

TARTU ÜLIKOOL □

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Riho Rokk

**Psoriaasi assotsiatsiooniuring eksoomikiibi andmete põhjal**

Bakalaureusetöö

Juhendajad: Evelin Mihailov, M.Sc. □

Tiit Nikopensius, Ph.D.

TARTU 2014

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Psoriaasi epidemioloogia.....	6
1.2 Psoriaasi etioloogia.....	7
1.3 Psoriaasi alatüübid.....	7
1.4 Psoriaasi ravivõimalused .....	10
1.5 Psoriaasi geneetilised uuringud .....	10
1.5.1 Psoriaasi päritavus .....	11
1.5.2 Aheldusuuringud .....	11
1.5.3 Assotsiatsiooniuringud .....	14
1.5.4 Ülegenoomsed assotsiatsiooniuringud .....	15
1.5.5 Geen-geen interaktsioonid.....	18
1.5.6 Geen-keskkond interaktsioonid .....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	20
2.1 Töö eesmärk .....	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Valim .....	20
2.2.2 Fenotüüp .....	20
2.2.3 Genotüpiseerimine.....	21
2.2.4 Kvaliteedikontroll.....	21
2.2.5 Assotsiatsioonianalüüs .....	22
2.2.6 Tulemuste analüüsijärgne kvaliteedikontroll.....	22
2.3 Tulemused .....	23
2.4 Arutelu .....	27
KOKKUVÕTE .....	31
Summary.....	32
TÄNUAVALDUSED.....	33
KASUTATUD KIRJANDUS .....	34
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	45
LIHTLITSENTS.....	46

## LÜHENDID

BBS9	<i>Bardet-Biedl Syndrome 9</i>
CASP	<i>The Collaborative Association Study of Psoriasis</i>
CDSN	<i>Corneodesmosin, korneodesmosiin</i>
CI95	<i>95% confidence interval, 95% usaldusintervall</i>
CR	<i>Call rate, edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal</i>
EAF	<i>Effective allele frequency, efektalleeli sagedus</i>
ERAP1	<i>Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1, endoplasmaatilise retiikulumi aminopeptidaas 1</i>
FKBPL	<i>FK506 binding protein like</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study, ülegenoomne assotsiatsiooniuring</i>
HBE1	<i>Hemoglobin, epsilon 1</i>
HBG2	<i>Hemoglobin, gamma G</i>
HCR	<i>Alpha-helix coiled-coil-rod homolog gene</i>
HJURP	<i>Holliday junction recognition protein</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen, inimese leukotsüütide antigeenid</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium, Hardy-Weinbergi tasakaal</i>
IBD	<i>Identical by descent, ühiselt eellaselt päritud alleelide osakaal genoomis</i>
IFN- $\alpha$	<i>Interferon alpha, interferoon alfa</i>
IL-2	<i>Interleukin 2, interleukiin 2</i>
IL20RA	<i>Interleukin 20 receptor alpha, interleukiin 20 retseptor alfa</i>
IL20RB	<i>Interleukin 20 receptor beta, interleukiin 20 retseptor beeta</i>
KRT82	<i>Keratin 82</i>
LD	<i>Linkage disequilibrium, ahelduse tasakaalustamatus</i>
LGR6	<i>Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 6</i>
MAC	<i>Minor allele count, minoorse alleeli üldarv</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex, peamine koesobivuskompleks</i>
NAT9	<i>N-Acetyltransferase 9, N-atsetüültransferaas 9</i>
OR2G2	<i>Olfactory receptor, family 2, subfamily G, member 2</i>
OR51B5	<i>Olfactory receptor, family 51, subfamily B, member 5</i>
OR51Q1	<i>Olfactory receptor, family 51, subfamily Q, member 1</i>
PTTR1	<i>Proline-rich transmembrane protein 1</i>
PSORS	<i>Psoriasis susceptibility locus, psoriaasi vastuvõtlikkuse lookus</i>
SE	<i>Standard error, standardviga</i>

SLC9A3R1	<i>Solute-carrier family 9 isoform 3 regulator 1</i>
SPR1	<i>Small proline rich 1 gene</i>
TCF19	<i>Transcription factor 19, transkriptsioonifaktor 19</i>
Th1	<i>T helper cell 1, T-abistajarakk 1</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha, kasvaja nekroosi faktor alfa</i>
UGT2A1	<i>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1, complex locus</i>
ZKSCAN3	<i>Zinc finger with KRAB and SCAN domain</i>

## SISSEJUHATUS

Psoriaas on krooniline immuun-vahendatud põletikuline nahahaigus. Selle etioloogia pole seni täpselt teada, kuid tekkemehhanismis on oluline T-rakkude aktiveerumine ja tsütokiinide põhjustatud epidermise rakkude liigne jagunemine. Psoriaasile on iseloomulikud erineva suurusega, kindlalt piirdunud ja paksu ketuga kaetud naastud. Haigus varieerub mõnest punasest soomuselisest alast nahal kuni terve keha pinna katmiseni. Kirjanduse põhjal on psoriaasahaigeid inimesi 2-4% maailma populatsioonist ning mehed ja naised haigestuvad võrdse sagedusega. Eestis põeb psoriaasi ligikaudu 42 000 inimest. Haigus võib esmakordselt avalduda igas vanuses, kuid kõige sagedamini haigestutakse 15-25 ja 57-60 eluaasta vanuselt.

Järjest enam on saadud tõendeid selle kohta, et psoriaasi haigestumisel on selge pärilik soodumus. Psoriaas klassifitseeritakse multifaktoriaalsete haiguste alla, mille puhul on haigusfenotüübi tekkeks olulised nii geneetiline eelsoodumus kui keskkonnafaktorid. Kandidaatgeenide uuringud on tuvastanud erinevaid haiguse vastuvõtlikkust tõstvaid genee, näiteks *CDSN* (*corneodesmosin*) ja *NAT9* (*N-Acetyltransferase 9*). Ülegenoomsed assotsiatsiooniuringud on näidanud tugevaid seoseid psoriaasi ning peamise koosobivuskompleksi ja selle ümbruse vahel. Mõlema uuringutüübiga läbiviidud tööde tulemused viitavad selgele seosele haiguse ning kromosoomis 6 asuva HLA (*human leukocyte antigen*) lookuse vahel. Avastatud psoriaasi vastuvõtlikkust suurendavad lookused ei anna kogu informatsiooni haiguse pärandumise kohta. Oma roll on geen-geen ja geen-keskkond interaktsioonidel, mida tuleb veel uurida, selgitamaks kogu pärilikkust.

Käesoleva töö eesmärgiks on identifitseerida psoriaasi seoseid uute geneetiliste markeritega. Antud uurimus põhineb Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu poolt kogutud geenidoonoritel, kelle hulka kuulusid psoriaasi diagnoosiga ja terved inividid.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Psoriaasi epidemioloogia

Psoriaasi põdevaid inimesi on lääneriikides hinnanguliselt 2-4% (Stern *et al.*, 2004; Gelfand *et al.*, 2005b; Kurd ja Gelfand, 2009). Eestis on haigeid umbes 42 000, mis moodustab elanikkonnast 3.5-4% (Eesti Psoriaasiliit)<sup>1</sup>. Haigestumust psoriaasi mõjutavad vanus, sugu, geograafiline asukoht ja rass, tõenäoliselt geneetiliste- ja keskkonnafaktorite koostoime tõttu (Parisi *et al.*, 2013).

Haigus võib avalduda igas vanuses ja jääb tavaliselt püsima kogu eluks (Coimbra *et al.*, 2012). Keskmise haigestumise iga *psoriasis vulgaris*esse on 33 ja 75% patsientidest kujuneb psoriaas välja enne 46-ndat eluaastat (Nevitt ja Hutchinson, 1996). Lisaks märgitakse, et haigestumise vanus on bimodaalse jaotusega, sagedamate avaldumisperiodidega 16-22 eluaasta ja 57-60 eluaasta vahel (Henseler ja Christophers, 1985). Varases täiskasvanueas avalduv psoriaas on sagedamini perekondlik (põhjustatud geneetilisest transmissioonist), kui hilise avaldumisega psoriaas (Lebwohl, 2003).

Soolise kuuluvuse mõju kohta haiguse kujunemisel on teadlased erineval arvamusel. Statistilist erinevust ei leitud Ameerika Ühendriikide, Suurbritannia, Norra, Hispaania, Šotimaa ja Taiwani uurimisgruppide hulgas (Braathen *et al.*, 1989; Ferrandiz *et al.*, 2001; Javitz *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2002; Gelfand *et al.*, 2005b; Chang *et al.*, 2009; Seminara *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2011). Samas on uuringuid, mis näitavad, et naiste haigestumine on meestega võrreldes tõenäolisem. Näiteks viidi Norras läbi töö, kus leiti psoriaasi prevalentsiks naistel 1.4% ja meestel 0.9% (Falk ja Vandbakk, 1993). Vastupidiselt eelmainitud uuringule on ka leitud, et naiste haigestumise osakaal on väiksem kui meestel - sellisele tulemusele jõudis Taanis tehtud uurimus, kus vastav protsent oli naistel 3.3% ja meestel 4.2% (Brandrup ja Green, 1981).

Kõrgemat haigestumise riski on täheldatud suurematel laiuskraadidel elavatel ja euroopa päritolu indiviididel (Farber ja Nall, 1998). Psoriaasi esinemissagedus Põhja-Euroopa ja Skandinaavia populatsioonide seas on 1.5-3%. Olles üpris tavaline jaapanlaste seas, esineb seda haigust vähem hiinlaste, eskimote, lääne-aafriklaste ja Põhja-Ameerika mustanahaliste hulgas. Väga ebatõenäolised on haigusjuhud Põhja- ja Lõuna-Ameerika põliselanike ning Austraalia aborigeenide seas (Langley *et al.*, 2005).

---

<sup>1</sup> <http://www.epsol.ee/?doc=40>

## **1.2 Psoriaasi etioloogia**

Psoriaas on krooniline põletikuline nahahaigus. Haiguskollete tekkimisel nahale mängivad rolli dendriitrakud, T-lümfotsüüdid, makrofaagid, neutrofiidid ja keratinotsüüdid. Antigeeni esitlemine ja immuunvastus põhjustavad erinevate tsütokiinide ning kemokiinide sekretsiooni. T-rakud diferentseeruvad efektorrakkudeks nagu Th1 (*T helper cell*), Th2 ja Th17 ning kutsuvad esile tsütokiinide sekretsiooni. Uuringud on näidanud, et IFN- $\alpha$  (*interferon-alpha*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis alpha*) ja IL2 (*interleukin 2*) kiirendavad keratinotsüütide paljunemist (Lebwohl, 2003). TNF- $\alpha$  suurendab põletikuvastaste molekulide arvu, põhjustades haiguskoldeid. IL2 aktiveerib T-rakke, aga neil ei ole võimet esile kutsuda tsütokiinide või kemokiinide moodustumist keratinotsüütidest (Martin *et al.*, 2012). Aktiveeritud keratinotsüüdid toodavad tsütokiine ja kemokiine, mis toovad põletikukoldesse lümfotsüüte ning põhjustavad nende kontrollimatu paljunemise. Kogu eelmainitu viib väljapääsmatu olukorra tekkimiseni, mille tagajärjeks on iseenast toitev ja alalhoidev põletikuprotsess psoriaatilise kahjustusega nahaosas. Epidermise rakkude tootmine on kiirenenud ja seetõttu on selle rakkude arv 4-6 kordne tavalisega võrreldes. Kuigi psoriaasi tekkimise põhjuseid on palju uuritud, ei ole ikka veel teada selle haiguse täpne etioloogia ja patogenees (Karvonen, 2010).

## **1.3 Psoriaasi alatiübid**

Psoriaas jaotatakse fenotüübi järgi nelja alagruppi: naastuline (L40.0), tilgakujuline (L40.4), pustulaarne (L40.1) ja erüthrodermiline psoriaas (L40.8). (Raychaudhuri *et al.*, 2014; Griffiths *et al.*, 2007).

Naastuline psoriaas on selle haiguse kõige sagedasem vorm, mis esineb umbes 90% psoriaasi põdevatest inimestest (Levine *et al.*, 2009). Haigus algab tavaliselt punaste laikude või villide tekkega, mis laienevad ning laitudes moodustavad naastusid. Haiguskoled on kuivad, selgete piiridega ümmargused või ovaalsed alad, mida katavad valged soomused. Naastud võivad tekkida kõikidele kehaosadele, kuigi enimlevinumad kohad on küünarnukid, põlved ja peanahk (Raychaudhuri ja Gross, 2000). Naastulist psoriaasi on kujutatud joonisel 1.



**Joonis 1.** Naastuline psoriaas (Coimbra *et al.*, 2012).

Tilgakujuline psoriaas on harvema esinemissagedusega, haarates kuni 2% haigetest (Langley *et al.*, 2005). See vorm tekib tavaliselt lastel ja noortel pärast hemolüütilist streptokokk infektsiooni ülemistes hingamisteedes (Krishnamurthy *et al.*, 2010; Naldi *et al.*, 2001). Selle haigusvormi puhul tekib akuutne punakas lööve jäsemetele ja torsole. Haiguskolded on 2-10 mm diameetriga ning veetilga kujulised. Sageli on haigus ise paranev, kuid võib progresseeruda krooniliseks naastuliseks psoriaasiks (Krishnamurthy *et al.*, 2010). Tilgakujulise psoriaasi näidet on kujutatud joonisel 2.



**Joonis 2.** Tilgakujuline psoriaas (Coimbra *et al.*, 2012).

Pustulaarse psoriaasi korral tekivad haigete kehale mädased villid ehk pustulid. Eristatakse kahte erinevat vormi: lokaalne ja generaliseerunud pustulaarne psoriaas (Baker ja Ryan, 1968;



Kawada *et al.*, 2003). Lokaalse vormi puhul tekivad villid näppudele, varvastele, pihkudele ja taldadele. Generaliseerunud tüüp on harvaesinev ja raske kuluga haigus. Villid tekivad üle kogu keha ning tihti kaasneb palavik, lihasvalu, iiveldus ja laboratoorselt tõendatud leukotsütoos (Baker ja Ryan, 1968; Kawada *et al.*, 2003). Pustulaarset psoriaasi on kujutatud joonisel 3.



**Joonis 3.** Pustulaarne psoriaas (Coimbra *et al.*, 2012).

Erütrodermilise psoriaasi (joonis 4) puhul on punetusega kaetud peaaegu kogu keha. Selline haiguse vorm tekib tavaliselt patsientidel, kellel diagnoositud psoriaasi ei ole piisavalt ravitud (Raychaudhuri *et al.*, 2014).



**Joonis 4.** Erütrodermiline psoriaas (Coimbra *et al.*, 2012).

#### **1.4 Psoriaasi ravivõimalused**

Psoriaas on ravimatu haigus (Colombo *et al.*, 2013), kuid kaasajal on olemas erinevad võimalused leevendada haiguse sümptomeid ja saada psoriaas kontrolli alla. Õige ravi valik sõltub patsiendi tervislikust seisundist, vanusest, kaasuvatest haigustest, psoriaasi vormist ja raskusastmest ning kahjustatud kehaosa(de)st (Mrowietz *et al.*, 2011).

Psoriaasi ravi jaotatakse üldiselt kolmeks: lokaalne ravi, fototeraapia ja süsteemne ravi. Enamiku patsientide puhul kasutatakse lokaalset ravi, mida võidakse kombineerida kahe teise raviviisiga (Fortune *et al.*, 2002). Kaasajal on kolmele traditsioonilisele raviliigile lisandunud bioloogiline ravi, mis mõjutab inimorganismi immuunsüsteemi kindlaid osi.

Lokaalne ravi on esimene samm psoriaasi sümptomite leevendamiseks. See vähendab põletikku ja ülemäärast rakkude paljunemist. Toimeaineid on erinevaid: kortikosteroidid, vitamiin D<sub>3</sub> derivaadid, kaltsineuriini inhibiitorid, tasaroteen, ditranool. Ravimeid saab nahale kanda kreemina, salvina, pihustina, vahuna ja geelina (Menter ja Stoff, 2010).

Fototeraapiat on psoriaasi ravimiseks kasutatud juba sajandeid. Ultraviolettvalgus vähendab rakkude poolt esilekutsutud immuunreaktsiooni ning rakkude kiirenenud paljunemist, vähendades lööbeelementide arvu ja suurust (Bilsland *et al.*, 1997).

Süsteemsed ravimid on efektiivse toimega, kuid raskete kõrvalnähtudega. Koos süsteemse raviga kasutatakse peaaegu alati ka lokaalset- ning valgusravi. Toimeained aeglustavad psoriaatiliste rakkude vohamist ja on immunoloogilise ja põletikuvastase toimega. Kõrvalnähtudest on tõsisemad risk haigestuda maksatsirroosi, hüpertensioon ja nefrotoksilisus (Karvonen, 2010).

#### **1.5 Psoriaasi geneetilised uuringud**

Erinevad uuringud on näidanud psoriaasi seost mitmete geenidega (Nair *et al.*, 1997; Hensen *et al.*, 2003; Orrú *et al.*, 2005). Kandidaatgeenuuringud on kindlaks teinud haiguse vastuvõtlikust mõjutavaid lookuseid ning hiljutised ülegenoomsed assotsiatsiooniuringud näitavad tugevat korrelatsiooni psoriaasi ja kromosoomis 6 asuva peamise koesobivuskompleksiga (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) (Ishihara *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2009). Leitud haiguse vastuvõtlikust tõstvate geenide hulka kuuluvad *HLA-C*, *IL13*, *IL4*, *TNFAIP3*, *IL23A*, *IL23R*, *IL28RA*, *REL*, *IFIH1*, *ERAP*, *TRAF3IP2*, *NFKBIA*, *TYK2*, *ZNF313*, *NOS2*, *FBXL19* ja *NFKBIA*. Need tulemused seletavad psoriaasi patogeneesi olemust, milles omavad tähtsust naha kaitsefunktsioon, kaasasündinud immuunsus ja omandatud immuunsus. Lisaks on leitud geenide omavahelist ja geenide ning keskkonna vahelist mõju psoriaasi kujunemisel (Setty *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011; Chandran, 2013).

### 1.5.1 Psoriaasi päritavus

Perekondade ja kaksikute uuringud on kindlaks teinud psoriaasi seose geneetikaga. Haigete vanemate ( $\lambda_s$ ) järglaste seas hinnati haiguse taasavaldumise määra ( $\lambda$ ). Selleks viidi läbi kaks suurt populatsioonipõhist epidemioloogilist uuringut ja üks haigestunud indiviididel põhinev uuring. Taasavaldumise määraks saadi tulemus 4 ja 10 vahel, mis näitab olulist perekondlikku mõju psoriaasi vastuvõtlikkuses (Lomholt, 1963; Hellgren, 1967; Christophers ja Henseler, 1992). Kui ühel vanemal esineb psoriaas, siis on järglaste vastuvõtlikkuse risk umbes 15%. Kui haigus on mõlemal vanemal, siis risk tõuseb juba 65%-ni (Karvonen, 2010). Kaksikute uuringust selgus, et ühemunakaksikute konkordantsus psoriaasi suhtes on 62-70% vahel ja kahemunakaksikutel 21-23% vahel (Elder *et al.*, 1994). Hinnanguliselt ühel kolmandikul psoriaatikutest on üks või rohkem esimese astme sugulast, kes põeb psoriaasi (Karvonen, 2010).

### 1.5.2 Aheldusuuringud

Aheldusuuringute (*Linkage studies*) abil on kaardistatud mitmed psoriaasi riskilookused. Selleks on viimase paarikümne aasta jooksul tehtud mitmeid kogu inimgenoomi hõlmavaid aheldusanalüüse, mille tulemusel on leitud 19 potentsiaalset psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud lookust 15 erineval kromosoomil (Bowcock, 2004; Sagoo *et al.*, 2004). Neist lookustest kümnele on antud nimi PSORS (*Psoriasis susceptibilty locus*) ning ülejäänud üheksale lookusele eraldi nime ei ole määratud (Sagoo *et al.*, 2004). Antud potentsiaalsetes psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud lookustes vajavad psoriaasi kandidaatgeenid veel välja selgitamist (Capon *et al.*, 2002; Krueger ja Bowcock, 2005). Psoriaasi riskilookused on välja toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Genoomse aheldusanalüüsiiga leitud psoriaasi geneetilise vastuvõtlikkusega seotud lookused ja kandidaatgeenid (kohandatud Chandran, 2013 järgi).

Riski suurendav lookus	Asukoht genoomis	Kandidaatgeenid
PSORS1	6p21.3	<i>HLA-Cw06, CDSN, HCR, HERV-K, HCG22, PSORS1C3, POU5F1, TCF19, CCHCR1, LMP, SEEK1, SPR1</i>
PSORS2	17q	<i>RUNX1, RAPTOR, SLC9A3R1, NAT9, TBCD</i>
PSORS3	4q	<i>IRF2</i>
PSORS4	1q21.3	<i>S100A8, S100A9, PGLYRP3, PGLYRP4</i>
PSORS5	3q21	<i>SLC12A8</i>
PSORS6	19p	<i>JunB</i>
PSORS7	1p	<i>PTPN22, IL23R</i>
PSORS8	16q	<i>CX3CL1, CX3R1, NOD2, CARD15</i>
PSORS9	4q28-32	<i>IL15</i>
PSORS10	18p11	

## PSORS1

Psoriaasi riskilookus 1 (*Psoriasis susceptibility locus*, PSORS) on enim uuritud psoriaasilookus. See asub kromosoomis 6, kus on ka peamine koesobivuskompleks. Hinnanguliselt on PSORS1-1 geneetiline roll 30-50% haigusjuhtudest (Trembath *et al.*, 1997). Uurituimad geenid MHC piirkonnas on HLA lookuse geenid. *HLA-Cw6* tugevat assotsiatsiooni psoriaasiga näidati juba 34 aastat tagasi (Tiilikainen *et al.*, 1980). Lisaks eelmainitule on PSORS1 piirkonnas avastatud võimalikud kandidaatgeenid korneodesmosiini geen (*CDSN*), *alpha-helix coiled-coil-rod* homoloogi geen (*HCR*), *small proline rich 1* geen (*SPRI*) ja transkriptsioonifaktori 19 (*TCF19*) geen (Ishihara *et al.*, 1996; Teraoka *et al.*, 2000; Hensen *et al.*, 2003; Orrú *et al.*, 2005).

Uuemad aheldus- ja assotsiatsioonianalüüsid on näidanud, et *HLA-Cw\*0602* on peamine psoriaasiga seotud riskialleel. Üle 60% psoriaasi patsientidest kannab *HLA-Cw\*0602* alleeli, kuid üldpopulatsioonis on selle alleeli sagedus vaid 10-15% (Veal *et al.*, 2002). Antud alleeli suhtes on homosügootidel 2.5 korda suurem tõenäosus psoriaasi väljakujunemisele kui heterosügootidel ning homosügootidel esineb varase avaldumisega psoriaas (Gudjonsson *et al.*, 2006). *HLA-Cw\*0602* ülesanne on kodeerida valku, mis võib osaleda immuunreaktsioonides esitledes peptiide T-rakkudele (Gudjonsson *et al.*, 2006). Psoriaas on ainuke teadaolev põletikuline autoimmuunhaigus, mis on tugevalt assotsieerunud *HLA-C* geeniga (Valdimarsson *et al.*, 1995; Gudjonsson *et al.*, 2004).

Kuna MHC lookuses ja selle ümber on erakordselt tugev ahelduse tasakaalustamatus (*linkage disequilibrium*, LD), siis on võimalik, et aheldusanalüüside tulemusi on valesi tõlgendatud ning ei teata, milline geen tegelikult vastuvõtlikkust psoriaasile põhjustab (Nickoloff ja Nestle, 2004; Orrú *et al.*, 2005).

## PSORS2

PSORS2 asub 17 kromosoomis 17 ning oli esimene avastatud lookus, mis asub väljaspool MHC-d (Tomfohrde *et al.*, 1994). Selle lookuse seost psoriaasiga on tõestanud mitmed uuringud (Matthews *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 1997; Enlund *et al.*, 1999). PSORS2 jaguneb omakorda kaheks - esimeses asuvad *SLC9A3R1* (*solute-carrier family 9 isoform 3 regulator 1*), *NAT9* (N-atsetüültransferaas 9), *RUNX1* geenid (Helms *et al.*, 2003) ja teises *RAPTOR* geen (Helms *et al.*, 2003; Capon *et al.*, 2004).

## PSORS3

PSORS3 asub kromosoomis 4 ning selles lookuses paikneb geen *IRF2*, mille seost psoriaasiga on tõestanud kaks uurimust (Matthews *et al.*, 1996; Foerster *et al.*, 2004).

## PSORS4

Lookus asub kromosoomis 1 ja sellest piirkonnast on avastatud geenid *S100A8*, *S100A9*, *PGLYRP3* ja *PGLYRP4* (Zenz *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006).

## **PSORS5**

PSORS5 lookus asub kromosoomis 3 ja selle piirkonna geeni *SLC12A8* seost psoriaasiga on tõestanud kaks erinevat uurimust (Hewett *et al.*, 2002; Huffmeier *et al.*, 2005).

## **PSORS6**

Lookus asub kromosoomis 19 ning psoriaasi vastuvõtlikkust mõjutav geen on *JunB* (Lee *et al.*, 2000).

## **PSORS7**

Lookus asub kromosoomis 1 ning selle avastasid Veal *et al.* (Veal *et al.*, 2001). PSORS7-s on riskigeenid *PTPN22* ja *IL23R* (Chandran, 2013).

## **PSORS8**

Lookus asub kromosoomis 16 ning selle seose psoriaasiga avastasid Nair *et al.* (Nair *et al.*, 1997).

## **PSORS9**

Lookus asub kromosoomis 4 ja see leiti Hiina populatsiooni uurides (Zhang *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2007). Lisaks täheldati assotsiatsiooni ka ülegenoomse uuringu meta-analüüsis (Sagoo *et al.*, 2004). PSORS9 psoriaasi kandidaatgeen on *IL15*.

## **PSORS10**

Lookus asub kromosoomis 18 ning avastati Soome perekonnauuringus (Asumalahti *et al.*, 2003).

### **1.5.3 Assotsiatsiooniuuringud**

Geneetilistel assotsiatsiooniuuringutel on komplekshaigusi uurides suurem võimsus kui aheldusuuringutel, sest nende võime avastada tagasihoidliku efektiga geene on parem (Risch ja Merikangas, 1996). Assotsiatsiooniuuringud põhinevad hüpoteesil, et geneetilise markeri ühe alleeli kõrgem esinemissagedus patsientidel näitab seost haigusfenotüübi ning antud variatsiooni vahel (Kruglyak, 1999). Kandidaatgeene analüüsivad assotsiatsiooniuuringud põhinevad sageli juht-kontrolluuringutel (*Case-control study*). Geneetilise assotsiatsiooni juht-kontrolluuring võrdleb alleelide sagedusi või genotüüpe antud uuringrühma indiviidide geneetiliste markerite lookustes. Võrreldakse antud haigusega inimesi tervete inimestega, et teha kindlaks, kas esineb statistiline assotsiatsioon haigustunnuse ja geneetilise markeri vahel (Clarke *et al.*, 2011).

Kuna PSORS1 lookuse puhul on tõestatud tugevaimat seost psoriaasiga, siis selles piirkonnas asuvaid kandidaatgeene on uuritud assotsiatsioonianalüüsides. Uurimused, mis on võrrelnud HLA alleele psoriaasi patsientide ja kontrollindiviidide vahel, on näidanud haiguse seost *HLA-B13*, *HLA-B16*, *HLA-B38*, *HLA-B39* ja *HLA-B17* ja *HLA-Cw6* vahel (Gladman *et al.*, 1986). Lisaks HLA alleelidele on uuritud ka teisi MHC klass I piirkonna kandidaatgeene. Avastatud on

vähemalt 9 bioloogiliselt tähtsat geeni, mis assotsieeruvad psoriaasiga. Need geenid on *HLA-B*, *HLA-C*, *PSORS1C3*, *OTF3*, *HCR*, *SPR1*, *SEEK1*, *CDSN* ja *TNFA* (Holm *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2000; Asumalahti *et al.*, 2002; Holm *et al.*, 2003; Orrú *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Riech *et al.*, 2007).

Psoriaasi assotsiatsiooniuuringuid on läbi viinud ka eestlased. Külli Kingo on oma töös uurinud interleukiin-10 (*IL10*) ja tema perekonda kuuluvate tsütokiinide *IL19*, *IL20* ning *IL24* geneetiliste polümorfismide seoseid naastulise psoriaasiga. Töö tulemusena leidis Kingo, et *IL10* geeni klastris kromosoom 1q31-32 regioonis on kolm haplotüübi plokki. Hinnates haplotüübi-fenotüübi vahelisi seoseid leiti, et *IL10* geen on pigem haigust modifitseeriv kui psoriaasi avaldumist mõjutav geen. Seevastu tsütokiinide *IL19*, *IL20* ja *IL24* geenid mõjutavad aga naastulise psoriaasi avaldumise üldist riski (Kingo, 2005).

*IL20RA* (*interleukin 20 receptor alpha*) ja *IL20RB* (*interleukin 20 receptor beta*) geenide seost psoriaasiga on uurinud Ranno Rätsep. Nende geenide alleelsete variantide assotsiatsioonianalüüsil leiti kolmest SNP-st (*single nucleotide polymorphism*) (rs1184860, rs1167846 ja rs1167849) moodustuv haplotüüp, mis tõstis oluliselt psoriaasi riski (Rätsep, 2010).

#### 1.5.4 Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud

Sageli esinevatest haigustest on paljud komplekshaigused, mida põhjustavad mitmed geneetilised ja keskkonnafaktorid ning nende koostoime. Viimase kümne aasta jooksul on ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS) kindlaks teinud tuhandeid geneetilisi markereid, mis on aluseks komplekshaigustele (Sijde *et al.*, 2014). Tavaliselt kasutatakse geneetiliste markeritena ühe nukleotiidi asendusi, mida nimetatakse SNP-ks.

Esimeses psoriaasi GWAS-is leiti üks varasemalt kindlakstehtud psoriaasiga seotud SNP (rs3212227) *IL12B* regioonis ja teine uus SNP (rs6887695), mis asus esimesest 60 kb kaugusel (Cargill *et al.*, 2007). *The Collaborative Association Study of Psoriasis* (CASPs) oli esimene laiaulatuslik GWAS, mis uuris Euroopa päritolu inimesi (Nair *et al.*, 2009). Uuring koosnes 1409 juhust ja 1436 kontrollist ning analüüsiti 438 670 autosomaalset ja 2.5 miljonit imputeeritud SNP-d. Nendest valiti 21 SNP-d ja 18 lookust lisauuringuks, millest 10 puhul leiti assotsiatsioon haigusega. 8 SNP puhul leiti väga tugev seos psoriaasiga, nende lookuste hulka kuulusid: *HLA-C*, *IL12B*, *IL23R*, *IL23A*, *TNAIP3*, *TNIP1*, *IL4* ja *IL13*. Selle uuringuga avastati lisaks *HLA-C* mõjule veel kolm psoriaasi kujunemise mehhanismi: Th17 rada, NFκB rada ja Th2 rada. *The Genetic Analysis of Psoriasis Consortium* ja *the Wellcome Trust Case Control Consortium* avaldasid järgnevalt ülegenoomse uuringu, mis koosnes 2622 psoriaasi põdevast

inimesest ja 5667 kontrollist ning uuriti 594 224 SNP-d (Strange *et al.*, 2010). Nimetatud GWAS-is leiti seos seitsme uue immuunfunktsiooniga geeniga, mis soodustavad psoriaasi. Nende hulka kuuluvad *IL28RA*, *REL*, *IFIH1*, *ERAP1*, *TRAF3IP2*, *NFKBIA* ja *TYK2*. Lisaks uutele leitud geenidele, näitas uuring assotsiatsiooni ka juba varem avastatud geenidega (Strange *et al.*, 2010). Hilisemas meta-analüüsis leiti seos kahe uue geeniga *NOS2* ja *FBXL19* (Stuart *et al.*, 2010). Erinevad ülegenoomsete assotsiatsiooniuringutega avastatud riskivariandid on välja toodud tabelis 2.



**Tabel 2.** Psoriaasi vastuvõtlikkusega assotsieeruvad variandid ning nende lähel asuvad geenid, mis on leitud Euroopa populatsioonide ülegenoomsete uuringute käigus (kohandatud Chandran, 2012 järgi).

SNP	Asukoht kromosoomis	Lähim geen/ piirkond	Riskifaktor	P-väärtus	Viide
rs11209026	1p31	<i>IL23R</i>	1.59	$7.13 \times 10^{-7}$	Rahman <i>et al.</i> , 2006
rs4649203	1p36	<i>IL28RA</i>	1.13	$6.89 \times 10^{-8}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs6701216	1q21	<i>LCE, EDC</i>	1.45	$6.2 \times 10^{-5}$	Rahman <i>et al.</i> , 2011
rs702873	2p16	<i>REL</i>	1.12	$3.59 \times 10^{-9}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs17716942	2q24	<i>IFIH1</i>	1.29	$1.06 \times 10^{-13}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs27524	5q15	<i>ERAP1</i>	1.13	$2.56 \times 10^{-11}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs20541	5q31	<i>IL13, IL4</i>	1.27	$5 \times 10^{-15}$	Cargill <i>et al.</i> , 2007
rs3212227	5q33	<i>IL12B</i>	1.7	$7.85 \times 10^{-10}$	Rahman <i>et al.</i> , 2006
rs17728338	5q33	<i>TNIP1</i>	1.59	$1 \times 10^{-20}$	Cargill <i>et al.</i> , 2007
rs2395029	6p21	MHC, <i>HCP5</i>	4.1	$2.13 \times 10^{-26}$	Rahman <i>et al.</i> , 2011
rs12191877	6p21	MHC, <i>HLA-C</i>	2.64	$<10^{-100}$	Cargill <i>et al.</i> , 2007
rs240993	6q21	<i>TRAF3IP2</i>	1.25	$5.29 \times 10^{-20}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs610604	6q23	<i>TNFAIP3</i>	1.19	$9 \times 10^{-12}$	Cargill <i>et al.</i> , 2007
rs2066808	12q13	<i>IL23A,</i> <i>STAT2</i>	1.34	$1 \times 10^{-9}$	Cargill <i>et al.</i> , 2007
rs8016947	14q13	<i>NFKBIA</i>	1.19	$1.52 \times 10^{-11}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs10782001	16p11	<i>FBXL19</i>	1.16	$9 \times 10^{-10}$	Strange <i>et al.</i> , 2010
rs4795067	17q11	<i>NOS2</i>	1.19	$4 \times 10^{-11}$	Strange <i>et al.</i> , 2010
rs12720356	19p13	<i>TYK2</i>	1.4	$4.04 \times 10^{-11}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009
rs2235617	20q13	<i>ZNF313</i>	1.2	$1.65 \times 10^{-6}$	Zhang <i>et al.</i> , 2009

Seni läbiviidud uuringutes on leitud mitmeid erinevaid psoriaasi riskigene, mis aitavad seletada haiguse patogeneesi radasid. Leitud geenid mõjutavad näiteks naha kaitsefunktsioone (*LCE3B*, *LCE3E*), Th17 regulatsiooni (*IL12B*, *IL23A*, *IL23R*, *TRAF3IP2*, *TYK2*), kaasasündinud immuunsust (*TNFAIP3*, *TNIP1*, *NFKBIA*, *REL*, *TYK2*, *IFIH1*, *IL23RA*), Th2 regulatsiooni (*IL4*, *IL13*) ja omandatud immuunsuse T-rakke (*ERAP1*, *ZAP70*). Antud geenide lisaurimine aitaks

paremini aru saada haiguse kujunemisest ning oleks abiks uute ravimite väljatöötamisel (Chandran, 2012).

### **1.5.5 Geen-geen interaktsioonid**

Kuigi on kindlaks tehtud mitmed erinevad psoriaasi vastuvõtlikkust tõstvad lookused, siis need selgitavad ainult murdosa psoriaasi päritavusest. Geen-geen interaktsioonid oleksid tõenäoliselt üks võimalus, mille abil võiks puuduvat infot seletada, kuid taolisi interaktsioone on keeruline demonstreerida. Hiljuti läbiviidud ülegenoomses uuringus leiti tõendeid *HLA-C* ja *ERAP1* (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*) lookuste vastastikmõju kohta (Strange *et al.*, 2010). *ERAP1* mõjutas vastuvõtlikkust psoriaasile ainult indiviidides, kes kandsid *HLA-C* riskialleeli. Lisaks eelmainitule täheldati Taani psoriaasi patsientide seas *HLA-C* ja *LCE3C\_LCE3B-del* vastastikmõju, kuid seda ei suudetud tuvastada Hispaania, Itaalia või Ameerika Ühendriikide populatsioonide uuringus (Cid *et al.*, 2009).

### **1.5.6 Geen-keskkond interaktsioonid**

Lisaks geneetilistele faktoritele mõjutab vastuvõtlikkust psoriaasile ka keskkond. Riski tõstvate faktorite hulka kuuluvad infektsioonid (näiteks streptokokk farüingiit, HIV), põletikud, traumad, suitsetamine, ravimid, stressirohked sündmused ja ülekaalulisus (Gudjonsson *et al.*, 2003; Gudjonsson *et al.*, 2006; Patel ja Weinberg, 2008; Jin *et al.*, 2009; Setty *et al.*, 2007a; Setty *et al.*, 2007b; Pattison *et al.*, 2008; Eder *et al.*, 2011). Kuna vastupidiselt teistele autoimmuunhaigustele, mille avaldumine korreleerub samuti keskkonnafaktoritega (reumaatiline liigesepõletik, Crohni tõbi, diabeet 1, atoopiline dermatiit jt), ei ole psoriaasi esinemissagedus üldpopulatsioonis viimastel kümnenditel tõusnud, siis arvatakse, et keskkonnafaktorite mõju psoriaasi avaldumisele on väike geneetilise vastuvõtlikkusega võrreldes (Christophers, 2001).

Psoriaasiga seostatakse mitmeid mikrobioloogilisi infektsioone. Tugevat assotsiatsiooni on näidatud tilgakujulise psoriaasi ja mandlite *Streptococcus pyogenes* infektsiooni vahel. Haigust muudavad halvemaks nahal asuvad *Staphylococcus aureus*, *Malassezia* ja *Candida albicans* (Noah, 1990; Waldman *et al.*, 2001). Psoriaas kujuneb välja või haigus muutub tõsisemaks rohkem kui 90%-l patsientidest, kellel on eelnevalt olnud streptokokk-infektsioon (Weisenseel *et al.*, 2002).

Umbes 30%-l patsientidest tekivad haiguskolded naha vigastamise kohtadesse ning seda nimetatakse Koebner-i fenomeniks (Holzmann *et al.*, 1992). See fenomen on haiguse indikaator ning aitab psoriaasi diagnoosida.

Järjest rohkem on täheldatud, et teatud ravimid võivad juba diagnoositud psoriaasi hullemaks muuta või seda esmakordselt esile kutsuda. Riski suurendamise võimalus varieerub erinevate ravimite vahel. Haigust põhjustavateks loetakse beetablokaatoreid, liitiumi, sünteetilisi malaariavastased ravimeid, mittesteroidseid põletikuvastaseid ravimeid, angiotensiini konverteerivate ensüümide inhibiitoreid ja tetratsükliinrühma antibiootikume (Wolf *et al.*, 1997; O'Brien ja Koo, 2006).

Naastulise psoriaasi teket seostatakse ka eelneva stressirohke sündmusega (Mallbris *et al.*, 2005). Krooniline psühholoogiline stress võib mõjutada psoriaasi kujunemist ja ka selle kliinilist avaldumist (Naldi *et al.*, 2005).

Ülekaalulisus võib suurendada riski psoriaasi avaldumisele (Mallbris *et al.*, 2005; Naldi *et al.*, 2005) ning lisaks muudab ülekaal juba diagnoositud haiguse kulgu raskemaks (Sterry *et al.*, 2007). Coimbra *et al* leidsid, et ülekaaluliste hulk psoriaasi põdevate inimeste seas on suur ja rasvunud indiviidide leptiini, resistiini, TNF- $\alpha$  ja IL6 tasemed on kõrgemad kui võrreldes normaalse kehamassiindeksiga indiviididega (Higa-Sansone *et al.*, 2004). Ülekaalulisus suurendab naha hõõrdumist ja traumasid vöökohas, kaenlaaukudes ning põlveõnnaldes ja see omakorda põhjustab Koebner-i fenomeni (Higa-Sansone *et al.*, 2004).

Põletik on üks põhiline faktor, mis mõjutab psoriaasi kujunemist (Coimbra *et al.*, 2010a; Coimbra *et al.*, 2010b). Kaks uurimust on näidanud, et psoriaasi halvenemine on seotud suurenenud põletikuvastase reaktsiooniga, mille käigus aktiveeritakse neutrofiilid ja tsütokiinid. Põletikuliste markerite tasemed langesid pärast edukat ravi, kuid haigusest tervenemisele vaatamata jäi nõrk immuunvastus alles ning see võib põhjustada psoriaasi taasavaldumist (Coimbra *et al.*, 2010a; Coimbra *et al.*, 2010b).

Leitud on, et ka suitsetamine suurendab riski haigestuda psoriaasi ning see sõltub suitsetamise doosist (Setty *et al.*, 2007a; Jin *et al.*, 2009).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks on leida uusi markereid, mis võivad kontribueerida psoriaasi geneetilisse eelsoodumusse Eesti populatsioonis. Võimalike marker-fenotüüp seoste leidmiseks kavandati juht-kontrolluuring, kus võrreldi 716 psoriaasi põdeva ja 1566 kontrollindiviidi genotüüpe.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Valim

Antud töö raames kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu proove, mis on kogutud geenidoonoritelt üle kogu Eesti. Uuringu läbiviimisel analüüsiti 2282 indiviidi ning viidi läbi juht-kontrolluuring. Psoriaasihaigeid oli valimis kokku 716 indiviidi ning kontrollgrupis oli 1566 inimest. Haigusjuhtude ja kontrollindiviidide sooline ja ealine jaotuvus on välja toodud tabelites 1 ja 2.

**Tabel 1.** Ealine jaotuvus töös käsitletud uuringrühmas.

	Mehed	Naised	Kokku
Juhud	272	444	716
Kontrollid	729	837	1566

**Tabel 2.** Sooline jaotuvus töös käsitletud uuringrühmas.

	Keskmine vanus (standardhälve)		Vanusevahemik: miinimum-maksimum	
	Mehed	Naised	Mehed	Naised
Juhud	45.16 (16.14)	45.44 (16.34)	18-87	18-101
Kontrollid	54.66 (16.04)	56.46 (16.93)	18-90	18-93

#### 2.2.2 Fenotüüp

Haigusjuhtudeks valiti psoriaasi (ICD-10 koodid L40, L40.0, L40.8, L40.9) kinnitatud diagnoosiga indiviidid. Haigusjuhtudega geenidoonorite valik teostati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu vanemteaduri dr. Tõnu Esko ja Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu bioinformaatiku Mari-Liis Tammesoo poolt.

Kontrollgruppi valiti invidiidid, kellel ei olnud järgnevaid diagnoose:

1. Psoriaas (L40, L40.0, L40.5, L40.8, L40.9)
2. I tüüpi diabeet (E10)
3. Crohni tõbi (K50)
4. Erütematoosne luupus (L93)
5. Seropositiivne reumatoidartriit (M05)
6. Reumatoidartriit (M06)
7. Haavandiline koliit (K51)

Käesoleva töö raames teostatavate uuringute läbiviimiseks on geenidonorid andnud informeeritud nõusoleku ning olemas on Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee kooskõlastus.

### 2.2.3 Genotüpiseerimine

Genotüpiseerimine viidi läbi Illumina Infinium II tehnoloogiat ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) kasutava Illumina HumanExome-12v1-1 249 901 markeriga kiibiga. Nimetatud kiip on fokuseeritud kodeeriva ala harvaesinevate variantide genotüpiseerimiseks. Eksoomikiip on disainitud ~12 000 indiviidi kogu eksoomi sekveneerimisel saadud variantidest, kusjuures koondatud on variandid, mida sekveneerimisandmetes on identifitseeritud vähemalt kahel indiviidil ja vähemalt kahes erinevas sekveneerimisprojekti (Grove *et al.*, 2013)<sup>2</sup>. Genotüpiseerimine viidi läbi Eesti Geenivaramu tuumiklaboris.

### 2.2.4 Kvaliteedikontroll

Genotüpiseerimisjärgselt läbis uuritav kohort kvaliteedikontrolli järgnevate parameetrite ning näitajate osas:

1. edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal (*call rate*, CR) nii indiviiditi kui iga SNP kohta
2. Hardy-Weinbergi tasakaal (*Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE)
3. indiviidide vaheline sugulus
4. genotüübi põhjal leitud soo mitte-kokkulangevus Eesti Geenivaramu proovi fenotüübi informatsiooniga
5. heterosügootsus

Edasistest analüüsides jäeti välja invidiidid, kelle individuaalne CR oli alla 99%. Samuti eemaldati SNP-d, mis ei vastanud järgnevatele kriteeriumidele: CR <99% ning HWE testi  $P < 10^{-4}$  (kontrollgrupis). Lähisugulaste tuvastamiseks hinnati ühiselt eellaselt päritud alleelide

---

<sup>2</sup> [http://genome.sph.umich.edu/wiki/Exome\\_Chip\\_Design](http://genome.sph.umich.edu/wiki/Exome_Chip_Design)

(*identical by descent*, IBD) osakaalu genoomis. Sugulaspaaridest, kus IBD osakaal oli suurem või võrdne 20% ( $PIHAT \geq 0.2$ ) genoomist, eemaldati üks sugulastest. Samuti eemaldati indiviidid, kelle fenotüübi informatsioonis väljatoodud sugu ei vastanud geneetiliste andmete põhjal ennustatud soole. Eemaldati ka ebanormaalselt kõrge või madala heterosügootsusega indiviidid (*Wright's inbreeding coefficient*  $F - 4SD$  keskmisest). Kvaliteedikontrolli läbis genotüpiseeritud 3030 indiviidist 716 patsienti ja 1566 kontrollindiviidi ning kokku 242 121 SNP-d. Andmete kvaliteedikontroll ja filtreerimine viidi läbi programmidega Illumina GenomeStudio version 3.1 ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)), zCall (Goldstein *et al.*, 2012) ja PLINK v1.07 (Purcell *et al.*, 2007). Andmete kvaliteedikontroll teostati osaliselt Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu vanemteaduri dr. Reedik Mägi poolt.

### **2.2.5 Assotsiatsioonianalüüs**

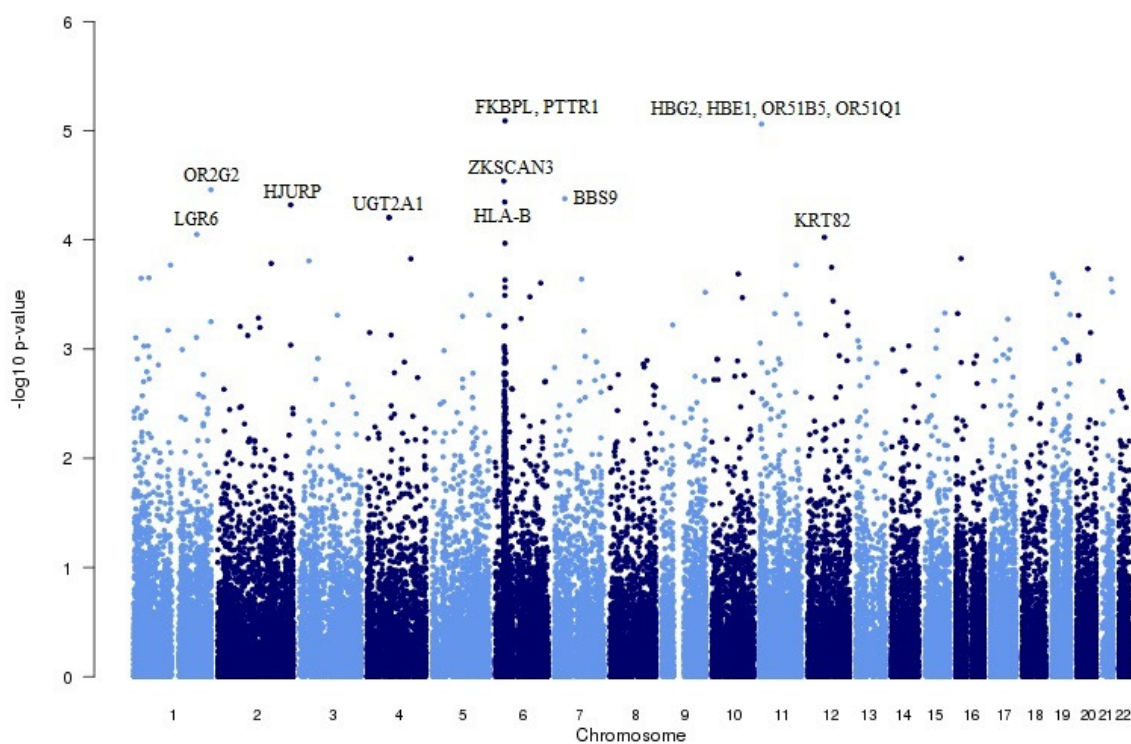
Geneetiliste markerite ja fenotüübi vaheline assotsiatsioonianalüüs viidi läbi programmiga PLINK v1.07 (Purcell *et al.*, 2007). Selleks kasutati logistilist regressiooni ning testiti aditiivset mudelit: haiguse väljakujunemise riskifaktor on heterosügootide puhul  $r$  ja homosügootide puhul  $2r$  (Lewis, 2002). Kovariaadina võeti arvesse indiviidide vanus, sugu ja sugulaste maatriksi põhjal leitud 10 esimest peakomponenti, et kahandada võimalikku populatsiooni stratifikatsiooni.

### **2.2.6 Tulemuste analüüsijärgne kvaliteedikontroll**

Assotsiatsioonianalüüsi järgselt jäeti välja SNP-d, mille minoorse alleeli üldarv (*minor allele count*, MAC) oli alla 10 ning kontrolliti käsitsi üle *cluster plot*'id kõikidel SNP-del, mille P-väärtused olid väiksemad kui  $1 \times 10^{-4}$ . Kvaliteedikontrolli läbis 51-st SNP-st 11.

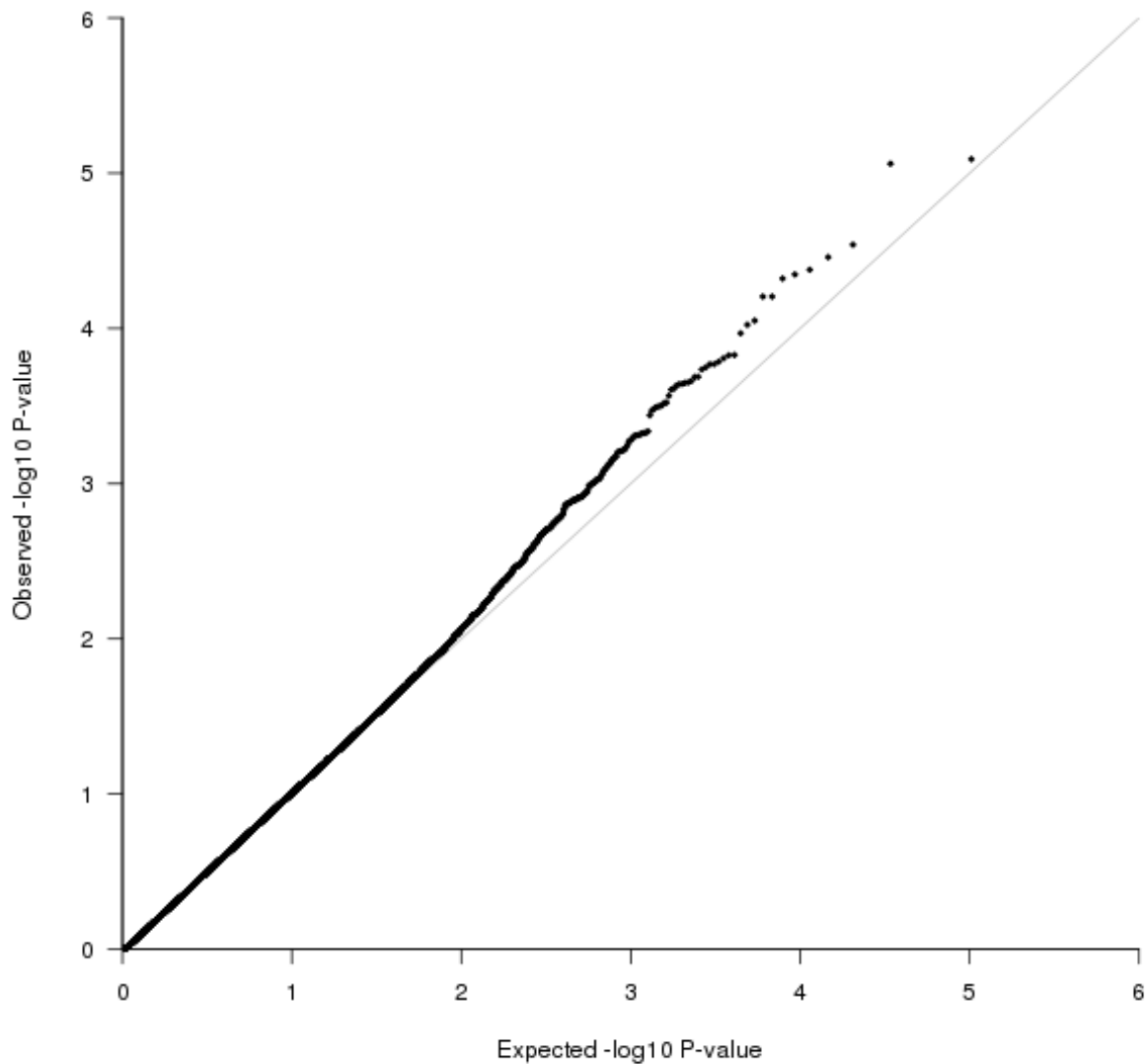
### 2.3 Tulemused

Käesoleva uurimistöö raames viidi läbi ülegenoomne assotsiatsiooniuuring, leidmaks geneetilisi variante, mis võiksid suurendada psoriaasi vastuvõtlikkust. Analüüsi kaasati 2282 indiviidi (1001 meest ja 1281 naist) ning kasutati logistilise regressiooni mudelit, võttes arvesse soo, vanuse ja 10 esimest peakomponenti. Analüüsi käigus leiti 11 markerit, mille P-väärtus oli alla  $1 \times 10^{-4}$ , kokku 9 genoomsest lookusest. Läbiviidud analüüsis ei saadud tulemust, mida võiks lugeda ülegenoomselt statistiliselt oluliseks (P-väärtusega alla  $5 \times 10^{-8}$ ). Seetõttu kirjeldame tulemustes seoseid, mille P-väärtus jääb alla  $10^{-4}$ . Leitud seosed on esitatud graafiliselt Manhattan joonise abil (Joonis 5) ja tabelis 3.



**Joonis 5.** Psoriaasi juht-kontrolluuringu assotsiatsioonianalüüsi Manhattan joonis. Y-teljel on negatiivne kümnendlogaritm assotsiatsioonitesti P-väärtusest. X-teljel on kromosoomid.

Populatsiooni stratifikatsiooni hindamiseks arvutati välja parameetri  $\lambda$  väärtus. Parameetri hinnang  $\lambda = 1.03$  (Joonis 6) näitab, et analüüsitavas andmestikus olulist stratifikatsiooni ei esinenud.



**Joonis 6.** Eeldatud ja vaadeldud assotsiatsioonide P-väärtuste kvantiilide joonis. X-teljel on toodud eeldatav P-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm ning Y-teljel vaadeldud P-väärtuste negatiivne kümnendlogaritm.



**Tabel 3.** Psoriaasi juht-kontrolluuringu assotsiatsioonianalüüsi tulemused. Lähim geen on määratud, kui selle kaugus seost näidanud SNP-st on väiksem kui 100 kb.

Kromosoom	SNP-i ID	Lookus	Lähim geen	Efektalleel/ teine alleel	EAF	BETA	SE	CI95 (min/max)	P-väärtus
1	rs75658797	1q32.1	<i>LGR6</i>	A/G	0.1461	-0.4999	0.1276	-0.75/-0.25	8.916 x 10 <sup>-5</sup>
1	rs1151687	1q44	<i>OR2G2</i>	G/C	0.2783	0.3993	0.09646	0.21/0.59	3.476 x 10 <sup>-5</sup>
2	rs2286430	2q37.1	<i>HJURP</i>	C/T	0.4216	0.3686	0.09064	0.19/0.55	4.781 x 10 <sup>-5</sup>
4	rs41292307	4q13.3	<i>UGT2A1</i>	G/A	0.1873	0.4683	0.117	0.24/0.70	6.244 x 10 <sup>-5</sup>
4	rs55864295	4q13.3	<i>UGT2A1</i>	G/A	0.1873	0.4683	0.117	0.24/0.70	6.244 x 10 <sup>-5</sup>
6	rs2844586	6p21.33	<i>HLA-B</i>	A/G	0.03309	-1.1	0.2697	-1.63/-0.57	4.497 x 10 <sup>-5</sup>
6	rs204999	6p21.32	<i>FKBPL,</i> <i>PRRT1</i>	G/A	0.2509	-0.7558	0.1694	-1.09/-0.42	8.127 x 10 <sup>-6</sup>
6	rs13201752	6p22.1	<i>ZKSCAN3</i>	G/A	0.1536	-0.5345	0.1278	-0.79/-0.28	2.892 x 10 <sup>-5</sup>
7	rs2598392	7p14.3	<i>BBS9</i>	C/T	0.2263	-0.435	0.1062	-0.64/-0.23	4.191 x 10 <sup>-5</sup>
11	rs10838094	11p15.4	<i>HBG2,</i> <i>HBE1,</i> <i>OR51B5,</i> <i>OR51Q1</i>	A/G	0.3913	0.4034	0.09072	0.23/0.58	8.692 x 10 <sup>-6</sup>
12	exm1004956	12q13.13	<i>KRT82</i>	A/G	0.01008	1.783	0.4567	0.89/2.68	9.478 x 10 <sup>-5</sup>

Kromosoomis 1 leidsime assotsiatsiooni kahe markeriga. Rs75658797 asub geenis *LGR6* (*leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 6*), lookuses 1q32.1. Antud geen kodeerib glükoproteiini hormoonretseptor valke. *LGR6*-e on küll seostatud erinevate haigustega, näiteks munasarja tsüstadenoomiga, aga siamaani ei ole üheski meile teadaolevas töös leitud assotsiatsiooni psoriaasiga. Marker rs1151687 asub geenis *OR2G2* (*olfactory receptor, family 2, subfamily G, member 2*), lookuses 1q44. Olfaktoorsed retseptorid vastutavad ninas lõhnataju eest. Ka selle geeniga ei ole varasemad tööd seost psoriaasiga näidanud.

Kromosoomis 2 leidsime assotsiatsiooni markeriga rs2286430. Antud SNP asub geenis *HJURP* (*Holliday junction recognition protein*), lookuses 2q37.1. Arvatakse, et *HJURP* on seotud tsentromeeri kromatiini kokkupakkimisega. *HJURP*-i on seostatud erinevate vähivormidega, aga psoriaasiga siamaani mitte.

Kromosoomis 4 leidsime assotsiatsiooni kahe lähestikku oleva markeriga. Rs41292307 ja rs55864295 asuvad lookuses 4q13.3. *UGT2A1* (*UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1, complex locus*) geeni poolt kodeeritavad valgud osalevad biotransformatsiooni reaktsioonides, mille tulemusena hävitatakse potentsiaalselt toksilised ksenobiootikumid ja endogeensed ühendid. *UGT2A1*-e pole meile teadaolevalt üheski uuringus psoriaasiga seostatud.

Kromosoomis 6 leidsime assotsiatsiooni kolme markeriga. Rs2844586 asub lookuses 6p21.33, kus on *HLA-B* geen. *HLA-B* kuulub HLA klass I gruppi ning antud geen mängib kriitilist rolli inimese immuunsüsteemis, aidates tuvastada kehaomaseid valke võõrastest valkudest. *HLA-B* geeni on mitmetes töödes seostatud psoriaasiga. Teine leitud marker rs204999 asub lookuses 6p21.32. Antud SNP on kahe geeni vahelises alas, kaugus *FKBPL*-ist (*FK506 binding protein like*) on <1.3 kb ja kaugus *PRRT1*-st (*proline-rich transmembrane protein 1*) on <1 kb. *FKBPL* mängib rolli immunoregulatsioonis ja rakutsükli kontrollis ning selle geeni assotsiatsiooni psoriaasiga on leitud ka varasemates töödes. *PRRT1* kuulub rakumembraani valkude hulka ja seost psoriaasiga ei ole siamaani leitud. Kolmas avastatud SNP rs13201752 asub lookuses 6p22.1. Geen *ZKSCAN3* (*zinc finger with KRAB and SCAN domain*) kodeerib valke, mis on autofaagia repressorid. Selle geeni seotust psoriaasiga ei ole varem täheldatud.

Kromosoomis 7 tuvastasime assotsiatsiooni markeriga rs2598392, mis asub 7p14.3 lookuses *BBS9* geenis (*Bardet-Biedl Syndrome 9*). Selle geeni täpset funktsiooni ei ole veel kindlaks tehtud, kuid arvatakse, et *BBS9* on seotud paratüreoid hormoonidega luudes. Tõendeid *BBS9* ja psoriaasi vahel ei ole veel leitud.

Kromosoomis 11 avastasime assotsiatsiooni markeriga rs10838094. See SNP asub 11p15.4 lookuses *HBG2* (*hemoglobin, gamma G*), *HBE1* (*hemoglobin, epsilon 1*), *OR51B5* (*olfactory receptor, family 51, subfamily B, member 5*) ja *OR51Q1* (*olfactory receptor, family 51, subfamily Q, member 1*) geenides. Hemoglobiini ja olfaktorsete retseptorite seost psoriaasiga ei ole täheldatud.

Kromosoomis 12 leidsime assotsiatsiooni markeriga, mis asub lookuses 12q13.13. Geen *KRT82* (*keratin 82*) kodeerib karvade koosseisu kuuluvaid valke. Seoseid psoriaasiga ei ole senimaani tõestatud.

## 2.4 Arutelu

Psoriaasi etioloogia ei ole siiani täpselt teada, kuid mitmed eelnevad assotsiatsioonianalüüsid on näidanud, et psoriaasi vastuvõtlikkust mõjutavad osaliselt geneetilised faktorid. Lisaks seletavad läbiviidud töödest saadud tulemused psoriaasi patogeneesi olemust, milles mängivad rolli naha kaitsefunktsioon, kaasasündinud immuunsus ja omandatud immuunsus (Chandran, 2013). Perekondade ja kaksikute uuringud on näidanud, et psoriaas on päritav haigus. Haigete vanemate lastel on suurem tõenäosus psoriaasi avaldumiseks, näiteks mõlema haige vanema korral kuni 65% (Karvonen, 2010). Lisaks haigusele vastuvõtlikkust suurendavatele lookustele on näidatud ka geen-geen ja geen-keskkond interaktsioone, mis annavad täpsustavat informatsiooni psoriaasi kujunemise kohta. Hiljuti läbiviidud ülegenoomne uuring leidis tõendeid *HLA-C* ja *ERAPI* lookuste vastastikuse mõju kohta. Geenide omavahelisi koostoimeid tuleks aga põhjalikumalt uurida, selgitamaks psoriaasi päritavust ning haiguse avaldumise põhjuseid. Ainuke probleem seisneb interaktsioonide keerulises demonstreerimises (Chandran, 2012). Mitmed uuringud on tõestanud, et psoriaasi avaldumist mõjutavad ka keskkonnafaktorid, näiteks erinevad infektsioonid, naha mehaanilised vigastused, ülekaalulisus jpm (Gudjonsson *et al.*, 2003; Gudjonsson *et al.*, 2006; Patel ja Weinberg, 2008; Jin *et al.*, 2009). Aheldus- ja assotsiatsiooniuringud on kindlaks teinud arvukalt lookuseid ja neis esinevaid variante, mis tõstavad haigestumise riski (Burden *et al.*, 1998; Tomfohrde *et al.*, 1994; Matthews *et al.*, 1996; Capon *et al.*, 2001; Enlund *et al.*, 1999). Uuringutes kirjeldatud markereid saaks kasutada personaalsete haigusriskide hindamiseks. Kui indiviid on kindlaks tehtud geneetilise markeri riskialleeli kandja, võib tal olla suurem tõenäosus haigestuda kui nendel, kellel seda ei esine. Selle kindlakstegemiseks arvutatakse riskiskoorid riskialleelide ja protektiivsete alleelide vahel. Sellepärast on väga tähtis viia läbi haigust põhjustavate geneetiliste variatsioonide identifitseerimiseks assotsiatsiooniuringuid suurtes uuringurühmades, mille tulemusel võidakse avastada uusi potentsiaalseid haigusriske suurendavaid lookuseid. Mida

parem on arusaam psoriaasi mõjutavatest geneetilistest faktoritest, seda paremini on võimalik kindlaks teha haiguse täpne etioloogia ning arendada edasi olemasolevaid ravimeid ja luua uusi. Ülegenoomsetest assotsiatsiooniuuringutest avastatud haigusseoseliste markerite rakendamine kliinilises diagnostikas ei ole lihtne ning sellega on seotud mitmed probleemid. Üheks takistuseks on see, et esialgselt GWAS-ist leitud uued geenivariandid võivad olla replikatsiooniuuringu populatsioonis harvaesinevad. Selle tõttu ei saa neid indiviidide seas levivate haiguste tekkega seostada. Teiseks probleemiks on see, et sageli esinevad kindlakstehtud SNP-d geenivälistes piirkondades ning me ei tea, kuidas need võivad mõju avaldada haiguse fenotüübile. Sellepärast oleks tähtis leida geene, mis aitaksid kaasa haiguse bioloogilise alusmehhanismi mõistmisele. Eelmainitu põhjal võib väita, et haiguse eelsoodumusega seotud genoomi piirkondade tuvastamise väärtus seisneb uue informatsiooni saamises haiguse kujunemise kohta ning võivad avada uusi võimalikke sihtmärke terapeutilistele lähenemistele.

Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli leida uusi geneetilisi markereid, mis mõjutavad psoriaasi vastuvõtlikkust. Antud uuringu raames ei õnnestunud küll tuvastada ülegenoomselt statistiliselt olulisi assotsiatsioone, kuid keskendusime lookustele, mille P-väärtus oli alla  $1 \times 10^{-4}$ . Selliseid nominaalselt olulisi P-väärtusi leidsime 11. Nende 11 lookuse puhul peab arvesse võtma, et osa neist võivad olla valepositiivsed tulemused ning saadud tulemusi peab replitseerima sõltumatus kohordis. Valepositiivsed tulemused võivad esile tulla ebapiisava kvaliteedikontrolli tagajärjel.

Varasemates geneetilistes uuringutes avastatud geenid on jagatud kümneks psoriaasi riskilookusteks (*Psoriasis susceptibility locus*, PSORS) (Chandran, 2012). Antud haiguse puhul on kõige rohkem uuritud PSORS1-e, kus asub peamine koesobivuskompleks (*Major Histocompatibility Complex*, MHC). See piirkond on näidanud kõige tugevamat assotsiatsiooni antud haigusega. MHC-s asuvad HLA (*Human leukocyte antigen*) geenid, mis mängivad olulist rolli inimese immuunsüsteemis. Psoriaasi seoseid HLA geenidega on näidanud enamik läbiviidud uuringutest (Strange *et al.*, 2010; Nair *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Liu *et al.* 2008). Ka käesoleva töö käigus leidsime assotsiatsiooni HLA piirkonnas asuva geeniga *HLA-B*. Marker rs2844586 asub kromosoomis 6 lühikeses õlas. *HLA-B* ülesanne on esitleda immuunsüsteemile organismile võõrast päritolu valke, mis hävitatakse T-rakkude poolt. Sama geeni assotsiatsiooni psoriaasiga on tõestanud ka hiljutine meta-analüüs, kus ei tulnud küll välja meie analüüsis leitud marker, aga näidati psoriaasi vastuvõtlikkust suurendavat riski seoses *HLA-B* geeniga (Zhao *et al.*, 2013). Teine meie uuringus leitud marker rs204999 asub samuti kromosoomis 6 lühikeses õlas ning <1.3 kb kaugusel *FKBPL* ja <1 kb kaugusel *PRRT1* geenidest. *FKBPL* kodeerib valke, mis mängivad rolli

immunoregulatsioonis ja rakutsükli regulatsioonis. Selle geeni assotsiatsiooni psoriaasiga on leidnud ka Panko ja teised (2005). *PRRT1* kodeerib raku membraanseid valke. Kolmanda MHC regioonist avastatud markeri rs13201752 assotsiatsiooni psoriaasi vastuvõtlikkusega ei ole varasemates töödes näidatud. See SNP asub *ZKSCAN3* geenis ning võiks potentsiaalselt suurendada psoriaasi haigestumise tõenäosust, sest *ZKSCAN3* kodeerib valke, mis represserivad kahjustatud rakkude autofaagiat ning lüsoosoomide biogeneesi. Nendesse tulemustesse tuleb aga suhtuda ettevaatusega, sest MHC lookuses ja selle ümber on erakordselt tugev ahelduse tasakaalustamatus (LD) ning on võimalik, et aheldusanalüüside tulemusi on valesti tõlgendatud ja ei teata, milline geen tegelikult vastuvõtlikkust psoriaasile põhjustab (Nickoloff ja Nestle, 2004; Orrú *et al.*, 2005). HLA geenide täpset mõju psoriaasi avaldumisel tuleb veel täiendavalt uurida. Peale eelmainitud geenidele on PSORS1 lookuses veel *CDSN*, *HCR* ja *TCF19* geenid (Ishihara *et al.*, 1996; Teratoka *et al.*, 2000; Hensen *et al.*, 2003; Orrú *et al.*, 2005).

Erinevad tööd on leidnud assotsiatsioone teiste lookuste (PSORS2-PSORS10) ja psoriaasi vahel. Siiski need seosed on olnud nõrgad ning tihti ei ole positiivseid tulemusi suudetud korrata teistes uurimisgruppides (Bowcock, 2004). Selle põhjuseks võib olla: esiteks, et ülejäänud lookused omavad nõrgemat efekti psoriaasi kujunemisele kui PSORS1; teiseks, et tegemist on valepositiivsete tulemustega; kolmandaks, et aheldusanalüüsi abil ei pruugigi üldpopulatsioonis kõrge esinemissagedusega psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud alleele üles leida (Bowcock, 2004).

Lisaks aheldusuuringutele kasutatakse assotsiatsioonianalüüse, millel on komplekshaiguste uurimisel suurem võimsus aheldusuuringutega võrreldes. Nende kandidaatgeenide uuringute tulemusel on leitud vähemalt 9 bioloogiliselt tähtsat geeni, mis suurendavad psoriaasi vastuvõtlikkust. Nende hulka kuuluvad näiteks *OTF3*, *SEEK1* ja *TNFA* (Reich *et al.*, 2007; Orrú *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2000). Eksperimentaalosas kirjeldatud uuringus leidsime assotsiatsiooni lisaks MHC regioonis asuvatele lookustele ka markeritega kromosoomides 1, 2, 4, 7, 11 ja 12. Kromosoomis 1 avastatud markerid asuvad geenides *LGR6* ja *OR2G2*; kromosoomis 2 avastatud SNP paikneb *HJURP* geenis; kromosoomist 4 leidsime kaks markerit, mis on mõlemad *UGT2A1* geenis; kromosoomist 7 avastasime SNP-i *BBS9* geenis; kromosoomist 11 leitud marker asub *HBG2*, *HBE1*, *OR51B5* ja *OR51Q1* geenides; ning kromosoomis 12 olev marker asub geenis *KRT82*. Psoriaasi seost eelmainitud geenidega ei ole siiani avaldatud uuringutes täheldatud ning need võivad olla valepositiivsed tulemused, mis on tekkinud ebapiisava GWAS andmete kvaliteedikontrolli tõttu.

Käesolev ülegenoomne assotsiatsiooniuring viidi läbi Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu kohordis kasutades eksoomi kiipi. Nimetatud eksoomi kiip on disainitud just kodeerivas alas

asuvate harvaesinevate variantide uurimiseks. Antud töö põhines hetkel küll ainult uurides Eesti populatsiooni, kuid saadud tulemusi kasutatakse edaspidi ka suuremas koostööprojektis. Vaatamata mõnele puudusele, näiteks ei suuda kiibid veel seletada geen-geen interaktsioone, on kõike eelnevat arvesse võttes eksoomi kiibid väga head vahendid uurimaks haiguste assotsiatsioone erinevate markeritega.

Kokkuvõtteks võib väita, et antud uuringus saadud tulemused kinnitasid psoriaasi seost peamise koosobivuskompleksi piirkonnaga. Kuna leitud seosed ei olnud üleüldiselt statistiliselt olulise väärtusega, siis tuleb läbi viia järeluurimised, et kinnitada töö tulemusi ja leida tuvastatud markerite täpsem mõju fenotüübile. Eriti tähtis oleks uurida *ZKSCAN3* geeni, sest oma funktsiooni tõttu võib tegemist olla uue psoriaasi vastuvõtlikkust suurendava lookusega.

## KOKKUVÕTE

Psoriaas on krooniline immuun-vahendatud põletikuline nahahaigus, mille etioloogiat ja patogeneesi aitavad tänapäeval täpsustada geneetilised uuringud. Käesoleva töö teoreetilise osa eesmärgiks oli anda ülevaade nimetatud haiguse levimusest, kliinilisest pildist, ravivõimalustest ning haiguse vastuvõtlikkust suurendavatest teguritest, eelkõige geneetilistest.

Töö praktilise osa eesmärk oli leida uusi geneetilisi markereid, mis võivad mõjutada psoriaasi avaldumist. Psoriaasi ja geneetiliste variatsioonide vaheliste seoste leidmiseks viidi läbi eksoomi kiibiga ülegenoomne assotsiatsiooniuuring. Selleks analüüsiti 242 121 SNP markerit 2282 indiviidil Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonorite andmebaasist. Selgitamaks geneetiliste variantide mõju psoriaasile, kasutasime logistilise regressiooni mudelit. SNP markereid analüüsid kasutati aditiivset mudelit ning kovariaatidena kasutati vanust, sugu ja kümnet esimest peakomponenti.

Antud uuringu põhjal ei tuvastatud ühtegi ülegenoomselt statistiliselt olulist assotsiatsiooni. Uurides assotsiatsioone, mille P-väärtus jäi alla  $10^{-4}$ , identifitseeriti 11 markerit, millel leiti seos psoriaasiga. Avastatud markeritest 3 kuuluvad MHC piirkonda. Esimene asub HLA-B geenis, teine *FKBP1* geenis ja kolmas *ZKSCAN3* geenis. Kahe esimese geeni suurendavat vastuvõtlikkust psoriaasile on ka juba varasemates töödes täheldatud. Kolmanda geeni mõju psoriaasile ei ole varem tõestatud, kuid oma funktsiooni tõttu võiks tegemist olla uue antud haiguse avaldumise riski tõstva geeniga. Ülejäänud leitud markerid asusid väljaspool MHC piirkonda ning nende seost psoriaasiga ei ole varasemates uuringutes leitud.

Kuna antud uuringu käigus ei õnnestunud tuvastada ülegenoomselt statistiliselt olulisi assotsiatsioone, on tulevikuplaaniks analüüse korrata suurema valimiga ning uuringut replitseerida sõltumatus kohordis.

# Psoriasis association study based on exome array data

Riho Rokk

## Summary

Psoriasis is a chronic immune-mediated inflammatory skin disease with a prevalence of 2-4% in general population. Family studies have suggested that psoriasis has a complex mode of inheritance involving the interaction on multiple genes in combination with environmental risk factors, such as smoking, stress and obesity. The exact causative mechanisms of the disease remain unknown but the principal clinical features of psoriasis (inflammatory infiltrate and epidermal hyperproliferation with abnormal differentiation of keratinocytes) appear to be driven mainly by various cytokines and chemokines released by the activated, skin-homing pathogenic T-cell population.

Understanding the genetic background of psoriasis is essential to determine the basis of psoriasis. Genome-wide association studies are currently the most popular in identifying susceptibility genes for complex diseases.

In this study we used association study with exome array to find new psoriasis susceptibility variants. 2282 subjects from Estonian population and 249 901 SNPs were analysed. No genome wide statistically important association was found. The associations with P-value less than  $1 \times 10^{-4}$  revealed 11 markers and 9 loci. Two of identified loci have already been reported as psoriasis susceptibility genes *HLA-B* and *FKBPL* and 1 locus, which may potentially be novel psoriasis susceptibility gene *ZKSCAN3*. All these genes are located in the MHC region, which has been associated with susceptibility of psoriasis. Other 8 markers have not been associated with psoriasis.

Even though present study didn't identify statistically significant results, two already reported psoriasis susceptibility loci and one potential new locus were found. To validate the results, a replication study must be considered using independent cohort data and further investigation is needed to clarify *ZKSCAN3* psoriasis susceptibility.



# TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajaid, Evelin Mihailovit ja dr. Tiit Nikopensiust, suurepärase abi ja hea koostöö eest.

Samuti avaldan tänu dr. Reedik Mägile, kes aitas läbi viia uuringu kvaliteedikontrolli.

Lisaks tänan ka kogu biotehnoloogia õppetooli kollektiivi ning geenidoonoreid, kellela poleks olnud võimalik uuringut teostada.

Suured tänusõnad lähevad ka perekonnale, lähedastele ja sõpradele, kes mind toetasid ja selle töö valmimisele kaasa aitasid.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Asumalahti, K., Veal, C. *et al.* (2002) Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *J Invest Dermatol* 115:824-828

Asumalahti, K., Ameen, M. *et al.* (2003) Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol* 120(4):627-632

Baker, H., Ryan, T. J. (1968) Generalized pustular psoriasis. A clinical and epidemiological study of 104 cases. *Br J Dermatol* 80(12):771-793

Bilsand, D., Dawe, R., Diffey, B. L. *et al.* (1997) An appraisal of narrowband (TL-01) UVB phototherapy. *British Photodermatology Group Workshop Report (April 1996)*. *Br J Dermatol* 137:327-330

Bowcock, A. M. (2004) Psoriasis genetics: the way forward. *J Invest Dermatol* 122:15-18

Braathen, L. R., Botten, G., Bjerkedal, T. (1989) Prevalence of psoriasis in Norway. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 142:5-8

Brandrup, F., Green, A. (1981) The prevalence of psoriasis in Denmark. *Acta Derm Venereol* 61:344-346

Burden, A. D., Javed, S. *et al.* (1998) Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol* 110:958-960

Capon, F., Helms, C. *et al.* (2004) Genetic analysis of PSORS2 markers in a UK dataset supports the association between RAPTOR SNPs and familial psoriasis. *J Med Genet* 41(6): 459-460

Capon, F., Semprini, S. *et al.* (2001) Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 116:728-730

Cargill, M., Schordi, S. J. *et al.* (2007) A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80:273-290

Christophers, E. (2001) Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 26:314-320

Cid, R., Riveira-Munoz, E. *et al.* (2009) Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet* 41:211-215

Clarke, G.M., Anderson, C. A., Pettersson, F. H. *et al.* (2011) Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 6(2):121-133

Coimbra, S., Oliveira, H., Figueiredo, A., Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A. 2012. Psoriasis: Epidemiology, Clinical and Histological Features, Triggering Factors, Assessment of Severity and Psychological Aspects, p. 69-88. *In* J. O’Daly (ed.), *Psoriasis – A Systemic Disease* InTech, Portugal

Colombo, M. D., Cassano, N., Bellia, G., Vena, G. A. (2013) Cyclosporine Regimens in Plaque Psoriasis: An Overview with Special Emphasis on Dose, Duration, and Old and New Treatment Approaches. *The Scientific World J* 2013:1-11

Chandran, V. (2013) The genetics of psoriasis and psoriatic arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 44(2):149-56

Chang, Y. T., Chen, T. J., Liu, P. C. *et al.* (2009) Epidemiological study of psoriasis in the national health insurance database in Taiwan. *Acta Derm Venereol* 89:262–266

*Eesti psoriaasiliidu arengukava 2012-2017* (2012) URL (kasutatud aprill 2014) <http://www.epsol.ee/?doc=40>

Eder, L., Loo, T. *et al.* (2011) The association between environmental factors and onset of psoriatic arthritis in patients with psoriasis. *Arthritis Care Res* 63(8):1091-1097

- Elder, J. T., Nair, R. P., Guo, S. W., Henseler, T., Christophers, E., Voorhees, J. J. (1994) The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 130:216-224
- Enlund, F., Samuelsson, L. *et al.* (1999) Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p (HLA region), and to 17q, but not to 4q. *Hum Hered* 49(1):2-8
- Falk, E. S., Vandbakk, O. (1993) Prevalence of psoriasis in a Norwegian Lapp population. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 182:6-9
- Farber, E., Nall, L. (1998) Epidemiology: natural history and genetics, p. 107-157. *In* H.H. Roenigk Jr., H. Maibach (ed.) *Psoriasis*. Marcel Dekker, New York
- Ferrandiz, C., Bordas, X., Garcia-Patos, V. *et al.* (2001) Prevalence of psoriasis in Spain (Epiderma Project: phase I). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15:20-23
- Foerster, J., Nolte, I. *et al.* (2004) Evaluation of the IRF-2 gene as a candidate for PSORS3. *J Invest Dermatol* 122(1): 61-64
- Fortune, D. G., Richards, H. L., Kirby, B. *et al.* (2002) A cognitive-behavioural symptom management programme as an adjunct in psoriasis therapy. *Br J Dermatol* 1406:458-465
- Gelfand, J. M., Weinstein, R., Porter, S. B. *et al.* (2005b) Prevalence and treatment of psoriasis in the United Kingdom—a population-based study. *Arch Dermatol* 141:1537-1541
- Gladman, D. D., Anhorn, K. A. *et al.* (1986) HLA antigens in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 13:586-592
- Gonzalez, S., Martinez-Borra, J. *et al.* (2000) The OTF3 gene polymorphism confers susceptibility to psoriasis independent of the association of HLA-Cw\*0602. *J Invest Dermatol* 115:824-828
- Griffiths, C. E. M., Christophers, E., Barker, J. N. W. N. *et al.* (2007) A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol* 156:258-262

- Grove, M. L., Yu, B. *et al.* (2013) Best practices and joint calling of the HumanExome BeadChip: the CHARGE Consortium. *PLoS One* 8(7):1-7
- Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Sigmundsdottir, H. *et al.* (2004) Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 135:1-8
- Gudjonsson, J. E., A. Karason *et al.* (2006) Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw\*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 148(2):233-235
- Gudjonsson, J. E., Thorarinsson, A. M. *et al.* (2003) Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study. *Br J Dermatol* 149:530-534
- Helms, C., Cao, L. *et al.* (2003) A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet* 35(4):349-356
- Henseler, T., Christophers, E. (1985) Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13:450-456
- Hensen, P., Windemuth, C., Hüffmeier, U., Rüschenndorf, F., Stadelmann, A., Hoppe, V. *et al.* (2003) Association scan of the novel psoriasis susceptibility region on chromosome 19: Evidence for both susceptible and protective loci. *Exp Dermatol* 12:490–496
- Hewett, D., Samuelsson, L. *et al.* (2002) Identification of a psoriasis susceptibility candidate gene by linkage disequilibrium mapping with a localized single nucleotide polymorphism map. *Genomics* 79(3):305-134
- Higa-Sansone, G., Szomstein, S. *et al.* (2004) Psoriasis remission after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg* 14(8):1132-4
- Holm, S. J., Carlen L. M. *et al.* (2003) Polymorphisms in the SEEK1 and SPR1 genes on 6p21.3 associate with psoriasis in the Swedish population. *Exp Dermatol* 12:435-444

- Holm, S. J., Sanchez, F. *et al.* (2005) HLA-Cw\*0602 associates more strongly to psoriasis in the Swedish population than variants of the novel 6p21.3 gene PSORS1c3. *Acta Derm Venereol* 85:2-8
- Holzmann, H., Werner, R. J. *et al.* (1992) Detection of the Kobner phenomenon of the skeleton of patients with psoriasis. *Hautarzt* 43(10):645-651
- Huffmeier, U., Lascorz, J. *et al.* (2005) Systematic linkage disequilibrium analysis of SLC12A8 at PSORS5 confirms a role in susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 125(5):906-12
- Ishira, M., Yamagata, N., Ohno, S. *et al.* (1996) Genetic polymorphisms in the keratin-like S gene within the human major histocompatibility complex and association analysis on the susceptibility to psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 48:182-186
- Javitz, H. S., Ward, M. M., Farber, E. *et al.* (2002) The direct cost of care for psoriasis and psoriatic arthritis in the United States. *J Am Acad Dermatol* 46:850–860
- Jin, Y., Yang, S. *et al.* (2009) Combined effects of HLA-Cw6 and cigarette smoking in psoriasis vulgaris: a hospital-based case-control study in China. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23:132-137
- Karvonen, S. L. (2010) Psoriaas, p. 149-162. *In* M. Hannuksela, J. Karvonen, T. Reunala, R. Suhonen (ed.) *Nahahaigused*. Medicina, Tallinn
- Kawada, A., Tezuka, T., Nakamizo, Y., Kimura, H., Nakagawa, H., Ohkido, M., *et al.* (2003) A survey of psoriasis patients in Japan from 1982 to 2001. *J Dermatol Sci* 31(1):59–64
- Kingo, K. (2005) The interleukin-10 family cytokines gene polymorphisms in plaque psoriasis. *Dis Med Universitas Tartuensis* 1:1-75
- Krishnamurthy, K., Walker, A., Gropper, C. A., Hoffman, C. (2010) To treat or not to treat? Management of guttate psoriasis and pityriasis rosea in patients with evidence of group A streptococcal infection. *J Drugs Dermatol* 9(3):241–250

- Noah, P. W. (1990) The role of microorganisms in psoriasis. *Semin Dermatol* 9(4):269-76
- Kruglyak, L. (1999) Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22:139-144
- Kurd, S. K., Gelfand, J. M. (2009) The prevalence of previously diagnosed and undiagnosed psoriasis in US adults: results from NHANES 2003- 2004. *J Am Acad Dermatol* 60:218–24
- Langley, R. G., Krueger, G. G., Griffiths, C. E. (2005) Psoriasis: Epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64:18–23
- Lee, Y. A., Ruschendorf, F. *et al.* (2000) Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet* 67(4):1020-1024
- Levine, D., Gottlieb, A. (2009) Evaluation and management of psoriasis: an internist's guide. *Med Clin North Am* 93(6):1291–303
- Lebwohl, M. (2003) Psoriasis. *Lancet* 361(9364):1197-1204
- Li, C., Wang, G. *et al.* (2007) TNF-alpha gene promoter -238G>A and -308G>A polymorphisms alter risk of psoriasis vulgaris: a meta-analysis. *J Invest Dermatol* 127:1886-1892
- Liu, Y., Helms, C. *et al.* (2008) A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* 28(4):1-14
- Mallbris, L., Larsson, P. *et al.* (2005) Psoriasis phenotype at disease onset: clinical characterization of 400 adult cases. *J Invest Dermatol* 124(3):499-504
- Martin, G., Guerard, S., Fortin, M. M. *et al.* (2012) Pathological crosstalk in vitro between T lymphocytes and lesional ker- atinocytes in psoriasis: necessity of direct cell-to-cell contact. *Laboratory Investigation* 92(7):1058-1070

- Matthews, D., Fry, L. *et al.* (1996) Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet* 14(2):231-233
- Menter, A., Stoff, B. 2010. Therapy, p. 81-114. *In* S. Bond (ed.), *Psoriasis*, 2<sup>nd</sup> ed., Manson Publishing Ltd, London
- Mrowietz, U., Kragballe, K., Reich, K. *et al.* (2011) Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Archives of Dermatological Research* 303(1):1–10
- Nair, R. P., Henseler, T. *et al.* (1997) Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* 6(8):1349-1356
- Nair, R. P., Duffin, K. C. *et al.* (2009) Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* 41:199-204
- Naldi, L., Chatenoud, L. *et al.* (2005) Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study. *J Invest Dermatol* 125(1):61-67
- Naldi, L., Peli, L., Parazzini, F., Carrel, C. F. (2001) Family history of psoriasis, stressful life events, and recent infectious disease are risk factors for a first episode of acute guttate psoriasis: results of a case–control study. *J Am Acad Dermatol* 44(3):433–438
- Nevitt, G. J. and Hutchinson, P. E. (1996) Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 135(4):533-537
- Nickoloff, B. J., Nestle, F. O. (2004) Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113:1664-1675
- O'Brien, M. and Koo, J. (2006) The mechanism of lithium and beta-blocking agents in inducing and exacerbating psoriasis. *J Drugs Dermatol* 5(5):426-432



- Orrú, S., Giuressi, E., Carcassi, C., Casula, M., Contu, L. (2005) Mapping of the major psoriasis-susceptibility locus (PSORS1) in a 70-Kb interval around the corneodesmosin gene (CDSN). *Am J Hum Genet* 76:164–171
- Panko, J., Schrodi, S. *et al.* (2005) Characterizing susceptibility to phenotypic variations of psoriasis by comparing allelic association signals on chromosome 6. *Gen Clin Conf*
- Parisi, R., Symmons, D. P. M., Griffiths, C. E. M., Ashcroft, D. M. (2013) Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Investig Dermatol* 133:377-385
- Patel, R. V., Weinberg, J. M. (2008) Psoriasis in the patient with human immunodeficiency virus, part 1: review of pathogenesis. *Cutis* 82:117-122
- Pattison, E., Harrison, B. J. *et al.* (2008) Environmental risk factors for the development of psoriatic arthritis: results from a case-control study. *Ann Rheum Dis* 67:672-676
- Rahman, P., Elder, J. T. (2005) Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 64(2):37-41
- Rahman, P., Roslin, N. M. *et al.* (2011) High resolution mapping in the major histocompatibility complex region identifies multiple independent novel loci for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 70:690-694
- Rahman, P., Siannis, F. *et al.* (2006) TNF-alpha polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:919-923
- Raychaudhuri, S. K., Mavarakis, E., Raychaudhuri, S. P. (2014) Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity Reviews* 13(4-5):490-495
- Raychaudhuri, S. P., Gross, J. (2000) A comparative study of pediatric onset psoriasis with adult onset psoriasis. *Pediatr Dermatol* 17(3):174–178

Reich, K., Hüffmeier, U. *et al.* (2007) TNF polymorphisms in psoriasis: association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF\*-857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis Rheum* 56:2056-2064

Risch, N. (1990) Linkage strategies for genetically complex traits I. Multilocus models. *Am J Hum Genet* 46:222-228

Risch, N., Merikangas, K. (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517

Rätsep, R. (2010) Genetics of psoriasis and vitiligo, focus on IL10 family cytokines. *Dis Neur Universitas Tartuensis* 1:1-64

Sagoo, G. S., Tazi-Ahnini, R. *et al.* (2004) Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J Invest Dermatol* 122(6):1401-1405

Seminara, N. M., Abuabara, K., Shin, D. B. *et al.* (2011) Validity of The Health Improvement Network (THIN) for the study of psoriasis. *Br J Dermatol* 164:602–609

Setty, A. R., Curhan, G., Choi, H. K. (2007a) Smoking and the risk of psoriasis in women: Nurses' Health Study II. *Am J Med* 120:953-959

Setty, A. R., Curhan, G., Choi, H. K. (2007b) Obesity, waist circumference, weight change, and the risk of psoriasis in women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med* 167:1670-1675

Sijde, M. R., Ng, A., Fu, J. (2014) Systems genetics: From GWAS to disease pathways. *Biochim Biophys Acta* 14:1-7

Simpson, C. R., Anderson W. J. A., Helms, P. J. *et al.* (2002) Coincidence of immune-mediated diseases driven by Th1 and Th2 subsets suggests a common aetiology. A population-based study using computerized general practice data. *Clin Exp Allergy* 32:37–42

- Stern, R. S., Nijsten, T., Feldman, S. R. *et al.* (2004) Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J Investig Dermatol Symp Proc* 9:136–139
- Sterry, W., Strober, B. E. *et al.* (2007) Obesity in psoriasis: the metabolic, clinical and therapeutic implications. Report of an interdisciplinary conference and review. *Br J Dermatol* 157(4):649-655
- Strange, A., Capon, F. *et al.* (2010) A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet* 42:985-990
- Stuart, P. E., Nair, R. P. *et al.* (2010) Genome-wide association analysis identifies three psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 42:1000-1004
- Sun, C., Mathur, P. *et al.* (2006) Peptidoglycan recognition proteins Pglyrp3 and Pglyrp4 are encoded from the epidermal differentiation complex and are candidate genes for the Psors4 locus on chromosome 1q21. *Hum Genet* 119(1-2):113-125
- Teraoka, Y., Naruse, T. K., Oka, A. *et al.* (2000) Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association of psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 55:206–211
- Tiilikainen, A., Lassus, A. *et al.* (1980) Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 102(2):179-184
- Tomfohrde J., Silverman, A. *et al.* (1994) Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264(5162): 1141-1145
- Trembath R. C., Clough, R. L. *et al.* (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6(5): 813-820
- Tsai, T. F., Wang, T. S., Hung, S. T. *et al.* (2011) Epidemiology and comorbidities of psoriasis patients in a national database in Taiwan. *J Dermatol Sci* 63:40–46

- Veal, C. D., Capon, F., Allen, M. H. *et al.* (2002) Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at *PSORS1*, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 71:554–564
- Veal, C. D., Clough, R. L. *et al.* (2001) Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between *PSORS1* and candidate loci. *J Med Genet* 38(1):7-13
- Vladimarsson, H., Baker, B. S., Jonsdottir, I. *et al.* (1995) Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 16:145-149
- Waldman, A., Gilhar, A. *et al.* (2001) Incidence of *Candida* in psoriasis--a study on the fungal flora of psoriatic patients. *Mycoses* 44(3-4):77-81
- Weisenseel, P., Laumbacher, B. *et al.* (2002) Streptococcal infection distinguishes different types of psoriasis. *J Med Genet* 39(10):767-768
- Wolf, R., Schiavo, A. L. *et al.* (1997) The in vitro effect of hydroxychloroquine on skin morphology and transglutaminase. *Int J Dermatol* 36(9):704-707
- Yan, K. L., Huang, W. *et al.* (2007) Follow-up analysis of *PSORS9* in 151 Chinese families confirmed the linkage to 4q31-32 and refined the evidence to the families of early-onset psoriasis. *J Invest Dermatol* 127(2):312-318
- Zenz, R., Eferl, R. *et al.* (2005) Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* 437(7057): 369-375
- Zhang, X. J., He, P. P. *et al.* (2002) Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(*PSORS1*) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese hans. *J Invest Dermatol* 119(6):1361-1366
- Zhang, X. J., Huang, W. *et al.* (2009) Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within *LCE* gene cluster at 1q21. *Nat Genet* 41:205-210
- Zhao, Y. E., Ma, J. X. *et al.* (2013) Meta-analysis of the association between psoriasis and human leukocyte antigen-B. *Br J Dermatol* 169(2):417-427

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.epsol.ee/?doc=40>

<http://genome-euro.ucsc.edu/>

[http://genome.sph.umich.edu/wiki/Exome\\_Chip\\_Design](http://genome.sph.umich.edu/wiki/Exome_Chip_Design)

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

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

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina            Riho Rokk  
                  (*autori nimi*)  
(sünnikuupäev: 29.06.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Psoriaasi assotsiatsiooniuring eksoomikiibi andmete põhjal,

mille juhendaja on Evelin Mihailov ja Tiit Nikopensius,

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

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

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

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

Tartus, 26.05.2014