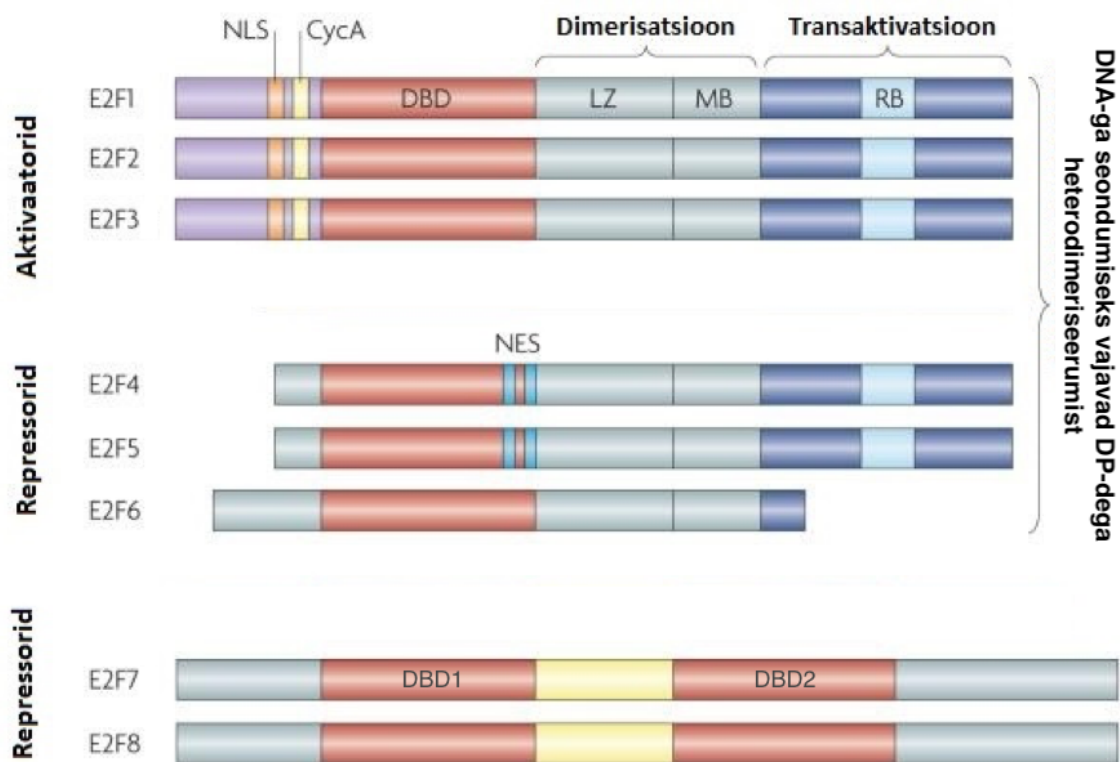
Lisaks teiste geenide reguleerimisele võivad transkriptsioonifaktorid ka iseenda või teiste TF-ide avaldumist reguleerida. Selline koordineeritud koostöö erinevate transkriptsioonifaktorite vahel tagab ka kõige keerukamate rakuprotsesside efektiivse toimimise (Neph *et al.*, 2012).

1.2.1 E2F transkriptsioonifaktorite perekond

E2F transkriptsioonifaktorid avastati algselt selle tõttu, et neil oli võime seonduda adenoviiruse varajase geeni (E2) promootorile, mille tulemusena aktiveerisid nad antud viiruse geeniekspressiooni (Kovesti *et al.*, 1986; Thurlings ja de Bruin, 2016). Alles hiljem avastati, et E2F TF-id seonduvad ka mitmete mitteviiruseliste geenide promootoritele. Nende geenide puhul oli teada, et nad omavad rolli nii DNA-s oleva info avaldamise kui ka raku kasvamise juures ja sellest tulenevalt julgeti E2F TF-e otseselt seostada rakutsükli kontrolliga (Reichel *et al.*, 1987). Alles pärast seda avastust tuvastati, et E2F TF-e on mitmeid ja neil on *Transcription Factor Target Gene Database* andmetel >2000 sihtmärkgeeni, millest enamus osalevad rakutsükli reguleerimises ja mille ekspressiooni E2F TF-id omakorda reguleerivad (Thurlings ja de Bruin, 2016).

Täpsemalt on E2F transkriptsioonifaktorite perekonnas kaheksa erinevat geeni, mis kodeerivad kaheksat valku (Chen *et al.*, 2009). *In vitro* läbi viidud uuringute põhjal jagatakse E2F transkriptsioonifaktorite perekond aktivaatoriteks (E2F1-E2F3) (Wu *et al.*, 2001) ja repressoriteks (E2F4-E2F8) nii nagu on näidatud joonisel 4 (Chen *et al.*, 2009).

Kuigi lihtsustatult on E2F-id jagatud aktivaatoriteks ja repressoriteks, siis tegelik töömehhanism on keerulisem – sõltuvalt rakust, sihtmärkgeenist ja kofaktoritest võib üks E2F olla nii transkriptsiooni aktivaator kui ka repressor. Oluline on see, et E2F-id toimivad tavaliselt ühtse tasakaalustatud võrgustikuna (Zhan *et al.*, 2014).



Joonis 4. Imetajate E2F transkriptsioonifaktorite perekonna liikmed (Chen *et al.*, 2009 järgi). DBD, DNA-ga seondumise sait; DP, dimerisatsioonipartner; LZ, leutsiini tõmbluku järjestus; MB, markeeritud boksi motiivi järjestus; NLS, tuuma lokalisatsiooni signaal; CycA, tsükliin-A-ga seondumise sait; NES, tuuma ekspordi signaal; RB, retinoblastoomi transaktivatsiooni domeen.

Nii nagu ka kõigil teistel transkriptsioonifaktoritel, on ka selle perekonna liikmetel võime seonduda DNA-ga ja kuna seondumisdomeenid on väga konserveerunud, siis erinevate geenide reguleerimiseks kasutatakse erinevate kofaktorite abi (DeGregori *et al.*, 2006). DNA-ga seondumiseks on E2F transkriptsioonifaktoritel seondumissait, mis on heeliks-pööre-heeliks struktuuriga, täpsemalt *winged* heeliks-pööre-heeliks motiiviga (Morgunova *et al.*, 2015).

Jooniselt 4 on näha, et suur osa selle perekonna liikmetest (E2F1-E2F6) peavad DNAGA seondumiseks moodustama heterodimeere. Heterodimeere moodustatakse ühega kolmest valgulisest dimeriseerumispartnerist (DP), milledeks on TFDP1, TFDP2 ja TFDP3. Sellist dimeriseerumist vahendavad leutsiini-tõmbluku (LZ) ning markeeritud boksi (MB) motiivi järjestused. Transkriptsioonifaktorid E2F1-E2F6 omavad ainult üht DNA-ga seonduvat domeeni (DBD) (Chen *et al.*, 2009), E2F7-E2F8 omavad lisaks ka teist DBD-d, mille tõttu kutsutakse neid ka atüüpilisteks E2F-ideks (Lammens *et al.*, 2009) ja just nende kahe DBD

tõttu ei vaja nad erinevalt teistest E2F-idest DNA-ga seostumiseks valguliste partneritega dimeriseerumist (Li *et al.*, 2008; Ouseph *et al.*, 2012). Atüüpiliste E2F-ide DBD tunneb ära sihtmärkjärjestuse promootoril, mille kaudu toimub transkriptsioonifaktori seondumine DNA-le (Chen *et al.*, 2009). Kuigi tavalised ja atüüpilised E2F TF-id omavad DNA-ga seondumiseks erinevaid domeene, siis sihtmärkjärjestused promootoril on neil küllaltki sarnased (Morgunova *et al.*, 2015).

Huvitav on teada, et kõik E2F perekonna geenid paiknevad erinevatel kromosoomidel, *E2F1-E2F6* on kõik üksteise paraloogid ja *E2F7-E2F8* on omakorda üksteise paraloogid. Kõigi perekonnaliikmete geenid on väga varieeruva suurusega alustades 6750 bp *E2F4*-st lõpetades 91549 bp pikkuse *E2F3*-ga. Kõigi perekonda kuuluvate geenide iseloomustavad parameetrid on välja toodud tabelis 2, mis on koostatud järgnevates andmebaasides *The Human Protein Atlas* (Uhlén *et al.*, 2015), *Ensembl* (Hunt *et al.*, 2018) ja *UCSC Genome Browser* (Kent *et al.*, 2002) saadaoleva informatsiooni põhjal.

Tabel 2. E2F perekonna geenide iseloomustus tuginedes avalikes andmebaasides saadaolevale informatsioonile.

| Geen | <i>E2F1</i> | <i>E2F2</i> | <i>E2F3</i> | <i>E2F4</i> | <i>E2F5</i> | <i>E2F6</i> | <i>E2F7</i> | <i>E2F8</i> |
|---------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| RNA ekspressioon platsentas | +++ | ++ | +++ | ++++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| RNA ekspressioon endomeetriumis | ++ | + | +++ | ++++ | +++ | +++ | + | + |
| RNA ekspressioon emakas | ++ | + | +++ | ++++ | +++ | +++ | + | ++ |
| Asukoht | 20q11.22 | 1p36.12 | 6p22.3 | 16q22.1 | 8q21.2 | 2p25.1 | 12q21.2 | 11p15.1 |
| Eksonite arv (GT) | 7 | 7 | 7 | 10 | 8 | 7 | 13 (12 kodeerivat) | 13 (12 kodeerivat) |
| Geeni suurus (bp) | 10722 | 24791 | 91549 | 6750 | 37294 | 21775 | 44334 | 17558 |
| AH arv (GT) | 437 | 437 | 465 | 413 | 346 | 281 | 911 | 867 |
| Mass (kDa) (GT) | 46,9 | 47,5 | 49.2 | 44 | 37,6 | 31,8 | 99,9 | 94,2 |
| Ortoloogide arv | 61 | 63 | 66 | 68 | 68 | 71 | 64 | 66 |
| Paraloogide arv ja nimed | 5 (E2F2 - E2F6) | 5 (E2F1, E2F3 - E2F6) | 5 (E2F1, E2F2, E2F4 - E2F6) | 5 (E2F1 - E2F3, E2F5, E2F6) | 5 (E2F1 - E2F4, E2F6) | 5 (E2F1- E2F5) | 1 (E2F8) | 1 (E2F7) |
| Transkriptide arv | 1 | 2 | 3 | 13 | 8 | 12 | 7 | 5 |

GT, *golden transcript*; DBD, DNA-ga seondumise domeen; AH, aminohape. Ekspresseeritus platsentas võetuna *The Human Protein Atlas* andmebaasist: +, madal; ++, keskmine; +++, kõrge; +++++, väga kõrge (8 proovi põhjad, Uppsala Biopank), samast andmebaasist on võetud ka geeni pealt sünteesitud valgu mass. Transkriptide arv, aminohapete arv, ortoloogid ja paraloogid on võetud *Ensembl* andmebaasist. Geeni suurus, asukoht ning eksonite arv põhinevad *UCSC Genome Browser* andmebaasis olevatel andmetel.

1.2.2 Transkriptsioonifaktor E2F8

E2F8 on kõige hiljutisemalt identifitseeritud E2F transkriptsioonifaktorite perekonna liige, millel on kaks DNA-ga seondumise domeeni. Antud transkriptsioonifaktor kontrollib geeniekspressiooni dimeriseerumispartnerist sõltumatult (Lv *et al.*, 2017). *E2F8-1* on *Transcription Factor Target Gene Database* andmetel 782 sihtmärkgeeni, mille avaldumise reguleerimises ta osaleb (Plaisier *et al.*, 2016). *E2F8* paigutub inimesel 11 kromosoomi lühikeses õlas ning sisaldab 13 eksonit ja 12 intronit (Maiti *et al.*, 2005). Initsiaatorkoodon ATG asub teises eksonis ja terminaatorikoodon TGA paikneb 13. eksonis (Christensen *et al.*, 2005). Andmebaasi *The Human Protein Atlas* andmetel on *E2F8* mRNA kujul ekspresseeritud inimese luuüdis, immuunsüsteemiga seotud organites, lihastes, soolestikus, kusepõies, sapipõies, soolestikus, munandites, eesnäärmes, rindades, emakas, nahas ja platsentas (Uhlén *et al.*, 2015). Inimese platsentas on *E2F8* ekspresseeritud hattude vahel olevas trofoblastis, detsiidua rakkudes ja tsütotrofoblastis (Mizuno *et al.*, 2019).

E2F8 ekspresseeritus kudedes sõltub mitmetest teguritest. Näiteks näitavad hiiremudelites läbi viidud *in vivo* katsed, et atüüpilised E2F repressorid on üksteise ekspressioonist sõltuvad. Täpsemalt tuvastati, et kui *E2f7* välja lülitati, tõusis *E2f8* tase, kuid *E2f8* välja lülitamine *E2f7* taset ei tõstnud, mis näitab, et *E2f8* suudab ilmselt *E2f7* puudujääki kompenseerida, kuid vastupidist efekti ei esine (Qi *et al.*, 2015). Lisaks *E2f7* ja *E2f8* vastastikusele mõjutamisele on uuritud ka seda, kuidas naissuguhormoonid mõjutavad nende geenide avaldumist. Leiti, et progesteron ja östrogeen ei mõjuta *E2f7* ekspresseerituse taset, kuid mõjutavad *E2f8* ekspressiooni, kusjuures progesteron võib *E2f8* ekspressiooni tõsta lausa 9-kordseks (Qi *et al.*, 2015).

E2F8 roll inimese organismis on angiogeneesi, lümfogeneesi ja embrüonaalse arengu reguleerimine (Lv *et al.*, 2017). Lisaks on *in vivo* hiiremudelite abil kindlaks tehtud, et *E2f8* mRNA-d on platsentas kõrgemalt ekspresseeritud kui loote kudedes (Ouseph *et al.*, 2012), mis viitab sellele, et *E2f8* mängib hiire platsenta arengus ja kasvus olulist rolli. Selle põhjal võib oletada, et ta omab rolli ka inimese platsenta arengus (Mizuno *et al.*, 2019).

Uurides histoloogiliste meetoditega topelt *knockout* (*E2f7^{-/-};E2f8^{-/-}*) mutantide platsentasid nähti, et platsenta struktuur oli tõsiselt kahjustunud ja üleüldse olid mutantide platsentad väiksemad. Uuringud loote- ja platsentaspetsiifiliste *cre* hiireliinide peal on näidanud, et *E2f7/E2f8* funktsioon on ekstraembrüonaalse trofoplasti liinis äärmiselt oluline, et loodet kanda (Ouseph *et al.*, 2012).

Mida kõrgem on geeni *E2F8* ekspressioon, seda vähem ekspresseeritakse teiste E2F geeniperekonna geenide (välja arvatud *E2F7*) sihtmärkgeene ja see omakorda aeglustab rakkude prolifereerumist (Christensen *et al.*, 2005; Maiti *et al.*, 2005). Lisaks rakkude proliferatsiooni aeglustamisele omab E2F8 rolli ka rakkude polüploidseks muutumise juures, mis on oluline protsess platsenta arengus (Chen *et al.*, 2012). Täpsemalt osaleb E2F8 suurte trofoblastirakkude ja detsiidua rakkude polüploidiseerumises (Ouseph *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2015).

In vivo knockout hiiremudelites läbi viidud katses nähti, et polüploidsete rakkude arv vähenes, kui *E2f8* oli välja lülitatud. Inimese puhul on näidatud, et kui *E2F8* on alla reguleeritud, siis detsiidua polüploidiseerumist ei toimu üldse, kuna tavaolukorras on *E2F8* detsidualiseerumise käigus kõrgelt ekspresseeritud (Qi *et al.*, 2015).

Lisaks on hiirtel läbi viidud uuringud näidanud, et vähemalt üks *E2f7* või *E2f8* alleel on oluline embrüo arengu ja ellujäämise seisukohast. Kui hiires lülitati välja kas *E2f7* või *E2f8*, siis märkimisväärset muutust embrüo arengus ei täheldatud. Mõlema geeni kombineeritud välja lülitamine tõi endaga kaasa massilise rakkude apoptoosi, veresoonte laienemise ja hemorraagia, mis põhjustasid embrüo surma (Li *et al.*, 2008).

2 Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli analüüsida varasemalt Söber *et al.* 2016 ja Kasak *et al.* 2017 töödes korduvate raseduskatkemistega seostatud transkriptsioonifaktorite perekonda E2F. Andmebaasides *Mouse Genome Informatics* (MGI), *The Exome Aggregation* (ExAC) ja *The Genome Aggregation Database* (gnomAD) ning kirjanduses oleva info põhjal valiti geeniperekonnast välja *E2F8* geen. *E2F8* välja valimise põhimõtteid on kirjeldatud käesoleva töö punktis 2.2.1. Selleks, et kaardistada geeni kriitilisema tähtsusega piirkonnad, uuriti kirjandust ja leiti, et olulised konserveerunud regioonid on DNA-ga seondumise domeeniks olevad eksonid 4-7, mis valiti välja geneetilise varieeruvuse tuvastamiseks korduva raseduse katkemise valimis.

Täpsemad eesmärgid olid:

- 1) *E2F8* geeni valitud piirkondades esinevate (ühenukleotiidsete) variantide tuvastamine Eesti korduva raseduse katkemise valimis
- 2) Tuvastatud variantide esinemissageduste võrdlus rahvusvahelise eksoomi ja genoomi sekveneerimise avaliku andmebaasiga gnomAD.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kandidaatgeeni väljavalimine

Ühe kandidaatgeeni väljavalimiseks E2F geeniperekonnast toetuti avalikes andmebaasides saadaolevale informatsioonile.

Esmalt uuriti ExAC andmebaasist kõigi E2F perekonna geenide mutatsioonide taluvusvõimet. Andmebaasis ExAC on *Loss of Function* (LoF) ehk funktsioonikaoga mutatsioonide hulka loetud nonsensmutatsioonid, splaissaktseptorid ja -doonorid. LoF mutatsioonide taluvuse hindamiseks on kasutusele võetud pLI indeks, mille väärtused varieeruvad vahemikus 0-1. Skoor kujuneb vastavalt sellele, milline on oodatavate ühenukleotiidsete variantide arv ja vaadeldud ühenukleotiidsete variantide arv. Mida lähemal on pLI väärtusele 1, seda vähem antud geen LoF mutatsioone talub (Lek *et al.*, 2016). Kui vaadata ExAC andmebaasi andmeid, siis võib järeldada, et LoF mutatsioonide suhtes on küllaltki intolerantsed nii *E2F1*, *E2F2*, *E2F3* kui ka *E2F8*, kuna võrreldes oodatuga esines LoF mutatsioone praktikas kordades vähem (tabel 3). Lisaks LoF mutatsioonide talumisele vaadati kõigi E2F perekonna geenide puhul ka missenssmutatsioonide ehk mutatsioonide, kus nukleotiidimuutus DNA-järjestuses põhjustab polüpeptiidis ühe aminohappe asendumise teisega (Heinaru, 2012), taluvusvõimet. Selle

hindamiseks on ExAC andmebaasis kasutusel Z-skoor, mille väärtused võivad omada nii negatiivseid kui ka positiivseid väärtusi. Positiivsed Z-skoori väärtused näitavad, et geenil nähti praktikas vähem missenssmutatsioone kui oodati ning seetõttu on see geen nende mutatsioonide suhtes intolerantsem. Negatiivse Z-skooriga geenid taluvad ühenukleotiidseid varieeruvusi paremini (Lek *et al.*, 2016). Andmebaasi ExAC andmetele toetudes võib järeldada, et geenid *E2F1* ja *E2F3* on missenssmutatsioonide suhtes tundlikumad kui teised E2F perekonna geenid, kusjuures *E2F8* puhul nähti missenssmutatsioone rohkem kui oodati (tabel 3).

Tabel 3. E2F geeniperekonna geenide missenssmutatsioonide ning LoF mutatsioonide arvukuse, pLI väärtuste ja Z-skooride võrdlus ExAC andmebaasi andmetel.

| | <i>E2F1</i> | <i>E2F2</i> | <i>E2F3</i> | <i>E2F4</i> | <i>E2F5</i> | <i>E2F6</i> | <i>E2F7</i> | <i>E2F8</i> |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| pLI | 0,96 | 0,91 | 0,84 | 0,32 | 0,03 | 0,55 | 0,42 | 1 |
| Oodatud LoF-id | 9,5 | 12,0 | 14,6 | 12,5 | 9,4 | 10,7 | 26,9 | 28,7 |
| Nähtud LoF-id | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 2 | 6 | 3 |
| Z-skoor | 2,03 | 0,95 | 2,42 | 1,11 | 0,97 | 0,78 | 1,13 | -0,21 |
| Oodatud missenssmutatsioonid | 136,4 | 149,8 | 173,1 | 127,6 | 89,9 | 88,0 | 286,0 | 277,7 |
| Nähtud missenssmutatsioonid | 88 | 126 | 108 | 102 | 71 | 73 | 247 | 285 |

LoF (*Loss of Function*), funktsioonikadu; pLI, LoF-ide talumise indeks, mille väärtused varieeruvad vahemikus 0-1 (vastavalt talub ja ei talu LoF-e); missenssmutatsioon, nukleotiidimuutus DNA-s, mis põhjustab polüpeptiidis ühe aminohappe asendumise teisega (Heinaru, 2012); Z-skoor, missenssmutatsioonide taluvuse indeks, mille väärtused võivad omada nii negatiivseid kui ka positiivseid väärtusi. Positiivsed Z-skoori väärtused viitavad missenssmutatsioonide intolerantsusele, negatiivsed tolerantsusele.

Seejärel uuriti MGI andmebaasis olevat informatsiooni kõigi E2F geeniperekonna geenide *knockout* hiiremudelite kohta (tabel 4). Seal oleva informatsiooni alusel jäid valikusse kaks geeni *E2F7* ja *E2F8*, kuna MGI andmebaasis oleva info põhjal võis järeldada, et nende geenide välja lülitamisel esineb nii platsentades kui ka embrüotes muutusi (Bult *et al.*, 2019), mis on iseloomulikud ka KRK patsientide platsentadele ja embrüotele.

Andmebaasidest MGI ja ExAC kogutud andmetele toetudes jäi valikusse geen *E2F8*, kuna *knockout* hiiremudelites on täheldatud reproduktiivorganite fenotüübi muutusi ning geen ei talu LoF mutatsioone. Geeni *E2F8* välja valimist toetas fakt, et *E2f8* suudab hiiremudelites *E2f7* puudujääki kompenseerida, kuid vastupidist efekti ei esine (Qi *et al.*, 2015).

Kandidaatgeeni puhul tuli välja valida piirkonnad, mida sekveneerida. Selleks tutvuti kirjanduse ja andmebaasidega, et leida piirkonnad, milles varieeruvus võiks avaldada mõju geeni ekspressioonile/valgu funktsioonile. Valiti välja *E2F8* geeni DNA-ga seondumise domeeniks olev piirkond, mis asub antud geeni 4.-7. eksonis (DeGregori *et al.*, 2006).

Tabel 4. E2f geeniperekonna geenide *knockout* hiiremodelite reproduktiivsusega seotud muutused *Mouse Genome Informatics* andmebaasi (Bult *et al.*, 2019) järgi.

| Geen | Fenotüübi ülevaade hiire reproduktiivorganites |
|------------------|--|
| <i>E2f1</i> | Testikulaarne atroofia, ebanormaalne kollaskeha morfoloogia, munasarja hüpoplaasia, testise hüpoplaasia, naiste viljatus, meeste viljatus, Leydigi rakkude hüperplaasia, seemnetorukeste taandareng, testiste kaalu vähenemine, suurenenud reproduktiivsüsteemi kasvajate esinemissagedus, emakasisene verejooks |
| <i>E2f2</i> | - |
| <i>E2f3</i> | Testikulaarne atroofia, ebanormaalne kollaskeha morfoloogia, munasarja hüpoplaasia, testise hüpoplaasia, emaste viljatus, meeste viljatus |
| <i>E2f4</i> | Laienenud seminefroose torukesed, emaste ja isaste vähenenud viljakus. Aeglustunud embrüo kasv. |
| <i>E2f5</i> | Ebanormaalne testise morfoloogia viimajuhakeste piirkonnas, laienenud munandivõrk, ebanormaalne seemnetorukeste epiteeli morfoloogia, laienenud seemnetorukesed, ebanormaalne munandimanuse morfoloogia. Isaste viljatus. Vesipäine embrüo. |
| <i>E2f6</i> | Oligospermia, Leydigi rakkude hüperplaasia |
| <i>E2f7/E2f8</i> | Ebanormaalsused platsenta labürindi ja vitelliinkesta veresoonte morfoloogias, suurenenud embrüo koe rakkude apoptoos, suurenenud platsenta rakkude apoptoos, ebanormaalne embrüo areng, vähenenud embrüo suurus, väike platsenta, ebanormaalne trofoblasti morfoloogia, ebanormaalne platsenta areng. |

2.2.2 Korduva raseduse katkemise valim

Uuringu läbiviimiseks on väljastatud Tartu Ülikooli Kliinikumi inimuuringute eetikakomitee luba (nr. 117/9, 16.06.2003; 146/18, 27.02.2006; 150/33, 19.06.2006; 212/M-32, 09.03.2012). Kõigilt indiviididelt on saadud kirjalik informeeritud nõusolek uuringus osalemiseks. Valim on kogutud Tartu Ülikooli Kliinikumi Naistekliinikus doktor K. Rulli poolt. Patsientide grupi hulka arvati inividid, kellel on esinenud kolm või enam idiopaatilist raseduse katkemist (enne 22. rasedusnädalat või kui loote sünnikaal oli alla 500 g). Testid teadaolevate riskifaktorite suhtes – teatud hormonaalsed häired, vere hüübimise süsteemi funktsiooni häired, kromosomaalsed aberratsioonid, autoantikehade esinemine, anatoomilised tegurid, meespartnerite kromosoomide analüüs – olid kõigil patsientidel negatiivsed. Antud uuringu valimi moodustasid 48 korduva raseduse katkemisega paari, kokku 96 indiviidi (tabel 5).

Tabel 5. Käesolevas töös kasutatud valimi iseloomustus

| | Indiviidide arv | Vanus aastates* (mediaan, min-max) | Raseduse katkemiste arv (mediaan, min-max) | Elussündide arv (mediaan, min-max) |
|---------------|-----------------|------------------------------------|--|------------------------------------|
| Naispartnerid | 48 | 29 (19-37) | 4 (3-12) | 2 (0-5) |
| Meespartnerid | 48 | 29 (21-39) | | |

Min – miinimum, max – maksimum

* Vanus arvestati kolmanda raseduse katkemise hetkel

2.2.3 DNA eraldamine

Valim koosnes 96 indiviidist, kelle veeniveri oli varasemate projektide käigus kogutud Inimese geneetika uurimisgrupi biopanka.

DNA eraldamiseks EDTA-verest lisati ühe milliliitri vere kohta tuubi 4 ml puhvrit A (10,95% sahharoos, 1 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), mille lisamise järel tuubi komponentide segunemise tagamiseks õrnalt loksutati. Saadud segu tsentrifugeeriti 4°C ja 1942 RCF (*relative centrifugal force*) juures 30 minutit. Seejärel kallati ära supernatant ning vajadusel korrati sama tegevust. Uueks pesuetapiks lisati tuubi 2 ml puhvrit A. Sade loksutati põhjast üles ja seejärel tsentrifugeeriti antud reaktsioonituubi 20 min samadel tsentrifugeerimisparameetritel, mis esimeses etapis. Tsentrifugeerimise järel eemaldati supernatant, toimus nõrutusprotsess ning sademele lisati 0,9 ml puhvrit B (400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl). Sademe lahusesse saamiseks koputati tuubi. Tilkhaaval lisati juurde 100 µl puhvrit

C (10% SDS, 2 mg/ml proteinaas K) ning seejärel toimus loksutil 37°C juures üleöö inkubeerimine. Järgneval päeval lisati inkubeeritud proovile 270 µl NaCl küllastatud lahust. Tuubi raputati tugevalt 15 sek misjärel toimus 30 min pikkune tsentrifuugimine toatemperatuuril 3452 RCF juures. Supernatant pipeteeriti puhtasse tuubi ning sellele lisati kahekordne kogus 96% etanooli. Ainete segunemiseks keerati tuubi mõned korrad. Pasteuri pipetiga eemaldati tuubist DNA ning säilitamiseks pandi see 500 µl TE lahusesse. Genoomsete DNA-de kontsentratsiooni mõõdeti NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga ning nende terviklikkust kontrolliti 1% agarosgeelil [0,5x Tris/boorhape/EDTA (TBE)]. DNA-d säilitati -80°C juures.

2.2.4 PCR praimerite disain

Geeni *E2F8* eksonite 4-7 amplifitseerimiseks ning sekveneerimiseks disainiti praimerid veebilehel Primer3 (Untergasser *et al*, 2012). Praimerite disainimisel lähtuti inimese referentsgenoomi versioonist GRCh38/hg38. Praimerite sobivust ja seondumise spetsiifilisust kontrolliti veebilehtedel GenomeTester 1.3 (Andreson *et al*, 2006) ning PrimerBlast (Ye *et al*, 2012). PCR-i ning sekveneerimise jaoks välja valitud praimerite järjestused on esitatud tabelis 6. Samuti annab tabel 6 ülevaate amplifitseeritud PCR produktide pikkusest.

Tabel 6. PCR-i ja sekveneerimise praimerite iseloomustus

| Praimerite kombinatsioonid | Praimeri nimi | Praimeri järjestus 5'-3' suunas | Produkti pikkus (bp) |
|----------------------------|-----------------------------|---|----------------------|
| Praimeripaar I | E2F8_ex4_F E2F8_ex4_R | CCATGCCGGCTTATTTGTGT ATCGTGTTGGCAGAGATCCA | 867 |
| Praimeripaar II | E2F8_ex5_F E2F8_ex5_Seq2 | AATATTATCATGGCTTCTGGGGA AGCACAACTTAGGCCCTCAT | 1085 |
| Praimeripaar III | E2F8_ex7_F E2F8_ex7_R | CATGTGGGGCGGTGAGTA TGAGGTTTGTCAAGTTCACAGA | 1026 |
| Sekveneerimispraimer I | E2F8_ex4_Seq | TGCCGGCTTATTTGTGTCAT | |
| Sekveneerimispraimer II | E2F8_ex5_Seq | ATCATGGCTTCTGGGGAGAA | |
| Sekveneerimispraimer III | E2F8_ex5_Seq2 | AGCACAACTTAGGCCCTCAT | |
| Sekveneerimispraimer IV | E2F8_ex7_Seq | GGCGGTGAGTAGGAAGGG | |

Joonisel 5 on kujutatud geeni *E2F8* lihtsustatud skeemi, kus on näidatud valitud piirkondade (geeni *E2F8* eksonid 4-7) amplifitseerimiseks ning sekveneerimiseks kasutatud praimerite skemaatilist paiknemist.



Joonis 5. *E2F8* geeni lihtsustatud skeem. Joonisel on näidatud eksonite 3-8 paiknemine ning praimerite ligikaudsed seondumiskohad. Tumesinise joonega on tähistatud DNA-ga seondumise sait.

2.2.5 *E2F8* geeni valitud piirkondade amplifikatsioon inimese genoomist

PCR-i reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl sisaldas 2,5 µl 10x puhvrit B2 [Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄; detergent]; 2,5 µl 25 mM MgCl₂; 2,5 µl 2,5 mM dNTP segu; 1 µl 10 µM *forward* praimerit; 1 µl 10 µM *reverse* praimerit; 0,2 µl (5U/µl) HOT FirePol DNA polümeraasi; 100 ng genoomset DNA-d; 14,3-14,8 µl PCR *grade* H₂O-d. Vastavalt sellele, millist piirkonda amplifitseerida taheti, kasutati punktis 2.4.4 disainitud primereid.

Ekson 4 amplifitseerimiseks viidi süntees läbi 2720 Thermal Cycler ja GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA) masinatega järgmistel tingimustel:

| | | |
|-----------------------|-------------|--------------|
| Algne denaturatsioon | 95°C 15 min | } 35 tsüklit |
| Denaturatsioon | 95°C 45 s | |
| Praimerite seondumine | 58°C 30 s | |
| Ekstensioon | 72°C 1 min | |
| Inkubatsioon | 72°C 10 min | |
| Säilitamine | 4°C | |

Ekson 7 amplifitseerimiseks viidi süntees läbi Applied Biosystem masinatega järgmistel tingimustel:

| | | | |
|-----------------------|-------------|---|------------------------------|
| Algne denaturatsioon | 95°C 15 min | | |
| Denaturatsioon | 95°C 45 s | } | 10 tsükli, -1°C tsükli kohta |
| Praimerite seondumine | 64°C 30 s | | |
| Ekstensioon | 72°C 1 min | | |
| Denaturatsioon | 95°C 45 s | } | 25 tsükli |
| Praimerite seondumine | 54°C 30 s | | |
| Ekstensioon | 72°C 1 min | | |
| Inkubatsioon | 72°C 10 min | | |
| Säilitamine | 4°C | | |

Eksonit 5 ja 6 amplifitseerimiseks viidi süntees läbi Applied Biosystem masinatega järgmistel tingimustel:

| | | | |
|-----------------------|-------------|---|-----------|
| Algne denaturatsioon | 95°C 15 min | | |
| Denaturatsioon | 95°C 45 s | } | 35 tsükli |
| Praimerite seondumine | 59°C 30 s | | |
| Ekstensioon | 72°C 1 min | | |
| Inkubatsioon | 72°C 10 min | | |
| Säilitamine | 4°C | | |

PCR-i produktide olemasolu kontrolliti 1,5% agarosgeelil (0,5x TBE).

2.2.6 Sekveneerimine

PCR meetodil amplifitseeritud piirkondadest mutatsioonide tuvastamiseks proovid sekveneeriti. Sekveneerimised viidi läbi teenusena Tartu Ülikooli DNA genotüpiseerimise ja sekveneerimise tuumiklaboris, kus protsess toimub 96-kapillaariga (pikkus 50cm) Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer kapillaarsekvenaatoris (Applied Biosystems, USA). Sekveneerimisteenuse juurde kuulus ka PCR-i produktide sAP/Exo sekveneerimiseelne puhastamine kasutamata jäänud desoksüribonukleotiididest ja praimeritest.

2.2.7 Andmete analüüs

Sekveneeritud järjestuste kvaliteeti kontrolliti visuaalselt programmiga MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Iga sekveneeritud piirkonna järjestused koondati kontiigi Phred (Ewing *et al.*, 1998) tarkvara abil. Järjestused joondati programmiga Phrap (Ewing *et al.*, 1998), polümorfismid tuvastati PolyPhred versioon 6.02-ga (Nickerson *et al.*, 1997) ning eelnevalt koostatud kontiigi analüüsi kasutades Consed versiooni 19.0 (Gordon, 2003). Polyphred-i tuvastatud võimalikud heterosügootsed ja alternatiivse alleeli homosügootsed positsioonid kontrolliti üle ja kinnitati käsitsi.

Hardy-Weinbergi tasakaalu ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) kontrollimiseks kasutati internetileheküljel <https://wpcalc.com/en/> olevat Hardy-Weinbergi tasakaalu leidmise kalkulaatorit.

Tuvastamaks harvaesinevate introonsete varieeruvuste olulisust mRNA splaissimise seisukohast, kasutati bioinformaatilist tööriista *Human Splicing Finder*, mille abil saab uurida muutuste mõju olemasolevatele splaiss-saitidele ning ennustada mutatsiooni mõju splaissregioonide tekkimisele või kadumisele (Desmet *et al.*, 2009).

Selleks, et tuvastada, kas KRK valimis sekveneerimise teel leitud ühenukleotiidsete variantide alleelisagedused erinevad statistiliselt oluliselt andmebaasis gnomAD olevatest alleelisagedustest, kasutati Fisher Exact testi (Fisher, 1935). Test viidi läbi internetileheküljel www.socscistatistics.com.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Sekveneerimisel tuvastatud ühenukleotiidsed variandid

Uuritud *E2F8* geenis tuvastati Polyphred programmi poolt ning kinnitati käsitsi üle kaheksa varieeruvat positsiooni, mis on välja toodud tabelis 7. Kõik tuvastatud ühenukleotiidsed variandid asusid intronites, eksonites ei leitud ühtegi varieeruvust. Kaks varianti kõigist tuvastatud variantidest olid Hardy-Weinbergi tasakaalus.

Tabel 7. KRK valimis tuvastatud ühenukleotiidsede variantide iseloomustus

| Positsioon (hg19) | Rs number | Maž/Min | Maž hom (M/N) | Het (M/N) | Min hom (M/N) | MAF | H-W (P-väärtus) |
|----------------------------|-------------|---------|---------------|---------------|---------------|--------|-----------------|
| chr11:19253598 intron 7 | rs10741765 | A/G | 39 (22/17) | 40 (21/19) | 17 5/12 | 0,3854 | 1,3934 |
| chr11:19254068 intron 6 | rs72906006 | A/G | 94 (48/46) | 2 (0/2) | 0 | 0,0104 | 0,0106 |
| chr11:19256261 intron 5 | - | C/T | 95 (47/48) | 1 (1/0) | 0 | 0,0052 | 0,0026 |
| chr11:19258845 intron 4 | rs199864182 | T/C | 95 (48/47) | 1 (0/1) | 0 | 0,0052 | 0,0026 |
| chr11:19259115 intron 3 | rs11025067 | G/A | 59 (23/36) | 34 (22/12) | 3 (3/0) | 0,2083 | 0,5212 |
| chr11:19259130 intron 3 | rs76950800 | C/T | 92 (47/45) | 4 (1/3) | 0 | 0,0208 | 0,0435 |
| chr11:19259351 intron 3 | rs376159333 | C/T | 95 (48/47) | 1 (0/1) | 0 | 0,0052 | 0,0026 |
| chr11:19259352 intron 3 | rs12791460 | C/T | 93 (47/46) | 3 (1/2) | 0 | 0,0156 | 0,0242 |

KRK, korduv raseduse katkemine; maž, mažoorne alleel; min, minoorne alleel; hom, homosügoot; het, heterosügoot; M, mees; N, naine; MAF, minoorse alleeli sagedus, H-W, Hardy-Weinbergi tasakaal.

Järgnevalt võrreldi KRK valimis seitsme antud uuringus tuvastatud ja andmebaasides varasemalt kirjeldatud ühenukleotiidsed variandi minoorse alleeli esinemissagedusi avalikes andmebaasides leiduva informatsiooniga (tabel 8).

Tabel 8. KRK valimis tuvastatud variantide minoorse alleeli sageduste võrdlus andmebaasis gnomAD oleva informatsiooniga. Statistiliselt olulised tulemused on esile toodud rasvases kirjas.

| rs number | MAF (KRK valim) | gnomAD (eestlased) | Fisher Exact p-väärtus (KRK vs eestlased) | gnomAD (üldpop) | Fisher Exact p-väärtus (KRK vs üldpop) |
|-------------|-----------------|--------------------|---|-----------------|--|
| rs10741765 | 0,3854 | 0,3432 | 0,2450 | 0,2781 | 0,0016 |
| rs72906006 | 0,0104 | 0,0046 | 0,2392 | 0,0055 | 0,2899 |
| rs199864182 | 0,0052 | 0,0011 | 0,2182 | 0,0019 | 0,3150 |
| rs11025067 | 0,2083 | 0,1827 | 0,3915 | 0,1498 | 0,0325 |
| rs76950800 | 0,0208 | 0,0070 | 0,0546 | 0,0075 | 0,0593 |
| rs376159333 | 0,0052 | 0,0000 | - | 0,0002 | 0,0359 |
| rs12791460 | 0,0156 | 0,0160 | 1 | 0,0132 | 0,7437 |

KRK, korduv raseduse katkemine; gnomAD, *The Genome Aggregation Database*; MAF, minoorse alleeli sagedus; üldpop, üldpopulatsioon; Fisher Exact testi p-väärtus leitud usaldusnivoo 95% juures.

Sagedasi variante (alleelisagedus >0,01) esines KRK valimis kolm ning kõik nad asusid introonsetes regioonides, mille tõttu on mõju fenotüübile raske tõestada. Harvasid variante (alleelisagedus <0,01) leidis KRK valimis neli. KRK valimis tuvastati üks variant, mida varasemalt andmebaasides kirjeldatud polnud.

Positsioonis chr11:19254068 (rs72906006) leiti KRK valimist 2 heterosügootset indiviidi, kes mõlemad olid naised. KRK valimis esines minoorset alleeli ~1,9 korda rohkem kui gnomAD üldpopulatsioonis, kuid alleelisageduste erinevus Fisher Exact testi kohasel usaldusnivoo 95%

juures statistiliselt oluline ei ole (tabel 8). Andmebaasis gnomAD olevate eestlaste andmetega võrreldes esines KRK valimis minoorset alleeli ~2,3 korda rohkem, kuid tulemus pole statistiliselt oluline (tabel 8).

Positsiooni chr11:19258845 (rs199864182) puhul tuvastati KRK valimis T/C muutus, mis esines ühel naisel heterosügootses seisundis. Minoorse alleeli sagedus oli KRK valimis ~2,7 korda kõrgem kui gnomAD üldpopulatsioonis, kuid Fisher Exact testi tulemuste kohaselt pole alleelisageduste erinevus statistiliselt oluline (tabel 8). Andmebaasis gnomAD olevate eestlaste andmetega võrreldes esines KRK valimis minoorset alleeli ~4,8 korda rohkem, kuid ka see alleelisageduste erinevus pole statistiliselt oluline (tabel 8). Kuna varieeruvus asub 4. eksoni lähedal, vaadati *Human Splicing Finder* abil tema mõju splaissimisele. *Human Splicing Finder* andmetel T/C nukleotiidi muutus positsioonis chr11:19258845 splaissimisele mõju ei avalda (lisa 1).

Positsiooni chr11:19259130 (rs76950800) puhul leiti 4 heterosügootset indiviidi, kellest 3 olid naised ja 1 mees. Ühtegi sellist paari, kus nii mehel kui ka naisel oleks esinenud antud positsiooni suhtes heterosügootsus, ei leidunud. Samuti ei leitud ühtki minoorse alleeli homosügooti. KRK valimis esines minoorset alleeli ~2,8 korda rohkem kui gnomAD üldpopulatsioonis, kuid antud tulemus pole statistiliselt oluline (tabel 8). Andmebaasis gnomAD olevate eestlaste andmetega võrreldes esines KRK valimis minoorset alleeli ~3 korda rohkem, kuid ka see alleelisageduste erinevus pole statistiliselt oluline (tabel 8).

Positsioon chr11:19259351 (rs376159333) esines heterosügootses vormis ühel naisel. Võrreldes gnomAD andmetega oli KRK valimis minoorse alleeli sagedus ~32,6 korda kõrgem ning alleelisageduste erinevus on Fisher Exact testi kohaselt statistiliselt oluline (tabel 8). Andmebaasis gnomAD ühelgi eestlasel käsitletavat varieeruvust ei tuvastatud.

Nii rs11025067 kui ka rs376159333 asuvad transkriptsioonifaktor SMARCA4 seondumissaidis, mis vastutab BRG1 valgu sünteesimise eest. BRG1 osaleb kromatiini remodelleerimisel ja seeläbi geeniekspressiooni reguleerimisel. Kromatiini remodelleerimine BRG1 abil on ATP-st sõltuv. Kuna BRG1 osaleb geeniekspressiooni reguleerimisel, mängib ta rolli olulistest protsessides nagu näiteks rakkude kasvu, jagunemise ja diferentseerimise juures, mis on kõik olulised protsessid organismide sugurakkude arenemise ning paljunemise juures (Kim *et al.*, 2012).

Positsiooni chr11:19256261 C/T varasemalt andmebaasides ega kirjanduses kirjeldatud ei ole. Positsioonis chr11:19256261 esines minoorne alleel heterosügootses seisundis ühel mehel. Positsiooni chr11:19256261 C/T puhul tuvastati *Human Splicing Finder*iga mutatsiooni tõttu tekkiv introonne ESE-sait, kasutades ESE-Finder algoritmi (Cartegni *et al.*, 2003). Kuigi

muutuse tulemusena tekib uus *cis*-toimeline splaissingut reguleeriv element, siis *Human Splicing Finder* andmetele tuginedes see siiski splaissingule mõju ei avalda (lisa 2).

2.3.2 Arutelu

Käesoleva töö raames viidi läbi uuring tuvastamiseks varieeruvusi *E2F8* geenis Eesti korduva raseduse katkemise valimis. Töö keskendus *E2F8* DNA-ga seondumise domeeniks olevale piirkonnale, mis paikneb geeni 4.-7. eksonis. Antud piirkond on DeGregori *et al* 2006. aastal avaldatud artikli järgi vähevarieeruv, mistõttu on seal mutatsioonide esinemine taunitav. Töö tulemusena ei leitud KRK valimis ühtki DNA-ga seondumise domeenis olevat varieeruvust, mis kinnitab piirkonna konserveeritust. Kuigi käesolev uuring keskendus ainult geeni *E2F8* DNA-ga seondumise domeenis varieeruvuste tuvastamisele, siis edaspidi võiks sekveneerida kogu *E2F8* geeni, kuna ainult terviklik *E2F8* valk on täiesti funktsionaalne (Maiti *et al.*, 2005) ning seega võivad olulised olla ka mujal kui DNA-ga seondumise piirkonnas esinevad muutused, mis mõjutavad valgu funktsiooni või ekspressiooni. Samuti ei saa väita, et antud geeni DNA-ga seondumise domeenis suurema valimi korral muutusi ei leitaks, sest gnomAD andmebaasi valimis (15708 genoomi) leidis DNA-ga seondumise domeenis 7 LoF mutatsiooni. Võib oletada, et kui transkriptsioonifaktor *E2F8* DNA-ga seondumise piirkonnas toimuvad olulised muutused, siis ilmselt katkeb rasedus juba väga varajases faasis. Seetõttu ei esine populatsioonis suure tõenäosusega selliste muutustega indiviide eriti sagedasti.

KRK kontekstis on väga raske läbi viia geneetilisi assotsiatsiooniuuringuid, mille eesmärgiks on haiguste ja kandidaatgeenide vaheliste seoste tuvastamine. Klassikalised geneetikaga seotud assotsiatsiooniuuringud põhinevad analüüsidel, kus võrreldakse geneetiliste varieeruvuste sagedusi patsientide ja mittesuguluses olevate kontrollgrupi indiviidide vahel (Kruglyak, 1999). Sellest tulenevalt tuleks edaspidi *E2F8* geeni ja KRK assotsiatsiooniuuringut läbi viies kaasata ka kontrollgrupp, kellel KRK-d esinenud ei ole. Kuigi tänapäeval on võimalik suurtes avalikes andmebaasides, nagu näiteks gnomAD, oleva informatsiooni alusel võrdlusi läbi viia, siis konkreetse uuringu jaoks väga hoolikalt valitud kontrollgrupp kindlustab adekvaatsema tulemuse. Avalikes andmebaasides olevate inimeste reproduktiivajalugu pole teada ja ei saa välistada, et mõnel neist võib olla esinenud raseduse (korduvaid) katkemisi.

Kuigi väga erinevate monogeensete haiguste puhul on ülegenoomne sekveneerimismeetod aidanud avastada ligi 100 potentsiaalset kandidaatgeeni (Rabbani *et al.*, 2014), siis multifaktoriaalsete ja suure riskifaktorite hulgaga haiguste puhul on geenide identifitseerimine väljakutsuvam (Hyde ja Schust, 2015).

Ühe geeni defektide seost KRK-ga on palju uuritud. Läbi viidud uuringutes keskendutakse peamiselt skeletilihaste geenmutatsioonidele, implanteerumist reguleerivatele, immuunvastuse

tekitamises osalevatele, põletike tekkega seotud, vere koagulatsioonihärietega seotud, loote kudede formuleerimise ja ema metabolismiga seotud geenidele (Yang *et al.*, 2012; Asadpor *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Vatin *et al.*, 2014; Arias-Sosa *et al.*, 2018). 2017. aastal Pereza *et al.* poolt avaldatud süstemaatilises ülevaates käsitleti 428 juht-kontrolli uuringut, mis uurisid geneetilisi seoseid idiopaatilise KRK-ga. Neis uuringutes keskenduti naiste puhul 187 geeni 472 variandile, millest KRK-ga seotuks tunnistati 21 varianti, mis omasid rolli immuunvastuse tekke, vere koaguleerumise, ainevahetuse ja angiogeneesi eest vastutamisel (Pereza *et al.*, 2017). Kuigi seoseid konkreetse geeni ja KRK vahel leidub, siis tihti on uuringud vasturääkivad, puudub kontrollgrupp või raskendab seose kinnitamist erinevates uuringutes kasutatav KRK erinev defineerimine.

Uurimaks inimese haiguste geneetilisi põhjuseid nukleotiidsel tasemel, on kaasa aidanud tänapäevaste sekveneerimismeetodite kasutuselevõtt, mis annab võimaluse sekveneerida kogu eksoomi või genoomi küllalt lühikese ajaga ning odavamalt kui varasemad meetodid seda võimaldanuks (Koboldt *et al.*, 2013). Esimene eksoomi uuring, mis keskendus SNV-de mõju hindamisele KRK patogeneesis viidi läbi 2016. aastal Qiao *et al.* poolt kasutades uue generatsiooni sekveneerimist, kus nähti, et ühe bioloogilise raja geenide mutatsioonide kollektiivne mõju on seotud KRK-ga. Samas uuringus tuvastati, et geenides *DYNC2H1* (seotud loote suremisega) ja *ALOX15* (seotud platsenta ebanormaalsustega, angiogeneesi ja põletikega), esinevad KRK patsientidel mutatsioonid (Qiao *et al.*, 2016). Quintero-Ronderos *et al.* 2017. aastal läbi viidud kogu eksoomi uuringus tuvastati 27 mutatsiooni 22 raseduse kuluga seotud geenis, kuid ka nende geenide puhul tuleks otsest seost KRK-ga lähemalt uurita.

KRK kohta on kõige rohkem geneetilisi assotsiatsiooniuuringuid keskendunud hüpoteesipõhiste kandidaatgeeniuuringutele, mis on läbi viidud kasutades Sangeri sekveneerimist või sihtmärk SNV-de genotüpiseerimist (Kasak *et al.*, 2018a). Peaaegu 100 erineva geeni varieeruvuse uuringut on seoses KRK fenotüübiga läbi viidud, kuid nagu ka käesolevas *E2F8* geeni DNA-ga seondumise domeeni uuringus enamikel juhtudel seost KRK fenotüübi ja konkreetse geeni vahel tuvastada suudetud pole (Rull *et al.*, 2012). Siiani pole meditsiinipraktikas uuringutes tuvastatud KRK-ga seotud geenivariantidest diagnostilist ega prognostilist kasu, kuna võib oletada, et üksiku muutuse mõju suudetakse genoomi teiste lookuste poolt kompenseerida või siis ei ole veel ühtki KRK seisukohalt väga olulise mõjuga SNV-d tuvastatud (Kasak *et al.*, 2018b).

Käesolevas uuringus valiti kandidaatgeen välja andmebaasis ExAC olnud informatsiooni põhjal, mis näitas, et *E2F8* geenil on madal mutatsioonide talumisvõime ning hiirtes läbi viidud *knockout* hiiremudelite tööde tulemuste põhjal, kus *E2F8* puudumine viis nii platsenta kui ka

loote arengu häireteni (Li *et al.*, 2008; Ouseph *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2015). Kuigi hiirte puhul on tõestatud, et *E2F8* mängib rolli platsenta arengus, siis vastupidiselt hiire platsentas nähtule võib inimesel *E2F8* puudumine platsenta invasiivsust vähendada (Mizuno *et al.*, 2019). See näitab, et *E2F8* geeni funktsioon võib inimese ja hiire platsentas mängida erinevat rolli, mistõttu hiiremudelites läbi viidud katsete tulemusi ja leitud seoseid geenide ning fenotüüpide vahel ei saa üks-ühele üle kanda inimese fenotüüpidele.

Kuigi eksperimentaalse töö käigus ei tuvastatud SNV-sid eksonites, siis leiti 8 ühenukleotiidset varianti introonsetes regioonides, millest seitsme olemasolu on ka varasemalt detekteeritud ja mille kohta on võimalik andmebaasidest informatsiooni leida. Leiti ka üks 1 SNV, mida varem kirjeldatud ei ole. Tuvastatud SNV-dest olid neli harvaesinevad (alleelisagedus $<0,01$) - rs72906006 A/G, rs199864182 T/C, rs76950800 C/T ja rs376159333 C/T. Võrreldes gnomAD andmebaasis olevate eestlaste andmetega esines kirjeldatud SNV-de minoorset alleeli KRK populatsioonis kordades sagedamini. Kuid kuna võib oletada, et ka gnomAD andmebaasis olevatel indiviididel võib olla esinenud raseduse katkemisi ei saa andmebaasis olevaid andmeid käsitleda kui ideaalset kontrollgruppi. Ideaalne kontrollgrupp käesoleva uuringu kontekstis oleks vanuselt KRK patsientide sarnane, ilma ühegi raseduse katkemiseta ning oleks kogunud mitut elussünniga lõppenud rasedust. Käesolev uuring keskendus ≥ 3 raseduse katkemist kogunud naiste ning nende meespartnerite veeniverest eraldatud DNA-s mutatsioonide tuvastamisele, kuid ideaalne proovide komplekt hõlmaks ka nende indiviidide järglaste, nurisünnituse embrüote ja puhastatud koorionihattude materjali (Kasak *et al.*, 2018b).

Mizuno *et al.* 2019 uuring keskendus geeni *E2F8* rollile inimese platsentas ning tuvastas, et geen on seal ekspresseeritud nii hattude vahel olevas trofoblastis, detsiidua rakkudes kui ka tsütotrofoblastis. Samas nähti, et kui *E2F8* ekspressioon alla suruti, siis märgatavaid muutusi ei täheldatud rakutsüklis ega rakkude prolifererumises (Mizuno *et al.*, 2019), mistõttu võiks tulevikus lisaks *E2F8*-le viia läbi uuringuid ka teiste platsentas ekspresseeritud ja funktsionaalseid muutuseid tekitavate geenide varieeruvuste tuvastamiseks.

Kokkuvõte

Käesolevas uurimistöös anti ülevaade levinumatest teadaolevatest korduva raseduse katkemise (KRK) põhjustest, transkriptsiooni masinavärgist ja transkriptsioonifaktoritest, kusjuures suuremat rõhku pöörati E2F transkriptsioonifaktorite perekonnale. Töö eesmärgiks oli uurida seost E2F transkriptsioonifaktorite ja korduva raseduse katkemise vahel.

Eksperimentaalses osas uuriti KRK paaridelt kogutud DNA põhjal, kas E2F8 DNA-ga seondumise domeenis (DBD) (*E2F8* eksonid 4-7) esineb geneetilist varieeruvust. Tulemusi analüüsiti programmidega *Phred*, *Phrap*, *PolyPhred* ning *Consed*.

Töö tulemusena leiti, et antud valimis ei olnud ühelgi indiviidil DBD-s SNV-sid, mis kinnitab kirjanduses leiduvat fakti, et DBD on väga konserveerunud regioon (DeGregori *et al.*, 2006). Küll aga leiti 8 SNV-d, mis paiknesid valitud piirkondade amplifitseeritud osade introonsetes regioonides. 7 SNV-d olid varasemalt kirjeldatud, 1 SNV leidis käesolevas töös esmakordselt mainimist. Neli tuvastatud harvaesinevat (alleelisagedus <0,01) SNV-d, rs72906006 A/G, rs199864182 T/C, rs76950800 C/T ja rs376159333 C/T esinesid KRK populatsioonis kordades sagedamini võrreldes *The Genome Aggregation Database* andmebaasis olevate eestlaste andmetega.

Valimi väiksusest tulenevalt ei saa ümber lükata hüpoteesi, et geeni *E2F8* DBD-s võivad paikneda SNV-d mis võiksid olla seotud KRK-ga. Samas ei saa ka välistada, et antud geeni teistes eksonites võib leiduda SNV-sid, mis võivad KRK tekkes rolli mängida.

Edaspidi võiks seoses KRK fenotüübi uurimisega keskenduda ka teistele antud transkriptsioonifaktorite perekonna geenidele, näiteks geenile *E2F7*, kuna kirjanduse põhjal võib järeldada, et *E2F7* ja *E2F8* omavad küllaltki sarnaseid funktsioone.

Identification of genetic variation in *E2F8* gene in Estonian recurrent pregnancy loss samples

Marion Villemson

Summary

Recurrent pregnancy loss (RPL) is a multifactorial disease associated with anatomical, immunological as well as endocrinological abnormalities, infections, environmental factors, sperm quality, maternal and paternal age (Hyde and Schust, 2015). Although a number of causes related to RPL were mentioned above, up to 50% of cases remain idiopathic (Jeve and Davies, 2014), which makes the treatment of the disease difficult and therefore psychologically very exhausting for couples trying to conceive (Saravolos and Li, 2012; Arias-Sosa *et al.*, 2018).

Recently, a family of E2F transcription factors has emerged in connection with recurrent pregnancy loss. A study by Söber *et al* 2016 using RNA-seq analysis in recurrent pregnancy loss and control placental samples, found that most of the genes that were differently expressed in RPL samples compared to normal pregnancies were controlled by E2F transcription factors. In addition, another study by Kasak *et al* 2017, showed that compared to RPL placenta, structural variation in normal pregnancy placental samples involves genes, most of which have binding sites for E2F transcription factors, indicating their importance in successful pregnancy.

In the current study, an overview was given about the etiology of recurrent pregnancy loss (RPL), transcription factors in general, and the family of E2F transcription factors. The aim of the study was to investigate the relationship between E2F transcription factors and RPL. In the experimental part, a genetic variation screening was performed in the DNA binding domain of the transcription factor E2F8 in Estonian recurrent pregnancy loss samples.

As a result of the work, no variation was detected in the DNA binding domain of *E2F8* in the Estonian recurring pregnancy loss samples. However, 8 single nucleotide variants were discovered in the intronic regions, including one novel variant. Four of the SNVs were classified as rare variants (allele frequency <0,01), rs72906006 A/G, rs199864182 T/C, rs76950800 C/T and rs376159333 C/T, and were overrepresented in RPL samples compared to Estonian population samples in *the Genome Aggregation Database*.

Kasutatud kirjandus

- Agarwal, S., Agarwal, A., Khanna, A., Singh, K. (2015). Microdeletion of Y chromosome as a cause of recurrent pregnancy loss. *J. Hum. Reprod. Sci.* 8(3): 159-164.
- Allvee, K., Karro, H. (2017). Eesti Meditsiiniline Sünniregister 1992–2016. Eesti Abordiregister 1996–2016, 108.
- Andreson, R., Reppo, E., Kaplinski, L., Remm, M. (2006). GENOMEMASKER package for designing unique genomic PCR primers. *BMC Bioinformatics.* 7: 172.
- Ansari, A. H., Kirkpatrick, B. (1998). Recurrent pregnancy loss. An update. *J. Reprod. Med.* 43(9): 806-814.
- Arias-Sosa, L. A., Acosta, I. D., Lucena-Quevedo, E., Moreno-Ortiz, H., Esteban-Pérez, C., Forero-Castro, M. (2018). Genetic and epigenetic variations associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *J. Assist. Reprod. Gen.* 35(3): 355-366.
- Atasever, M., Soyman, Z., Demirel, E., Gencdal, S., Kelekci, S. (2016). Diminished ovarian reserve: is it a neglected cause in the assessment of recurrent miscarriage? A cohort study. *Fertil. Steril.* 105(5): 1236-1240.
- Asadpor, U., Totonchi, M., Sabbaghian, M., Hoseinifar, H., Akhound, M. R., Zari Moradi, Sh., Haratian, K., Sadighi Gilani, M. A., Gourabi, H., Mohseni Meybodi, A. (2013). Ubiquitin-specific protease (USP26) gene alterations associated with male infertility and recurrent pregnancy loss (RPL) in Iranian infertile patients. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30(7): 923-931.
- Bareh, G. M., Jacoby, E., Binkley, P., Chang, T. C., Schenken, R. S., Robinson, R. D. (2016). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Fertil. Steril.* 105(2): 329-336.e1.
- Bashiri, A., Harlev, A., Agarwal, A. 2016. *Recurrent Pregnancy Loss*: Springer.
- Bulger, M., Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell.* 144(3): 327-339.
- Bult, C. J., Blake, J. A., Smith, C. L., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Mouse Genome Database Group. (2019). Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic. Acids. Res.* 47(D1): D801-D806.
- Caessens, F., Gewirth, D. T. (2004). DNA recognition by nuclear receptors. *Essays. Biochem.* 40: 59-72.

- Carlini, T., Paoli, D., Pelloni, M., Faja, F., Dal Lago, A., Lombardo, F., Lenzi, A., Gandini, L. (2017). Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *Reprod. Biomed. Online*. 34(1): 58-65.
- Carrell, D., Wilcox, A. L., Lowy, L., Peterson, C.M., Jones, K.P., Erickson, L., Campbell, B., Branch, D.W., Hatasaka, H.H. (2003). Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet. Gynecol.* 101(6): 1229-1235.
- Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q., Krainer, A. R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic. Acids. Res.* 31(13): 3568-3571.
- Chan, Y. Y., Jayaprakasan, K., Zamora, J., Thornton, J. G., Raine-Fenning, N., Coomarasamy, A. (2011). The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected and high-risk populations: a systematic review. *Hum. Reprod. Update*. 17(6): 761-771.
- Chen, H-Z., Tsai, S-Yr., Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer*. 9(11): 785-797.
- Chen, H-Z., Ouseph, M. M., Li, J., ... Leone, G. (2012). Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat. Cell. Biol.* 14(11): 1192-1202.
- Chen, Z., Wang, Z., Pang, J. C., ... Yang, J. (2016). Multiple CDK inhibitor dinaciclib suppresses neuroblastoma growth via inhibiting CDK2 and CDK9 activity. *Sci. Rep.* 6: 29090.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A. P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., Helin, K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic. Acids. Res.* 33(17): 5458-5470.
- Christiansen, O. B., Mathiesen, O., Lauritsen, J. G., Grunnet, N. (1990). Idiopathic recurrent spontaneous abortion. Evidence of a familial predisposition. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 69(7-8): 597-601.
- DeGregori, J., Johnson, D. G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6(7), 739-748.
- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic. Acids. Res.* 37(9): e67.
- Di Simone, N., Castellani, R., Caliendo, D., Caruso, A. (2001). Monoclonal anti-annexin V antibody inhibits trophoblast gonadotropin secretion and induces syncytiotrophoblast apoptosis. *Biol. Reprod.* 65(6): 1766-1770.

- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 489(7414): 101-108.
- El Hachem, H., Crepaux, V., May-Panloup, P., Descamps, P., Legendre, G., Bouet, P. E. (2017). Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int. J. Womens. Health*. 9: 331-345.
- ESHRE Early Pregnancy Guideline Development Group. (2017). RECURRENT PREGNANCY LOSS. Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. European Society of Human Reproduction and Embryology.
- Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., Tress, M. L. (2014) Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes. *Hum. Mol. Genet*. 23(22): 5866-5878.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., Green, P. (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome. Res*. 8(3): 175-185.
- Fisher, R. A. (1935). The logic of inductive inference. *J. Royal. Stat. Soc* 98(1): 39-82.
- Ford, H. B., Schust, D. J. (2009). Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev. Obstet. Gynecol*. 2(2): 76-83.
- Franssen, M. T., Korevaar, J. C., van der Veen, F., Leschot, N. J., Bossuyt, P. M., Goddijn, M. (2006). Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. *BMJ*. 332(7544): 759-763.
- Giorlandino, C., Calugi, G., Iaconianni, L., Santoro, M. L., Lippa, A. (1998). Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil. Steril*. 70(3): 576-577.
- Gordon, D. 2003. Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter 11: Unit 11.2.
- Grande, M., Borrell, A., Garcia-Posada, R., Borobio, V., Munoz, M., Creus, M., Soler, A., Sanchez, A., Balasch, J. (2012). The effect of maternal age on chromosomal anomaly rate and spectrum in recurrent miscarriage. *Hum. Reprod*. 27(10): 3109-3117.
- Heinaru, A. 2012. Geneetika. Õpik kõrgkoolile. Tartu Ülikooli kirjastus.
- Hirahara, F., Andoh, N., Sawai, K., Hirabuki, T., Uemura, T., Minaguchi, H. (1998). Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. *Fertil. Steril*. 70(2): 246-252.

- Hooker, A. B., Lemmers, M., Thurkow, A. L., Heymans, M. W., Opmeer, B. C., Brolmann, H. A., Mol, B. W., Huirne, J.A. (2014). Systematic review and meta-analysis of intrauterine adhesions after miscarriage: prevalence, risk factors and long-term reproductive outcome. *Hum. Reprod. Update.* 20(2): 262-278.
- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., ... Cunningham, F. (2018). Ensembl variation resources. Database, Volume 2018, bay119.
- Hyde, K. J., Schust, D. J. (2015). Genetic Considerations in Recurrent Pregnancy Loss. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* 5(3): a023119.
- Ikuma, S., Sato, T., Sugiura-Ogasawara, M., Nagayoshi, M., Tanaka, A., Takeda, S. (2015). Preimplantation Genetic Diagnosis and Natural Conception: A Comparison of Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Translocation. *PLoS. One.* 10(6): e0129958.
- Jacobs, P. S., Hassold, T. 1987. Chromosomal abnormalities: origin and etiology in abortuses and live births. In: Vogel F, Sperlin K, editors. *Human genetics*. Berlin: Springer-Verlag; 233-244.
- Jaslow, C. R., Carney, J. L., Kutteh, W. H. (2010). Diagnostic factors identified in 1020 women with two vs. three or more recurrent pregnancy losses. *Fertil. Steril.* 93(4): 1234-1243.
- Jaslow, C. R., Kutteh, W. H. (2013). Effect of prior birth and miscarriage frequency on the prevalence of acquired and congenital uterine anomalies in women with recurrent miscarriage: a cross-sectional study. *Fertil. Steril.* 99(7): 1916-1922.e1.
- Jeve, Y. B., Davies, W. (2014). Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J. Hum. Reprod. Sci.* 7(3): 159-169.
- Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M., Wold, B. (2007). Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science.* 316(5830): 1497-1502.
- Karami, N., Boroujerdnia, M. G., Nikbakht, R., Khodadadi, A. (2012). Enhancement of peripheral blood CD56(dim) cell and NK cell cytotoxicity in women with recurrent spontaneous abortion or in vitro fertilization failure. *J. Reprod. Immunol.* 95(1-2): 87-92.
- Kasak, L., Rull, K., Söber, S., Laan, M. (2017). Copy number variation profile in the placental and parental genomes of recurrent pregnancy loss families. *Sci. Rep.* 7: 45327.
- Kasak, L., Rull, K., Laan, M. 2018a. Genetics and Genomics of Recurrent Pregnancy Loss. In: Peter Leung, Jie Qiao (Ed.). *Human Reproductive and Prenatal Genetics (1st Edition)* (463-494). Academic Press Inc Elsevier Science.10.1016/B978-0-12-813570-9.00021-8.

- Kasak, L., Rull, K., Laan, M. 2018b. Overview of Genetic Causes. In: Arora, Mala; Mukhopadhaya, Neelanjana (Ed.). *Recurrent Pregnancy Loss* (19-26). Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited.
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome. Res.* 12(6): 996-1006.
- Kim, Y., Fedoriw, A. M., Magnuson, T. (2012). An essential role for a mammalian SWI/SNF chromatin-remodeling complex during male meiosis. *Development.* 139(6): 1133-1140.
- Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., Mardis, E. R. (2013). The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell.* 155(1): 27-38.
- Kolte, A. M., Nielsen, H. S., Moltke, I., Degn, B., Pedersen, B., Sunde, L., Nielsen, F. C., Christiansen, O. B. (2011). A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage. *Mol. Hum. Reprod.* 17(6): 379-385.
- Koopman, L. A., Kopcow, H. D., Rybalov, B., ... Strominger, J. L. (2003). Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J. Exp. Med.* 198(8): 1201-1012.
- Kovesdi, I., Reichel, R., Nevins, J. R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell.* 45(2): 219-228.
- Krivega, I., Dean, A. (2012). Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22(2): 79-85.
- Kruglyak, L. (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat. Genet.* 22(2): 139-144.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7): 1870-1874.
- Kushnir, V. A., Scott, R. T., Frattarelli, J. L. (2010). The impact of paternal age on aneuploidy rates in first trimester pregnancy loss. *J. Med. Genet. Genomics.* 2(3): 38-43.
- Lammens, T., Li, J., Leone, G., De Veylder, L. (2009). Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends. Cell. Biol.* 19(3): 111-118.
- Lee, S. K., Na, B. J., Kim, J. Y., Hur, S. E., Lee, M., Gilman-Sachs, A., Kwak-Kim, J. (2013). Determination of clinical cellular immune markers in women with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* 70(5): 398-411.

- Lee, T. I., Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 152(6): 1237-1251.
- Lek, M., K, K. J., M, E. V. ... MacArthur, D. G. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Science*. 536(7616): 285-291.
- Lelli, K. M., Slattery, M., Mann, R. S. (2012). Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation. *Annu. Rev. Genet.* 46: 43-68.
- Lenhard, B., Sandelin, A., Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 13(4): 233-245.
- Li, J., Ran, C., Li, E., ... de Bruin, A. (2008). Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development. *Dev. Cell*. 14(1): 62-75.
- Li, W., Ma, N., Laird, S. M., Ledger, W. L., Li, T. C. (2013). The relationship between serum prolactin concentration and pregnancy outcome in women with unexplained recurrent miscarriage. *J. Obstet. Gynaecol.* 33(3): 285-288.
- Lim, W. (2013). Antiphospholipid syndrome. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2013: 675-680.
- Liu, H., Shan, Z., Li, C., ... Teng, W. (2014). Maternal subclinical hypothyroidism, thyroid autoimmunity, and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Thyroid*. 24(11): 1642-1649.
- Lv, Y., Xiao, J., Liu, J., Xing, F. (2017). E2F8 is a Potential Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer*. 8(7): 1205-1213.
- Macklon, N. S., Geraedets, J. P. M., Frauser, B. C. J. M. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum. Reprod. Update*. 8(4): 333-343.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W., Leone, G. (2005). Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* 280(18): 18211-18220.
- Mantzouratou, A., Mania, A., Fragouli, E., ... Delhanty, J. D. (2007). Variable aneuploidy mechanism in embryos from couples with poor reproductive histories undergoing preimplantation genetic screening. *Hum. Reprod.* 22(7): 1844-1853.
- Marquard, K., Westphal, L. M., Milki, A. A., Lathi, R. B. (2010). Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35. *Fertil. Steril.* 94(4): 1473-1477.

- Maston, G. A., Evans, S. K., Green, M. R. (2006). Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.* 7: 29-59.
- McFadyen, I. R. 1989. Early fetal loss. In: Rodek C, editor. *Fetal medicine*. Oxford (United Kingdom): Blackwell Scientific; 1989. p. 26–43.
- Mizuno, M., Miki, R., Moriyama, Y., ... Kotani, T. (2019). The role of E2F8 in the human placenta. *Mol. Med. Rep.* 19(1): 293-301.
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2(9): 656-663.
- Morgunova, E., Yin, Y., Jolma, A., Dave, K., Schmierer, B., Popov, A., Eremina, N., Nilsson, L., Taipale, J. (2015). Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nat. Commun.* 6: 10050.
- Neph, S., Stergachis, A. B., Reynolds, A., Sandstrom, R., Borenstein, E., Stamatoyannopoulos, J. A. (2012). Circuitry and dynamics of human transcription factor regulatory networks. *Cell.* 150(6): 1274-1286.
- Nickerson, D. A., Tobe, V. O., Taylor, S. L. (1997). PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic. Acids. Res.* 25(14): 2745-2751.
- Nybo Andersen, A. M., Wohlfahrt, J., Christens, P., Olsen, J., Melbye, M. (2000). Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.* 320(7251): 1708-1712.
- Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S., Suzumori, K. (2000). Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil. Steril.* 73(2): 300-304.
- Ouseph, M. M., Li, J., Chen, H. Z., ... Leone, G. (2012). Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. *Dev. Cell.* 22(4): 849-862.
- Pabo, C. O., Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and Principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095.
- Pereza, N., Ostojic, S., Kapovic, M., Peterlin, B. (2017). Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil. Steril.* 107(1): 150-159 e2.
- Petrykowska, H. M., Vockley, C. M., Elnitski, L. (2008). Detection and characterization of silencers and enhancer-blockers in the greater CFTR locus. *Genome. Res.* 18(8): 1238-1246.
- Plaisier, C. L., O'Brien, S., Bernard, B., Reynolds, S., Simon, Z., Toledo, C. M., Ding, Y., Reiss, D. J., Paddison, P. J., Baliga, N. S. (2016). Causal Mechanistic Regulatory Network for

- Glioblastoma Deciphered Using Systems Genetics Network Analysis. *Cell. Syst.* 3(2): 172-186.
- Popescu, F., Jaslow, C. R., Kutteh, W. H. (2018). Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. *Hum. Reprod.* 33(4): 579-587.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM). (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 89(6): 1603.
- Practice Committee Opinion of the American Society of Reproductive Medicine (ASRM). (2012). Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 98(5): 1103–1111.
- Prummel, M. F., Wiersinga, W. M. (2004). Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Eur. J. Endocrinol.* 150(6): 751-755.
- Ptashne, M., Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature.* 386(6625): 569-577.
- Qi, Q. R., Zhao, X.Y., Zuo, R. J., Wang, T. S., Gu, X. W., Liu, J. L., Yang, Z. M. (2015). Involvement of atypical transcription factor E2F8 in the polyploidization during mouse and human decidualization. *Cell. Cycle.* 14(12): 1842-1858.
- Qiao, Y., Wen, J., Tang, F., Martell, S., Shomer, N., Leung, P. C., Stephenson, M. D., Rajcan-Separovic, E. (2016). Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss. *Mol. Hum. Reprod.* 22(5): 364-372.
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., González, R., Suárez, C. F., Patarroyo, M. A., Vaiman, D., Gris, J. C., Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PloS. One.* 12(10): e0186149.
- Rabbani, B., Tekin, M., Mahdieh, N. (2014). The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J. Hum. Genet.* 59(1): 5-15.
- Rai, R. S., Clifford, K., Cohen, H., Regan, L. (1995). High prospective fetal loss rate in untreated pregnancies of women with recurrent miscarriage and antiphospholipid antibodies. *Hum. Reprod.* 10(12): 3301-3304.
- Regan, L., Braude, P. R, Trembath, P. L. (1989). Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ.* 299(6698): 541-455.

- Regan, L., Backos, M., Rai, R. (2011). Green-top Guideline No 17. The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG), London.
- Reichel, R., Kovessi, I., Nevins, J. R. (1987). Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product. *Cell*. 48(3): 501-506.
- Robinson, W. P., Bernasconi, F., Lau, A., McFadden, D. E. (1999). Frequency of meiotic trisomy depends on involved chromosome and mode of ascertainment. *Am. J. Med. Genet.* 84(1): 34-42.
- Rubio, C., Simón, C., Vidal, F., Rodrigo, L., Pehlivan, T., Remohí, J., Pellicer, A. (2003). Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum. Reprod.* 18(1): 182-188.
- Ruixue, W., Hongli, Z., Zhihong, Z., Rulin, D., Dongfeng, G., Ruizhi, L. (2013). The impact of semen quality, occupational exposure to environmental factors and lifestyle on recurrent pregnancy loss. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30(11): 1513-1518.
- Rull, K., Nagirnaja, L., Laan, M. (2012). Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. *Front. Genet.* 3: 34.
- Saravelos, S. H., Cocksedge, K. A., Li, T. C. (2008). Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. *Hum. Reprod. Update.* 14(5): 415-429.
- Saravelos, S. H., Li, T. C. (2012). Unexplained recurrent miscarriage: how can we explain it? *Hum. Reprod.* 27(7): 1882-1886.
- Sauer, M. V. (2015). Reproduction at an advanced maternal age and maternal health. *Fertil. Steril.* 103(5): 1136-1143.
- Shahine, L., Lathi, R. (2015). Recurrent pregnancy loss: evaluation and treatment. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 42(1): 117-134.
- Sharma, R., Agarwal, A., Rohra, V. K., Assidi, M., Abu-Elmagd, M., Turki, R. F. (2015). Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13: 35.
- Sharma, S. (2014). Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. *Int. J. Dev. Biol.* 58(2-4): 219-229.
- Shi, X., Xie, X., Jia, Y., Li, S. (2017). Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Genet.* 91(2): 265-284.

- Silver, R. M., Branch, D. 2007. Sporadic and Recurrent Pregnancy Loss. In *Clinical obstetrics: The fetus & mother*, 3rd ed. (ed. Reece EA, Hobbins JC), pp. 143–160. Blackwell Publishing, Boston.
- Spitz, F., Furlong, E. E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13(9): 613-626.
- Stephenson, M. D., Sierra, S. (2006). Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum. Reprod.* 21(4): 1076-1082.
- Stirrat, G. M. (1990). Recurrent miscarriage. *Lancet.* 336(8716): 673-675.
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Suzumori, N. (2014). Management of recurrent miscarriage. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40(5): 1174-1179.
- Sullivan, A. E., Silver, R. M., LaCoursiere, D. Y., Porter, T. F., Branch, D. W. (2004). Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet. Gynecol.* 104(4): 784-788.
- Söber, S., Rull K., Reiman, M., Ilisson, P., Mattila, P., Laan, M. (2016). RNA sequencing of chorionic villi from recurrent pregnancy loss patients reveals impaired function of basic nuclear and cellular machinery. *Sci. Rep.* 6: 38439.
- Zhan, L., Huang, C., Meng, X. M., Song, Y., Wu, X. Q., Miu, C. G., Zhan, X. S., Li, J. (2014). Promising roles of mammalian E2Fs in hepatocellular carcinoma. *Cell. Signal.* 26(5): 1075-1081.
- Zidi-Jrah, I., Hajlaoui, A., Mougou-Zerelli, S., ... Ibala-Romdhane, S. (2016). Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 105(1): 58-64.
- Thangaratnam, S., Tan, A., Knox, E., Kilby, M. D., Franklyn, J., Coomarasamy, A. (2011). Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ.* 342: d2616.
- Thurlings, I., de Bruin, A. (2016). E2F Transcription Factors Control the Roller Coaster Ride of Cell Cycle Gene Expression. *Methods. Mol. Biol.* 1342: 71-88.
- Ticconi, C., Giuliani, E., Veglia, M., Pietropolli, A., Piccione, E., Di Simone, N. (2011). Thyroid autoimmunity and recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.* 66(6): 452-459.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M. ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 347(6220): 1260419.

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. (2012). Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic. Acids. Res.* 40(15): e115.
- Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., Luscombe, N. M. (2009). A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat. Rev. Genet.* 10(4): 252-263.
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., ... Gris, J. C. (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *Am. J. Pathol.* 184(2): 362-368.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., ... Zhu, X. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science.* 291(5507): 1304-1351.
- Wang, Z., Wang, P., Wang, X., He, X., Wang, Z., Xu, D., Hu, J., Wang, B. (2013). Significant association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and risk of recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 62(9): 1227-1238.
- Warburton, D., Dallaire, L., Thangavelu, M., Ross, L., Levin, B., Kline, J. (2004). Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am. J. Hum. Genet.* 75(3): 376-385.
- Webster, A., Schuh, M. (2017). Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends. Cell. Biol.* 27(1): 55-68.
- Wilson, W. A., Gharavi, A. E., Piette, J. C. (2001). International classification criteria for antiphospholipid syndrome: synopsis of a post-conference workshop held at the Ninth International (Tours) aPL Symposium. *Lupus.* 10(7): 457-460.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., ... Leone, G. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature.* 414(6862): 457-462.
- Yang, C., Fangfang, W., Jie, L., Yanlong, Y., Jie, W., Xuefei, L., Xuerong, Z., Yanling, H. (2012). Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29(11): 1167-1173.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC. Bioinformatics.* 13: 134.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.informatics.jax.org/allele/> (24.04.2019)

<http://www.ensembl.org/index.html> (06.05.2019)

<https://genome.ucsc.edu> (24.04.2019)

<https://www.proteinatlas.org> (06.05.2019)

<http://gnomad.broadinstitute.org> (06.05.2019)

www.socscistatistics.com (06.05.2019)

<http://www.umd.be/HSF/> (07.05.2019)

<http://tfbsdb.systemsbio.net> (08.05.2019)

<http://exac.broadinstitute.org> (13.05.2019)

<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/?fbclid=IwAR1z943a4xcvAUMvXf71-yp-26DIciCuadO4WatxC43hgSo4Rzfl9K0MhbQ> (19.05.2019)

Lisad

Lisa 1. *Human Splicing Finder*-i andmed positsiooni chr11:19258845 T/C (rs199864182) kohta

Reference sequence

E2F8 Gene > ENST00000250024 Transcript > Exon number: 4 (157 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

```
1 agcgtgtgta agttggtgtc agtcatcgag cacagatgcc cctaataaat ctgtcagact ttattttaga ataagacatt gtttaccttt tcctttgtag
101 GAACACTTAT CTGGAGATGA ATTTGAGAAA TCCCAACCAA GTCGAAAAGA GAAAAGTTTA GGATTATTGT GTCATAAGTT CTTAGCACGA TATCCTAATT
201 ATCCCAACCC TGCTGTGAAT AATGACATCT GCCTTGACGA AGTGGCAGAG GAACTTAgta agtatgcaaa gaactcactg aaagaattaa taattaaagt
301 ggctttatgg acttaactcc ttcagacccc cgctcateta gccagtgttt gtaaatg
```

Total sequence length: 357 nucleotides

Mutant sequence

```
1 agcgtgtgta agttggtgtc agtcatcgag cacagatgcc cctaataaat ctgtcagact ttattttaga ataagacatt gtttaccttt tcctttgtag
101 GAACACTTAT CTGGAGATGA ATTTGAGAAA TCCCAACCAA GTCGAAAAGA GAAAAGTTTA GGATTATTGT GTCATAAGTT CTTAGCACGA TATCCTAATT
201 ATCCCAACCC TGCTGTGAAT AATGACATCT GCCTTGACGA AGTGGCAGAG GAACTTAgta agtatgcaaa gaactcactg aaagaattaa taattaaagt
301 ggctttatgg acttaactcc ttcagacccc cgctcateta gccagtgttt gtaaatg
```

Total sequence length: 357 nucleotides

The underlined sequences are analyzed by HSF.

Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context.

The mutation occurs in the deep intronic positions, the following table show results of splicing and auxiliary sites that could be created by the mutation

No significant splicing motif alteration detected.
This mutation has probably no impact on splicing.

Lisa 2. Human Splicing Finder-i andmed positsiooni chr11:19256261 C/T kohta

Reference sequence

E2F8 Gene > ENST00000250024 Transcript > Exon number: 5 (315 bp) + 100 intronic nucleotides at exon ends

```

1 tatccaagac ctactgacta ataaaccaat ggaagaaaaa gctattcaat tctaacacag ttacaaaaat ctgtaacaca caattgcaca ttctttgtag
101 ATGTTGAACG TCGACGCATT TACGATATCG TGAACGTCCT AGAGAGTTTA CATATGGTGA GCCGCCTCGC CAAAAACAGG TACACTTGGC ACGGGCGACA
201 CAATCTCAAC AAAACCCCTG GCACCTTGAA GAGCATCGGG GAGGAGAATA AGTACGCCGA GCAGATTATG ATGATCAAAA AGAAAGAATA TGAGCAAGAG
301 TTTGACTTTA TTAAGAGTTA CAGTATAGAG GATCATATCA TCAAATCAAA CACTGGCCCA AATGGACACC CAGACATGTG TTTTGTGGAA CTCCCTGGAG
401 TGGAAATTCG GGCAGgtgag agatggtagt gaaaactcca ggcgcatgg catttgctct ctgtetaagg aaaaggttct gtggagaaca cagctctaaa
501 gctactgctg ccttt
  
```

Total sequence length: 515 nucleotides

Mutant sequence

```

1 tatccaagac ctactgacta ataaaccaat ggaagaaaaa gctattcaat tctaacacag ttacaaaaat ctgtaacaca caattgcaca ttctttgtag
101 ATGTTGAACG TCGACGCATT TACGATATCG TGAACGTCCT AGAGAGTTTA CATATGGTGA GCCGCCTCGC CAAAAACAGG TACACTTGGC ACGGGCGACA
201 CAATCTCAAC AAAACCCCTG GCACCTTGAA GAGCATCGGG GAGGAGAATA AGTACGCCGA GCAGATTATG ATGATCAAAA AGAAAGAATA TGAGCAAGAG
301 TTTGACTTTA TTAAGAGTTA CAGTATAGAG GATCATATCA TCAAATCAAA CACTGGCCCA AATGGACACC CAGACATGTG TTTTGTGGAA CTCCCTGGAG
401 TGGAAATTCG GGCAGgtgag agatggtagt gaaaactcca ggcgacatgg catttgctct ctgtetaagg aaaaggttct gtggagaaca cagctctaaa
501 gctactgctg ccttt
  
```

Total sequence length: 515 nucleotides

The underlined sequences are analyzed by HSF.

Interpreted Data

This table shows only relevant results related to the mutation position and context.

The mutation occurs in the deep intronic positions, the following table show results of splicing and auxiliary sites that could be created by the mutation

| Predicted signal | Prediction algorithm | cDNA Position | Interpretation |
|------------------|----------------------------|---------------|--|
| New ESE Site | 1 - ESE-Finder - SRp40 | | Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing. |
| | 2 - EIEs from Zhang et al. | | |

Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marion Villemson,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „*E2F8* geeni varieeruvuse määramine Eesti korduva raseduse katkemise valimis“, mille juhendajad on PhD Laura Kasak ja prof. Maris Laan, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Marion Villemson

23.05.2019