

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristel Vabrit

**Võimalikud seosed tsütokiinide interleukiin 20 ja
interleukiin 24 geenide polümorfismide ja naastulise
psoriaasi kujunemise vahel**

Magistritöö

Juhendajad: vanemteadur Sulev Kõks, Ph.D,
dotsent Ants Kurg, Ph.D

TARTU
2005

SISUKORD

SISUKORD.....	2
LÜHENDID JA MÕISTED.....	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Komplekshaigused.....	5
1.1.1 Komplekshaiguste kaardistamise strateegiad	7
1.2 SNP-d ehk ühenukleotiidsed polümorfismid	8
1.2.1 SNP-de kasutamine assotsiatsiooniuuringutes.....	11
1.3 Ahelduse tasakaalustamatus ja haplotüübikaardid.....	12
1.4 Psoriaas	15
1.4.1 Psoriaasi patogenees	18
1.4.2 Psoriaasiga seotud kandidaatgeenid.....	19
1.5 Interleukiin 24.....	22
2. TÖÖ EESMÄRGID	24
3. MATERJAL JA METOODIKA	25
3.1 Uuringus osalenud indiviidid.....	25
3.2 DNA proovid	27
3.3 SNP-de valik	27
3.4 Polümorfismide genotüpeerimine.....	27
3.4.1 Tetra-praimer ARMS-PCR-i reaktsioon.....	29
3.5 Statistiline analüüs	30
4. TULEMUSED	32
5. ARUTELU.....	41
5.1 Uuringurühmad	41
5.2 Assotsiatsioonianalüüs IL-24 geeni SNP-dega.....	42
5.3 Haplotüübianalüüs	44
5.3.1 IL-24 geeni haplotüübianalüüs	44
5.3.2 Laiendatud haplotüübianalüüs	45
KOKKUVÕTE	48
SUMMARY	49
TÄNUAVALDUSED	51
VIITED	52
Avaldatud artikli äratrükk	58
Lisad	

LÜHENDID JA MÕISTED

ARMS-PCR	<i>amplification refractory mutation system polymerase chain reaction</i>
bp	aluspaar
CDSN	korneodesmosiin (<i>corneodesmosin</i>)
D'	standardiseeritud LD koefitsient D
dNTP	desoksünukleosiidtrifosfaat
HCR	<i>alpha-helix coiled-coil-rod</i> homoloog
HIV 1	inimese immuunpuudulikkuse viirus 1 (<i>human immunodeficiency virus 1</i>)
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HT	haplotüüp
H-W	Hardy-Weinberg
IFN- γ	interferoon gamma
IL	interleukiin
kb	tuhat aluspaari
LD	ahelduse tasakaalustamatus (<i>linkage disequilibrium</i>)
MDA-7	melanoomi diferentseerumisega assotsieerunud geen 7 (<i>melanoma differentiation-associated gene 7</i>)
MHC	peamine koesobivuskompleks (<i>major histocompatibility complex</i>)
OR	riskifaktor (<i>odds ratio</i>)
p	kromosoomi lühike õlg
P	väärtus, mis näitab saadud tulemuste juhuslikkuse tõenäosust
PASI	<i>psoriasis area and severity index</i>
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
PSORS	<i>psoriasis susceptibility</i>
q	kromosoomi pikk õlg
SNP	ühenukleotiidne polümorfism (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPR 1	<i>small proline rich 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> 'e DNA polümeraas
TCF19	transkriptsioonifaktor 19
TDT	<i>transmission/disequilibrium test</i>
Th	T-helper
TNF- α	tuumori nekroosifaktor alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
U	ühik
UTR	mittetransleeritav regioon (<i>untranslated region</i>)

SISSEJUHATUS

Naastuline psoriaas ehk soomussammaspool on levinud krooniline põletikuline nahahaigus, mille esinemissagedus üldpopulatsioonis on 2-3%. Naastulise psoriaasi kujunemise täpne põhjus ei ole teada, kuid antud haigus klassifitseeritakse multifaktoriaalsete haiguste alla, mille puhul on haigusfenotüübi tekkeks olulised nii geneetiline eelsoodumus kui keskkonnafaktorid. Praegusel hetkel peetakse naastulist psoriaasi autoimmuunhaiguseks, kus peamist rolli mängivad nahas paiknevate T-rakkude poolt vabastatud tsütokiinid ja kemokiinid. Umbes 10-30% naastulise psoriaasi patsientidest kaasneb ka küünte düstroofia ja psoriaatiline liigesepõletik. Erinevate kliiniliste nähtude tõttu võib naastuline psoriaas sageli osutuda enamaks kui lihtsalt dermatoloogiliseks probleemiks – haigus võib hakata segama selliseid tavalisi igapäevatoiminguid nagu käte kasutamine töös, kõndimine, magamine.

Järjest enam on saadud tõendeid selle kohta, et interleukiin 10 (IL-10) perekonda kuuluvad tsütokiinid interleukiin 10 (IL-10) ja tema homoloogid interleukiin 19 (IL-19), interleukiin 20 (IL-20) ja interleukiin 24 (IL-24) omavad funktsioone epidermise talitlemisel ja psoriaasi kujunemisel. IL-24 geenis olevaid polümorfisme ei ole seni komplekshaigustega seoses uuritud. Käesoleva töö eesmärgiks oli läbi viia *case-control* (juht-kontroll) assotsiatsiooniuring Eesti populatsioonis, et leida võimalikke seoseid IL-24 geeni polümorfismide ning naastulise psoriaasi kujunemise vahel. Samuti kirjeldada LD mustrit IL-20 ja IL-24 geenide piirkonnas ning leida võimalikud haplotüüp-fenotüüp assotsiatsioonid.

Käesolev magistritöö on valminud TÜ Arstiteaduskonna Füsioloogia Instituudis koostöös TÜ Nahahaiguste Kliinikuga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Komplekshaigused

Geneetilised faktorid mõjutavad suuremal või väiksemal määral kõiki inimese haigusi, kas põhjustades vastuvõtlikkust haigusele, resistentsust, mõjutades koostoimet keskkonnateguritega või põhjustades haigusfenotüüpi otseselt (Collins *et al.*, 1997).

Pärilikud haigused võib tinglikult jagada kaheks: monogeensed haigused ja komplekshaigused. Monogeensed haigused päranduvad perekonnas Mendeli seaduste alusel, kusjuures ühe teatud geeni lookuses olev mutatsioon on piisav, et põhjustada vastav haigusfenotüüp (Lander & Schork, 1994; Glatt & Freimer, 2002). Monogeenseid haigusi põhjustavate alleelide esinemissagedus on populatsioonis väike, kuna sellised alleelid põhjustavad tõsiseid muutusi fenotüübis (Tabor *et al.*, 2002) ning kõrvaldatakse kiiresti populatsioonist (Chakravarti, 1999). Enamus monogeenseid haigusi põhjustavatest alleelidest on populatsioonis hiljuti tekkinud (mitte rohkem kui 2000 aastat tagasi) ning on sageli mõne etnilise grupi spetsiifilised (Thompson & Neel, 1997; Chakravarti, 1999).

Komplekshaiguste puhul ei ole päritavuse alused selged, kuna geneetilise markeri ja haigusfenotüübi vahel puudub üks-ühene suhe (Lander & Schork, 1994; Glatt & Freimer, 2002). Komplekshaiguste fenotüüp on paljude erinevate geenide alleelide ja nende poolt põhjustatud efektide summaarne tagajärg (Risch, 2000; Glatt & Freimer, 2002). Enamus komplekshaigusi põhjustavaid geenide variante pärandub üksteisest sõltumatult ning võrreldes monogeensete haigustega on nende variantide üksikmõju komplekshaiguse avaldumisele väike (Glatt & Freimer, 2002). Kuigi efekt on väike, on nende individuaalse riski osakaal (päritavuse võimalus) siiski suur sagedase esinemise tõttu üldpopulatsioonis (Risch & Merikangas, 1996). Geneetilise mudeli kohaselt kujuneb haigustunnus välja siis, kui eelsoodumus antud haigusele (kombineerudes etioloogiliste faktoritega) ületab teatud bioloogilise riski läve. Enamasti on tunnuse kandjad pärinud nn. kõrget haigusrisi kandvate (*high-susceptibility*) geenide kombinatsioonid (Chakravarti, 1999). Lisaks alleelide

kombinatsioonile mõjutavad haiguse avaldumist väiksemal või suuremal määral ka keskkonnategurid (Brookes, 1999).

Komplekshaigusega seotud alleelide sagedus on populatsioonis kõrge, kuna haigusalleel pole letaalne, vaid annab ainult soodumuse teatud tingimustes vastava fenotüübi kujunemiseks. Seetõttu alleeli populatsioonis ei elimineerita ning haigust soodustavat alleeli võivad kanda nii terved kui haiged (Lander & Schork, 1994). Komplekshaigustega seotud alleelid on päritolult vanad (10 000 aastat ja vanemad) ning esinevad erineva sagedusega enamasti kõigis etnilistes gruppides (Thompson & Neel, 1997; Chakravarti, 1999).

Komplekshaigusi iseloomustavad polügeenne päritavus (haigusfenotüübi kujunemiseks kombineeruvad teatud alleelid üheaegselt erinevates geenides), fenokoopiad (haigus võib avalduda ilma eelsoodumust põhjustavaid allelele pärimata, keskkonnategurite mõjul või juhuslikel põhjustel), geneetiline heterogeensus (erinevad mutatsioonid erinevates geenides erinevatel indiviididel võivad põhjustada sama haigusfenotüübi või sama genotüüp võib erinevatel indiviididel põhjustada erinevaid haigusfenotüüpe) ja mittetäielik penetrantsus (eelsoodumust põhjustava alleeli pärinud indiviidil ei pruugi haigus avalduda) (Lander & Schork, 1994).

Komplekshaigusi iseloomustavad üldiselt kaks vastandlikku mudelit. Piiratud polümorfismi mudeli (*restricted polymorphism model*) järgi on tavalisi levinud polümorfseid haigusalleele (esinemissagedusega üle 1%) suhteliselt vähe ning need alleelid moodustavad limiteeritud arvu lookuste alleelide spetsiifilise alarühma. Multiekvivalentse riski mudel (*multi-equivalent risk model*) eeldab, et esineb suur arv riskialleele suurest hulgast lookustest. Nende alleelide mõju haiguse kujunemisele võib varieeruda, kuid riskialleelide hulkas on ka palju selliseid allelele, millel on samaväärne efekt fenotüübile. Viimase mudeli järgi on riskialleelide esinemissagedus populatsioonis madal – alla 1%. Mõlema mudeli puhul sama lookuse erinevad alleelid võivad suurendada või vähendada riski komplekshaigusele, olles seega aluseks keerulisele komplekshaiguste geneetikale (Bickeboller *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1999).

Paljud geenid, mis põhjustavad monogeenseid haigusi, identifitseeriti juba eelmisel kahel kümnendil, kasutades aheldusanalüüsi ja positsioonilist kloneerimist. Nende meetoditega komplekshaiguste kaardistamisi edu saatnud ei ole, kuna komplekshaiguste geneetiline taust on liiga keerukas (Tabor *et al.*, 2002). Siiski on

komplekshaiguste sageda esinemise tõttu tähtis nende geneetiline kaardistamine, mis parandaks oluliselt nii haiguste diagnoosimise, profülaktika kui ravi võimalusi.

1.1.1 Komplekshaiguste kaardistamise strateegiad

Komplekshaiguste kaardistamisel on kaks peamist strateegiat: aheldusanalüüs (*linkage analysis*) ning assotsiatsiooniuuring (*association study*).

Aheldusanalüüsil jälgitakse kandidaatmarkeri(te)ga kromosoomiregiooni koospärandumist haigusega perekonnasiseselt (Kruglyak, 1999). Assotsiatsiooniuuringud võrdlevad geneetilis(t)e markeri(te) alleelisagedus(t)e erinevusi haigusfenotüübiga indiviidide (kes ei pea olema suguluses) ning kontrollindiviidide vahel. Assotsiatsiooniuuringud põhinevad hüpoteesil, et geneetilise markeri ühe alleeli (või teatud genotüübi) kõrgem esinemissagedus patsientidel peegeldab seost haigusfenotüübi ning antud alleeli (genotüübi) vahel (Collins *et al.*, 1997; Kruglyak, 1999).

Aheldusanalüüs sobib kõige paremini monogeensete ehk mendeliaarselt päranduvate haiguste uurimiseks (Lander & Schork, 1994). Nimetatud meetod võimaldab edukalt leida selliseid allelele, mis on peamised haigusfenotüübi põhjustajad, kuid jääb fenotüübi suhtes väiksemat efekti omavate alleelide detekteerimisel nõrgaks. Alleele, mida ei ole võimalik identifitseerida aheldusanalüüsil, saab kindlaks teha assotsiatsiooniuuringutega, kuna viimane meetod on võimsam (Risch & Merikangas, 1996). Aheldusanalüüsi puuduseks on ka see, et vajatakse suurt hulka geneetilisi andmeid ühe suguvõsa lõikes, mida on raske koguda (Isaksson *et al.*, 2000).

Assotsiatsiooniuuringu tulemuste usaldusväärsus sõltub patsientide ja kontrollindiviidide üldise geneetilise tausta kattuvusest (Brookes, 1999). Üldiselt peaksid patsiendid ning kontrollindiviidid oma geneetiliselt taustalt ühe populatsiooni lõikes olema “identsed”, erinedes vaid haigusfenotüübi suhtes (Sullivan *et al.*, 2001). Kui ühes populatsioonis ei ole indiviidid oma üldise geneetilise tausta poolest sarnased, siis on antud populatsioon kihistunud. Enamasti on see tingitud erinevate etniliste gruppide olemasolust populatsioonis. Populatsiooni kihistumise probleemi assotsiatsiooniuuringutel aitavad vältida transmissiooni tasakaalustamatuse test (*Transmission Disequilibrium Test*; võrdleb, kui mitu korda sagedamini toimub

markeri ülekandumine *versus* mitte-ülekandumine heterosügootselt vanemalt haigusfenotüübiga lapsele) ja perekonnauuringutel põhinevad alternatiivmeetodid nagu haplotüübi relatiivse riski meetod (*Haplotype Relative Risk method*; vanemate mitteülekantud alleelid paigutatakse kontrollrühma) (Brookes, 1999; Burmeister, 1999).

1.2 SNP-d ehk ühenukleotiidsed polümorfismid

Kõige traditsioonilisema definitsiooni järgi loetakse SNP-ks (*single nucleotide polymorphism*) ühealuspaarilist genoomi järjestuse variatsiooni, mille harvemini esineva alleeli esinemissagedus populatsioonis peab olema vähemalt 1% või rohkem. Ühenukleotiidilisi insertioone ja deletsioone ei loeta SNP-de hulka ning alleele esinemissagedusega <1% nimetatakse harvadeks variantideks, mitte SNP alleelideks (Brookes, 1999; Brookes, 2003). Tavaliseks ehk levinuks (*common*) loetakse SNP-d, mille minoorse alleeli sagedus populatsioonis on >15% (De La Vega *et al.*, 2002).

SNP-d on indiviididevaheliste päritavate erinevuste ja fenotüübiliste variatsioonide aluseks. SNP-d mõjutavad indiviidi antropomeetrilisi omadusi, riski haigustele ja vastust keskkonna mõjudele (Kruglyak & Nickerson, 2001; Sachidanandam *et al.*, 2001).

SNP-d on kõige sagedasemad geneetilised markerid inimese genoomis – kõigist polümorfismidest moodustavad 90% ühenukleotiidsed polümorfismid (Brookes, 2003). Hetkel teadaolevate SNP-de keskmine esinemissagedus inimgenoomis on umbes 1/190 nukleotiidi kohta, võrreldes mitut indiviidi ning 1/1000 nukleotiidi kohta, võrreldes kahte homoloogset kromosoomi (Tabor *et al.*, 2002). Tegelik SNP-de esinemissagedus on aga eeldatavalt tunduvalt suurem (Tabel 1).

Tabel 1. Eeldatav SNP-de esinemissagedus inimpopulatsioonis (Kruglyak & Nickerson, 2001)

Minoorse alleeli esinemissagedus	Oodatav SNP-de arv (milj)	Oodatav SNP-de esinemissagedus (SNP/bp)
1%	11	1/290
5%	7,1	1/450
10%	5,3	1/600
20%	3,3	1/960
30%	2,0	1/1570
40%	0,97	1/3280

SNP-d võivad olla nii bi-, tri- kui tetra-alleelsed polümorfismid, kuid viimaseid esineb inimestel äärmiselt harva (<0,1% SNP-dest on trialleelsed) (Lai, 2001) ning seetõttu nimetatakse SNP-sid ka lihtsalt bialleelseteks markeriteks. Bialleelsed SNP-d koosnevad neljast põhilisest tüübist: ühest transitsioonist $C \rightleftharpoons T$ ($G \rightleftharpoons A$) ja kolmest transversioonist $C \rightleftharpoons A$ ($G \rightleftharpoons T$), $C \rightleftharpoons G$ ($G \rightleftharpoons C$) ja $T \rightleftharpoons A$ ($A \rightleftharpoons T$). Neist kõige sagedamini (umbes 2/3) esineb $C \rightleftharpoons T$ ($G \rightleftharpoons A$) polümorfism. Mainitud polümorfismi kõrgem esinemissagedus võib osaliselt olla seotud 5-metüülsütsosiini deamineerimisreaktsiooniga, mis esineb CpG-saartes. Sellest tingituna esineb $C \rightleftharpoons T$ ($G \rightleftharpoons A$) polümorfism rohkem geenisisestes alades ja GC-rikastes isokoorides, mistõttu seostatakse seda ka enam haiguste tekkega (Brookes, 1999; Brookes, 2003). Transversioonide puhul ei ole teada järjestuse konteksti või läheduses paiknevate nukleotiidide mõju polümorfismi tekkele (Zhao & Boerwinkle, 2002).

SNP-d mittekodeerivates regioonides ning sünonüümsed SNP-d (ei muuda aminohapet) on enam levinud kui mittesünonüümseid muutusi (muudavad aminohapet) põhjustavad SNP-d, mis peegeldab ühtlasi suuremat selektiivset survet kodeerivatele järjestustele (Nowotny *et al.*, 2001; Tabor *et al.*, 2002). *Nonsense* mutatsioonide väike osakaal eksonites võib osutada nende suhtes esinevale puhastavale selektsioonile. Selline SNP-de jaotuvus inimgenoomis toetab Motoo Kimura molekulaarse evolutsiooni neutraalsuse teooriat (Tabel 2) (Zhao *et al.*, 2003).

Tabel 2. Hetkel teadaolevate SNP-de jaotuvus genoomis (Zhao *et al.*, 2003).

Geenide vahelistes alades	69,05%	intronites	95,96%
Geenide sisestes alades	30,95%	eksonites	2,45% (<i>nonsense</i> 1,43%)
		5'UTR	0,27%
		3'UTR	1,31%

Keskmiselt 22,59 SNP-d geeni kohta, 50,38 SNP-d 2 geeni vahelise ala kohta

On näidatud, et enamus SNP-sid (umbes 85%) on levinud kõigis inimpopulatsioonides (erinevate alleelisagedustega) ja vaid 15% on populatsioonispetsiifilised ehk “-privaatsed” (Barbujani *et al.*, 1997). Arvatakse, et enamus praegustest neutraalsetest polümorfismidest inimpopulatsioonis on vähem kui 800 000 aastat vanad (40 000 generatsiooni) (Hacia *et al.*, 1999) ning haruldased variandid arvatakse olevat < 300 generatsiooni (6000 aastat) vanad (Wright *et al.*, 1999). See viitab asjaolule, et sagedasti esinevad SNP-d on ilmselt tekkinud enne inimpopulatsioonide diferentseerumist ning harva esinevad SNP-d on tekkinud hiljem, olles nõ populatsioonispetsiifilised (Hacia *et al.*, 1999; Halushka *et al.*, 1999). Seda, et sagedasemad SNP-d on vanemad, kinnitab ka sagedamini esinenud markerite ühtivus šimpansi markeritega. Seega on harvemini esinevad markerid ülitundlikud näitajad nüüdisaegsest migratsioonist ja erinevate populatsioonide segunemisest (Stephens *et al.*, 2001).

SNP markerid on populaarsed laiaulatuslike geneetiliste analüüside läbiviimisel, kuna nende esinemissagedus genoomis on suur, paiknedes nii kodeerivates kui mittekodeerivates järjestustes, huvipakkuvas lookuses või selle lähedal (Landegren *et al.*, 1998; Brookes, 1999). Mõned geenides paiknevad SNP-d mõjutavad otseselt valkude struktuure või ekspressioonitaset ning seetõttu peegeldavad muutusi haiguste geneetilistes mehhanismides (Landegren *et al.*, 1998). SNP-de mutatsioonikiirus on madal (ligikaudu 2×10^{-8} asendust nukleotiidi kohta põlvkonnas) (Kruglyak & Nickerson, 2001), muutes nad stabiilseks ning stabiilselt päritavateks ning SNP-de analüüsimiseks saab kasutada kaasaegseid mikrobiotehnoloogial põhinevaid genotüpeerimismeetodeid, mis võimaldavad teostada kiiret ja täpset detekteerimist ning automatiseeritud tulemuste analüüsi (Landegren *et al.*, 1998; Brookes, 1999).

1.2.1 SNP-de kasutamine assotsiatsiooniuuringutes

Inimese genoomi SNP kaardid (täpsemalt *simple nucleotide polymorphism* kaardid, kus lisaks ühenukleotiidilistele asendustele uuritakse ka lühikesi deletsioone ja insertsioone) koos genotüpeerimismeetoditega võimaldavad uurida geneetilisi komplekstunnuseid, nagu multifaktoriaalsed haigused (Halushka *et al.*, 1999; Risch, 2000). Kuna enamus komplekshaiguste geneetilisi determinante on ühenukleotiidsed polümorfismid, siis on just need markerid hetkel kõige levinumad multifaktoriaalsete haiguste uurimiseks ning nendega seotud kromosoomilookuste kaardistamiseks (Collins *et al.*, 1999). Varem uuriti peamiselt mikrosatelliitmarkeritel põhinevat assotsiatsiooni, kuid mikrosatelliitidel põhinevad genoomikaardid jäävad liiga hajusaks ning mikrosatelliitide mutatsioonikiirus on suurem kui SNP-del (Chakravarti, 1999; Collins *et al.*, 1999).

Assotsiatsiooniuuringutesse ei ole enamasti otstarbekas valida kõiki SNP-sid terve genoomist, et leida assotsiatsiooni fenotüübiga. Oluline on valida optimaalne hulk SNP-sid konkreetsest kandidaatgeenist või selle ümbrusest. Teoreetiliselt peaks analüüsima vaid selliseid SNP-sid, mis mõjutaksid valgu funktsiooni või ekspressiooni, kuna need põhjustavad suure tõenäosusega muutuse fenotüübis, kuid praktiliselt on selline valik raskendatud ja ka osaliselt põhjendamatu. Enamikel juhtudel ei ole SNP efekt fenotüübile teada (Tabor *et al.*, 2002). Siiski võib SNP efekti fenotüübile oletada. Mõnede SNP-de puhul on selge, et DNA variatsioon põhjustab valgu funktsiooni muutusi – näiteks SNP, mis muudab aminohapet valgu järjestuses või SNP, mis tekitab stoppkoodoni, põhjustades lühenenud valgu sünteesi. Kui DNA järjestuse variatsioon paikneb kandidaatgeeni promootori kõrgelt konserveerunud alas, siis on tõenäoline, et antud SNP põhjustab ka funktsionaalseid tagajärgi. SNP, mis asub kodeerivas alas, kuid ei põhjusta aminohappe muutust valgus või SNP, mis ei asu kodeerivas alas, võib siiski mõjutada geeni funktsiooni, muutes mRNA stabiilsust, splaissingut või lokalisatsiooni (Nowotny *et al.*, 2001; Tabor *et al.*, 2002; Cartegni *et al.*, 2002).

Sõltuvalt sellest, milliseid SNP-sid assotsiatsiooniuuringutes kasutatakse, jaotatakse kogu genoomi hõlmavad assotsiatsiooniuuringud otsesteks ja kaudseteks. Otsesel assotsiatsiooniuuringul määratakse ära SNP-d kandidaatgeenide kodeerivates ja regulaatorsetes alades ning detekteeritakse riskialleeli suurenunud esinemissagedust

haigestunud indiviididel. Assotsiatsioon haigusfenotüübi ja markeri vahel on seda tugevam, mida kõrgem on alleeli esinemissagedus haigetel (Collins *et al.*, 1997; Kruglyak, 1999).

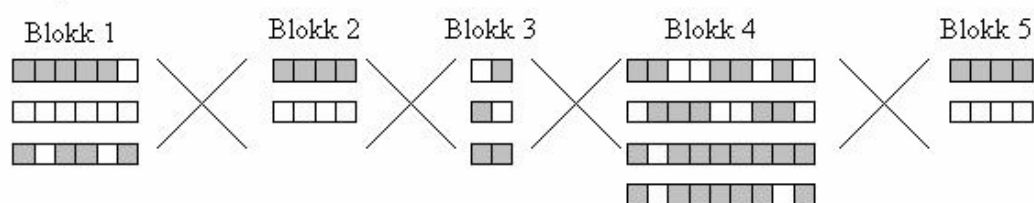
Kaudse meetodi puhul leitakse assotsiatsioon haiguse ning neutraalsete polümorfismide vahel, mis paiknevad riskialleeli läheduses nii kodeerivates kui mittekodeerivates alades (Collins *et al.*, 1997; Kruglyak, 1999). See meetod on võimalik genoomis esineva ahelduse tasakaalustamatuse tõttu, mille puhul riskialleel ja selle läheduses asuvad teatud SNP variandid päranduvad väga suure tõenäosusega koos (Collins *et al.*, 1997; Kruglyak, 1999). Alternatiivne lähenemine kaudsele strateegiale on kasutada SNP markereid kandidaatgeenides, nende läheduses või genoomsetes kandidaatregioonides (Syvänen, 2001; Tabor *et al.*, 2002).

1.3 Ahelduse tasakaalustamatus ja haplotüübikaardid

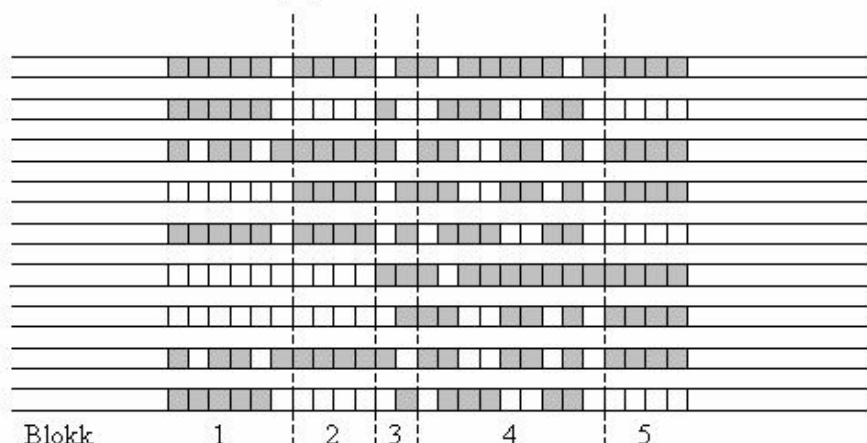
Ahelduse tasakaalustamatus (*linkage disequilibrium*; LD) esineb, kui genoomis erinevatest lookustest pärit alleelid on omavahel assotsieerunud tugevamalt kui seda võiks oodata juhuse alusel (Nowotny *et al.* 2001; Nordborg & Tavaré, 2002). LD sõltub peamiselt kahe lookuse vahelisest meiotilise rekombinatsiooni sagedusest ehk geneetilisest kaugusest ja mutatsioonikiirusest mõlemas lookuses. Mida lähemal asuvad teineteisele kaks erinevat polümorfismi, seda väiksem on nendevaheline rekombinatsiooni sagedus ja suurem tõenäosus ahelduse tasakaalustamatuse tekkeks. Genoomis esineva LD tõttu on võimalik, et kunagi minevikus tekkinud polümorfismiga koos põlvnevad ka ümbruses olevad polümorfismid, mis ühtekokku moodustavad haplotüübi (Gray *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001; Ardlie *et al.*, 2002). Teisiti – iga kromosoomi populatsioonis saab iseloomustada järjestuse variantide spetsiifilise mustri alusel, mis moodustab individuaalse haplotüübi. Kui haplotüübid ei esine populatsioonis sama sagedusega, mida võib eeldada haplotüübi üksikute komponentjärjestuste esinemissageduste põhjal, siis on vastavad haplotüübis sisalduvad järjestuse variatsioonid omavahel assotsieerunud ehk nende vahel on ahelduse tasakaalustamatus (Joonis 1). Kogu genoomi hõlmavate empiiriliste LD mustrite iseloomustamine aitab hõlbustada komplekshaigusi mõjutavate geneetiliste variantide lokaliseerimist assotsiatsioonuringutel (Dawson *et al.*, 2002). Teadlaste hulgas on levinud aramus, et assotsiatsiooni leidmine ühe haigusseoselise markeri ja

haiguse vahel ei pruugigi õnnestuda ning assotsiatsiooni tundlikuks detekteerimiseks oleks vaja laiendatud markerite haplotüüpi ehk haplotüpeerimist (Clayton & Jones; 1999; Fallin *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2002). Sellisel juhul saab kaardistada komplekstunnuseid genotüpeerides vaid tagSNP-sid (haplotüübiblokkide “esindus”-SNP-d). Oletatakse, et piisab 300 000 tagSNP-st, et kirjeldada ära kõik levinuimad haplotüübiblokkid inimgenoomis. Hetkel ongi käimas rahvusvaheline projekt, mille eesmärgiks on luua laiahaardeline inimgenoomi haplotüübikaart (*HapMap*) 300 000–1 000 000 tagSNP-ga (Gabriel *et al.*, 2002; Tsui *et al.*, 2003).

A. Haplotüübiblokkid



B. Mosaiiksed kromosoomid populatsioonis



Joonis 1. Haplotüübiblokkid (kohandatud Cardon & Abecasis, 2003 järgi). Valge ja hall ruut tähistavad kahte erinevat alleeli. **A.** Haplotüübiblokkid on levinud polümorfismidest moodustunud lühikesed segmendid genoomis, mida lahutavad rekombinatsioonipunktid (ristid blokkide vahel). Blokkide sees esineb rekombinatsiooni väga harva või üldse mitte. Ühes populatsioonis on ainult väike arv erinevaid haplotüüpe, kuna erinevate alleelide kõik kombinatsioonid ei ole LD tõttu võimalikud. **B.** Enamus populatsioonis olevatest kromosoomidest on erinevate haplotüüpide mosaiiksed järjestused.

Haplotüübiblokkide suurused (seega ka LD ulatused) on inimgenoomis väga varieeruvad – esineb blokke suurusega < 1 kb kui ka > 100 kb. Et identifitseerida kõik haplotüübiblokkid inimgenoomis, oleks vaja ühtlaselt kõrge tihedusega SNP-kaart. Minimaalne vajalik SNP tihedus oleks 1 tagSNP 10 kb kohta (kokku 300 000 tagSNP-d), rangemate hinnangute kohaselt oleks sobiv tihedus 1 tagSNP 3 kb kohta (1 000 000 tagSNP-d). On näidatud, et praegune inimgenoomi SNP-kaart ei ole piisavalt tihe, et toetada *HapMap* projekti. Nimelt moodustab 24,6% inimgenoomist selliseid piirkondi, kus 2 ühenukleotiidsse polümorfismi vahekaugus on enam kui 3 kb ja 54,9% selliseid piirkondi, kus vahekaugus on rohkem kui 10 kb. Seega, sõltuvalt sellest, kui palju tagSNP-sid soovitakse *HapMap*'i projektis kaardistada, võib 24,6-54,9% inimgenoomist haplotüübiblokkidesse jaotamata jääda. Siiski ei ole tegemist väga tõsise probleemiga, kuna haplotüübiblokkide piirid saab ära määrata alades, kus polümorfismide tihedus on piisav (Tsui *et al.*, 2003).

SNP-del põhinevate populatsioonispetsiifiliste haplotüübikaartide moodustamine on tähtis, kuna vähendaks oluliselt kandidaatgeenis ja selle ümbruses olevate analüüsitavate SNP-de arvu assotsiatsiooniuuringutes (Nowotny *et al.*, 2001; Tabor *et al.*, 2002). Selline kaart annaks võimaluse valida kandidaatgeeni uurimiseks haplotüübiblokkidele vastava arvu SNP-sid, mis omakorda viib efektiivsemale kandidaatgeenide detekteerimisele kui üle kogu genoomi ühtlaselt jaotuvate SNP-de valimine assotsiatsiooniuuringuks. On leitud, et sõltuvalt LD ulatusest ja haplotüübiblokkide iseärasustest piisab 2-4 haplotüüpi esindava SNP analüüsist, et testida kandidaatregiooni (Kamatani *et al.*, 2004).

1.4 Psoriaas

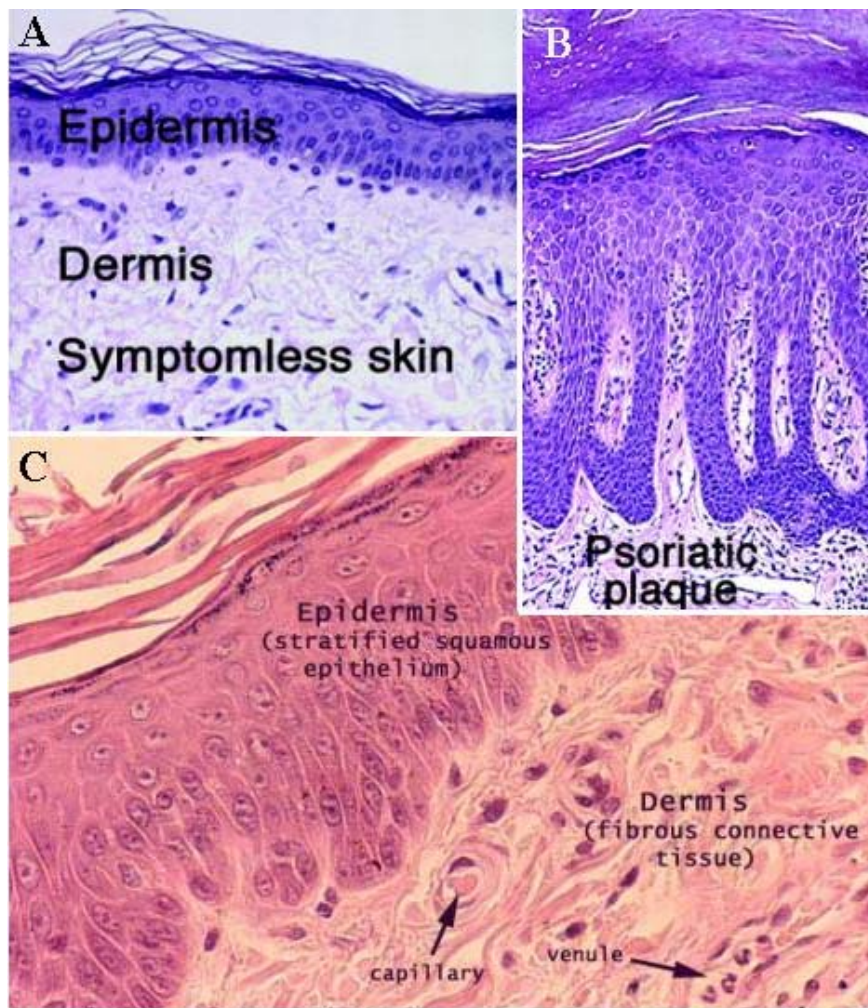
Psoriaas on krooniline nahahaigus. Psoriaasi klassifitseeritakse üldiselt kaheks peamiseks tüübiks: mittepustulaarne ehk naastuline psoriaas ja pustulaarne ehk mädavilliline psoriaas. Täpse diagnoosi seisukohalt võib nimetatud psoriaasi tüüpe jagada omakorda alatüüpideks nahal asuva kolde morfoloogia alusel (Christophers, 2001). Krooniline naastuline psoriaas on kõige levinum vorm, esinedes ~80% psoriaasi patsientidest. Tilgakujuline psoriaas (naastulise psoriaasi alatüüp) esineb ~10% patsientidest ning pustulaarset psoriaasi vormi põevad vähem kui 3% patsientidest (Biondi Oriente *et al.*, 1989). Kuna levinuim vorm on krooniline naastuline psoriaas, siis sageli üldistatakse krooniline naastuline psoriaas lihtsalt psoriaasiks. Käesolevas töös käsitletakse edaspidi ainult kroonilist naastulist psoriaasi ja termini „psoriaas” all peetakse tegelikult silmas kroonilist naastulist psoriaasi.

Krooniline naastuline psoriaas ehk soomussammaspool (*psoriasis vulgaris*) (OMIM 177900) on levinud krooniline põletikuline nahahaigus, mille esinemissagedus üldpopulatsioonis on 2-3% (Valdimarsson *et al.*, 1995; Nevitt & Hutchinson, 1996; Nickoloff & Nestle, 2004; Orrù *et al.*, 2005). Psoriaas esineb nii meestel kui naistel võrdse sagedusega (Raychaudhuri & Gross, 2000; Christophers, 2001). Perekonnauuringud viitavad psoriaasi polügeensele päritavusele ning psoriaasi kujunemisel mängivad olulist rolli nii geen-geen kui geen-keskkond interaktsioonid (Elder *et al.*, 2001; Nickoloff & Nestle, 2004). Psoriaas on eluaegne haigus, mida iseloomustavad spontaansed remissioonid ja ägenemised (Nickoloff & Nestle, 2004). Umbes 10-30% psoriaasi põdevatest haigetest kaasneb küünte düstroofia ja 5-42% haigetest psoriaatiline liigesepõletik, mis on reumatoidfaktori suhtes seronegatiivne (Lebwohl, 2003; Nickoloff & Nestle, 2004; Krueger & Bowcock, 2005).

Psoriaas võib esmakordselt avalduda igas vanuses, kuid sagedamini 15-25 aasta ja 57-60 aasta vanuselt (Henseler & Christophers, 1985). Psoriaasi esmaavaldumise ea järgi eristatakse varase ja hilise esmaavaldumisega psoriaasi (Christophers, 2001). Varases täiskasvanueas avalduv psoriaas on sagedamini perekondlik (põhjustatud geneetilisest transmissioonist), kui hilise avaldumisega psoriaas (Lebwohl, 2003). Sellest tingitult jagatakse psoriaasi ka perekondlikuks ja sporaadiliseks (Christophers, 2001).

Psoriaasi puhul toimuvad nahas mitmed rakulised muudatused: T-rakkude poolt vahendatud keratinotsüütide hüperproliferatsioon, veresoonte hüperplaasia ja ektaasia, T-lümfotsüütide, dendriitrakkude, neutrofiilide, nuumrakkude ning makrofaagide infiltreerumine haiguskoldesse (Bos & De Rie, 1999; Gudjonsson *et al.*, 2004; Nickoloff & Nestle, 2004; Krueger & Bowcock, 2005). Epidermise kasvu psoriaasi koldes iseloomustab psoriaasi tüüpi hüperplaasia: dermise ja epidermise vaheline piirjoon (*rete ridges*) on pikenenud, granulaarsete rakukihtide arv on vähenenud, epidermaalsete rakukihtide ja basaalkihis olevate mitootiliste keratinotsüütide arv on suurenenud ning derma papillaarkihis olevad veresooned on laienenud (Joonis 2) (Nickoloff & Nestle, 2004; Krueger & Bowcock, 2005). Kuna psoriaasi poolt haaratud epidermises kasvavad ja küpsevad keratinotsüüdid liiga kiiresti, siis nende lõplik diferentseerumine jääb puudulikuks (Krueger & Bowcock, 2005).

Psoriaasi kolle nahal on selgelt piiritletud, punetav, infiltreeritud ketendav naast. Kollete hulk nahal on varieeruv, kuid enamasti paiknevad kolded nahal sümmeetriliselt. Harva võib ka kogu nahk psoriaasi kollete poolt haaratud olla (psoriaatiline erütrodermia) (Bos & De Rie, 1999; Nickoloff & Nestle, 2004).



Joonis 2. Naha histoloogilised pildid (kohandatud Nickoloff & Nestle, 2004 ja <http://www.siumed.edu/~dking2/intro/IN008b1.htm> järgi). **A.** Psoriaasi patsiendi prepsoriaatilise (sümptomiteta) naha epidermises ja dermises ei esine ebatavalisi muutusi võrreldes terve inimese nahaga. Põhiliselt dermises on mõned mononukleaarsed rakud. **B.** Kroonilise psoriaasi kolde nahk on tänu kettude akumulatsioonile ning epidermise ja dermise vahelise piirjoone pikenemisele märkimisväärselt paksenenud. Granulaarsete rakkude kihtide arv on vähenenud, epidermaalsete keratinotsüütide kihtide arv on suurenenud. Lümfotsüüdid, dendriitrakud ja makrofaagid on infiltreerunud dermisesse, millega on kaasnenud veresoonte laienemine ja pikenemine. **C.** Terve inimese nahk.

1.4.1 Psoriaasi patogenees

Psoriaasi täpne etioloogia on siiani ebaselge. Läbi aastate on pakutud mitmeid hüpoteese ja mudeleid psoriaasi patogeneesi kohta, kusjuures erinevates teooriates on kesksel kohal olnud peaaegu kõik psoriaasi koldes leiduvad rakud (Nickoloff & Nestle, 2004). Hetkel peetakse psoriaasi kõige enam levinud autoimmuunhaiguseks, mille põhjuseks on ebakohane (*inappropriate*) rakulise immuunsüsteemi aktiveerimine (Krueger & Bowcock, 2005).

Kuni 1970. aastateni arvas enamus arste ja teadlasi, et psoriaasi tekke aluseks on ebanormaalne keratinotsüütide kasvu regulatsioon, kuid peale uute immunoloogiliste meetodite kasutusele võtmist nähti, et psoriaasi kujunemisel mängivad peamist rolli T-lümfotsüüdid. Alates sellest peetaksegi psoriaasi autoimmuunhaiguseks, mille vastavaid autoantigene, mis immuunreaktsiooni käivitaks, ei teata (Kirby & Griffiths, 2001, Gudjonsson *et al.*, 2004). Siinjuures ei ole välistatud ka eksogeensed faktorid, mis võiksid põhjustada immuunsüsteemi aktivatsiooni (Nickoloff & Nestle, 2004). T-rakkude osalus psoriaasi kujunemisel selgus, kui leiti, et psoriaasi saab eriti efektiivselt ravida T-rakke pärssivate immunosupressantidega (näiteks tsüklosporiin A) (Bos *et al.*, 1989).

Üks ühtsemaid psoriaasi patofüsioloogia hüpoteese, mis seob endaga erinevaid psoriaasi koldes olevaid rakutüüpe, on tsütokiinide võrgustiku mudel. Antud mudeli kohaselt tekib peale T-rakkude aktiveerimist teadmata faktori poolt tsütokiinide, kemokiinide ja kasvufaktorite kompleksne võrgustik. Loodud võrgustik põhjustab ennast ülesvõimendava vigase tsükli, mille käigus aktiveeritakse edasi T-rakke ja dendriitrakke ning keratinotsüütide proliferatsiooni, mis omakorda põhjustab psoriaasi kolde kujunemise ja alalhoidmise (Gudjonsson *et al.*, 2004; Nickoloff & Nestle, 2004). Tsütokiinide võrgustiku mudeli järgi on peamised tsütokiinide kaskaadi käivitajateks dendriitrakkudest ja keratinotsüütidest pärit tuumori nekroosi faktor α (TNF- α) ja T-helper 1 (Th1) tüüpi lümfotsüütide poolt produtseeritud interferoon γ (INF- γ) (Nickoloff, 1991; Gudjonsson *et al.*, 2004). Psoriaasi kolde tekib seega peale T-rakkude aktivatsiooni (auto)antigeenide või superantigeenide poolt, põletikuliste protsesside ja keratinotsüütide hüperproliferatsiooni tagajärjel (Kirby & Griffiths, 2001).

T-rakkude poolt sekreteeritud tsütokiinidest domineerivad psoriaasi kolletes Th1 päritolu tsütokiinid IL-2, IL-12, samuti INF- γ , mis on omakorda seotud suurenenud TNF- α kontsentratsiooniga (Schlaak *et al.*, 1994). T-helper 2 (Th2) päritolu tsütokiinid (nt. IL-10) võivad omada Th1 päritolu tsütokiinide suhtes vastupidist toimet (Kirby & Griffiths, 2001) – ravi tagajärjeks IL-10-ga on tsütokiinide tasakaalu taastumine psoriaasi kolletes ning haiguse paranemine (Asadullah *et al.*, 1999).

Välisfaktoritest võivad psoriaasi vallandada või ägestada bakteriaalne neelupõletik, stress, füüsilised traumad (sealhulgas päikesepõletus), HIV-1 ja erinevad ravimid (näiteks liitiumi soolad, β -blokaatorid) (Gudjonsson *et al.*, 2004; Nickoloff & Nestle, 2004).

1.4.2 Psoriaasiga seotud kandidaatgeenid

Psoriaas on tugeva geneetilise taustaga komplekshaigus (konkordantsus ühemunarakukaksikutel 60%-70% ning erimunarakukaksikutel 25%), mille avaldumist mõjutavad lisaks geneetilisele komponendile ka keskkonnafaktorid (Farber *et al.*, 1974; Brandrup *et al.*, 1982; Gudjonsson *et al.*, 2004). 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, võrreldes geneetilise vastuvõtlikkusega, on väike (Christophers, 2001).

Selleks et leida psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud lookusi, on viimase kümnekonna aasta jooksul tehtud 10 kogu inimgenoomi hõlmavat aheldusanalüüsi, mille tulemusel on leitud 19 potentsiaalset psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud lookust 15 erineval kromosoomil (Bowcock, 2004; Sagoo *et al.*, 2004). Neist lookustest kaheksale on antud nimi PSORS (*psoriasis susceptibility*) ning ülejäänud üheteistkümnele lookusele eraldi nime ei ole määratud (Tabel 3) (Sagoo *et al.*, 2004). Antud potentsiaalsetes psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud lookustes vajavad psoriaasi kandidaatgeenid veel välja selgitamist (Capon *et al.*, 2002; Krueger & Bowcock, 2005).

Tabel 3. Genoomse aheldusanalüüsiga leitud potentsiaalsed psoriaasi geneetilise vastuvõtlikkusega seotud lookused (kohandatud Sagoo *et al.*, 2004 järgi).

Asukoht	Lookuse nimi (kui on määratud)	Viide
1p	PSORS 7	Veal <i>et al.</i> 2001
1q	PSORS 4	Capon <i>et al.</i> 1999
2p		Veal <i>et al.</i> 2001
2q		Trembath <i>et al.</i> 1997
3q	PSORS 5	Samuelsson <i>et al.</i> 1999
4q13		Samuelsson <i>et al.</i> 1999
4q31	PSORS 9	Zhang <i>et al.</i> 2002
4q34	PSORS 3	Matthews <i>et al.</i> 1996
6p21.3	PSORS 1	Nair <i>et al.</i> 1997, Trembath <i>et al.</i> 1997, Samuelsson <i>et al.</i> 1999, Veal <i>et al.</i> 2001, Zhang <i>et al.</i> 2002
7		Veal <i>et al.</i> 2001
8q		Trembath <i>et al.</i> 1997
9q33		Zhang <i>et al.</i> 2002
14q		Veal <i>et al.</i> 2001
15		Samuelsson <i>et al.</i> 1999
16q		Nair <i>et al.</i> 1997
17q25	PSORS 2	Tomfohrde <i>et al.</i> 1994, Nair <i>et al.</i> 1997, Samuelsson <i>et al.</i> 1999
18p11		Asumalahti <i>et al.</i> 2003
19p13	PSORS 6	Lee <i>et al.</i> 2001, Veal <i>et al.</i> 2001
20p		Nair <i>et al.</i> 1997, Trembath <i>et al.</i> 1997

Psoriaasi põhiline geneetiline determinant asub lookuses PSORS 1, kuhu lokaliseerub ka peamine koesobivuskompleks (MHC, *the major histocompatibility complex*) (Capon *et al.*, 2002). Seost antud lookuse ja psoriaasi vastuvõtlikkuse vahel on näidatud korduvalt erinevates populatsioonides, üksteisest sõltumatute uurimisgruppide poolt (Tabel 3). PSORS 1 lookuses on võimalik riskialleel HLA-Cw6 ja võimalikud kandidaatgeenid korneodesmosiini geen (CDSN), *alpha-helix coiled-coil-rod* homoloogi geen (HCR), *small proline rich* geen (SPR1) ja transkriptsioonifaktori 19 (TCF19) geen (Ishihara *et al.*, 1996; Teraoka *et al.*, 2000; Hensen *et al.*, 2003; Orrù *et al.*, 2005).

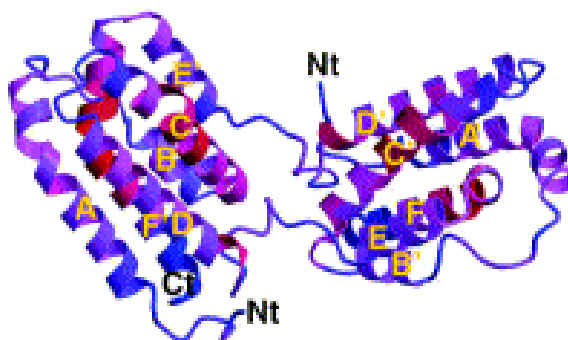
Uuemad aheldus- ja assotsiatsioonanalüüsid viitavad veenvalt, et HLA-Cw*0602 ongi peamine psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud riskialleel. 2/3 psoriaasi patsientidest kannab HLA-Cw*0602 alleeli, samas kui üldpopulatsioonis on selle alleeli esinemissagedus 10-15% (Veal *et al.*, 2002). Antud alleeli suhtes homosügootidel on 2,5 korda suurem tõenäosus psoriaasi välja kujunemisele kui heterosügootidel ning homosügootidel esineb tavaliselt varase avaldumisega psoriaas (Gudjonsson *et al.*, 2003). HLA-Cw*0602 kodeerib valku, mis võib osaleda immuunreaktsioonides esitledes peptiide CD8+ T-rakkudele (Gudjonsson *et al.*, 2003). Erinevalt teistest põletikulistest autoimmuunhaigustest, mis on seotud HLA klass II geenidega, on psoriaas ainuke teadaolev krooniline põletikuline haigus, mis on tugevalt assotsieerunud HLA-C geeniga (Valdimarsson *et al.*, 1995; Gudjonsson *et al.*, 2004).

Kuna MHC lookuse sees ja ümber (eriti HLA-C ja korneodesmosiini geeni vahel) on erakordselt tugev ahelduse tasakaalustamatus (LD), siis on võimalik, et aheldus- ja assotsiatsioonanalüüside tulemusi tõlgendatakse valesti ning ei teata, milline geen tegelikult vastuvõtlikkust psoriaasile põhjustab (Nickoloff & Nestle, 2004; Orrù *et al.*, 2005).

Tõendid ahelduse kohta psoriaasi ja teiste leitud lookuste vahel on nõrgad ning erinevate uurimisgruppide poolt läbi viidud aheldusanalüüside korral ei ole positiivseid tulemusi sageli korrata suudetud (Bowcock, 2004). Teistest mainitud psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud regioonidest on ainult kolme (17q25, 19p13 ja 20p) puhul saadud sarnaseid tulemusi rohkem kui ühes kogu inimgenoomi uuringus (Tabel 3). Põhjuseks võib olla nii see, et ülejäänud lookused omavad nõrgemat efekti psoriaasi kujunemisele kui PSORS 1, kui ka see, et tegemist on valepositiivsete tulemustega. Kuna psoriaas on polügeense pärilikkusega haigus, siis aheldusanalüüsi abil ei pruugigi üldpopulatsioonis kõrge esinemissagedusega psoriaasi vastuvõtlikkusega seotud allelele üles leida (Bowcock, 2004).

1.5 Interleukiin 24

IL-24 (varasema nimetusega MDA-7; *melanoma differentiation-associated antigen 7*) kuulub hiljuti avastatud IL-10 tsütokiinide perekonda (Fickenscher *et al.*, 2002). IL-10 tsütokiinide perekonda kuuluvad IL-10, IL-19, IL-20 ja IL-24 paiknevad inimese genoomis järjestikku 1. kromosoomi pikal õlal (1q32) 195 kb suurusel alal (Huang *et al.*, 2001; Fickenscher *et al.*, 2002). Antud tsütokiinid ekspresseeruvad erinevalt ning omavad erinevaid funktsioone, kuid ühtse tsütokiinide perekonna moodustavad nad struktuuride sarnasuse tõttu. Kuigi IL-24 valgujärjestus on ainult ~23% ulatuses identne IL-10 järjestusega, on kuue α -heeliksi hüdrofoobsete ja hüdrofiilsete aminohappejääkide muster konserveerunud kõigil IL-10 perekonna tsütokiinidel (Joonis 3) (Fickenscher *et al.*, 2002).



Joonis 3. Järjestuse konserveerumine IL-10 perekonna tsütokiinidel (Fickenscher *et al.*, 2002). IL-10 perekonna tsütokiinide aminohappelise järjestuse konserveerumise määr on märgitud kolmedimensionaalse IL-10 struktuuri mudelile. Värvigradient: punane – kõrgelt konserveerunud järjestus, sinine – vähe konserveerunud järjestus. α -heeliksid on tähistatud A-F. Nt – N-terminus, Ct – C-terminus.

Tsütokiinid IL-19, IL-20 ja IL-24 moodustavad omaette IL-19 alamperekonna (Gallagher *et al.*, 2004). Antud tsütokiinide alamperekonda iseloomustavad aminohapete järjestuse homoloogia ja fakt, et kõik kolm tsütokiini võivad seonduda ja signaliseerida läbi IL-20 retseptori β -ahela. Kui IL-19 alamperekonna tsütokiinid seonduvad IL-20 retseptoriga, aktiveeritakse STAT signaaliülekannderada tsütokiinide märklaudrakkudes (Dumoutier *et al.*, 2001; Parrish-Novak *et al.*, 2002).

IL-24 geen hõlmab 6696 bp genoomse DNA järjestusest ning koosneb seitsmest eksonist ja kuuest intronist. Alternatiivse splaissingu tõttu esineb IL-24 geenil kaks transkripti, mis kodeerivad erinevaid valgu isovorme. Esimene isovorm kodeerib 206 aminohappest koosnevat ~23,8 kDa suurust valku (põhiline IL-24 vorm), teine isovorm 48 aminohappest koosnevat valku, mis on identne esimese isovormi C-terminusega (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>).

IL-24 ekspresseerivad põhiliselt aktiveeritud T-helper 2 rakud ja aktiveeritud monotsüüdid (Schaefer *et al.*, 2001; Wang & Liang, 2004). IL-24 ekspresseerub ka normaalsetes melanotsüütides ja kudedes, mis on seotud immuunsüsteemiga – põrnas ja tüümuses (Jiang *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2001; Ekmekcioglu *et al.*, 2001). IL-24 retseptori ekspressioonimustri järgi on IL-24 peamised märklaudkoed lisaks teistele ka nahk, kopsud ja reproduktiivorganite koed (Wang & Liang, 2004). Peale seondumist retseptoritele, indutseerib IL-24 signaaliülekanDES osalevaid molekule ja transkriptsioonifaktoreid STAT-1 ja STAT-3, mis ilmselt mängivad rolli rakkude ellujäämisel ja proliferatsioonis (Dumoutier *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

IL-24 täpne bioloogiline funktsioon vajab välja selgitamist. On teada, et IL-24 võib läbi oma märklaudrakkude pinnaretseptorite kaituda kui klassikaline tsütokiin (Wang *et al.*, 2002). Samas võib IL-24 olla ka tsütotoksiline mõjur, põhjustades teatud retseptorite vahendusel ja ka ilma retseptorite vahenduseta vähirakkude apoptoosi (Pataer *et al.*, 2002; Sauane *et al.*, 2003; Chada *et al.*, 2004). IL-24 ja tema retseptori ekspressioonimustri põhjal *in vivo* võib arvata, et IL-24-st lähtuva signaaliraja üks peamisi füsioloogilisi funktsioone on epidermise normaalne funktsioneerimine (näiteks haava paranemine) ning kõrvelekalded sellest võivad kaasa aidata naha patoloogiliste seisundite tekkele nagu psoriaas (Soo *et al.*, 1999; Romer *et al.*, 2003; Wang & Liang, 2004). Antud hüpoteesi toetab ka leid, et epidermises olevad keratinotsüüdid on peamised IL-24 märklaudrakud (Wang *et al.*, 2002; Wang & Liang, 2004). Arvatakse, et psoriaasi korral infiltreeruvad dermisesse monotsüüdid, mis ekspresseerivad konstitutiivselt IL-24. See võib omakorda põhjustada IL-24 retseptori püsiva aktivatsiooni ning epidermises paiknevate keratinotsüütide proliferatsiooni (Wang & Liang, 2004).

IL-24 võib indutseerida ka teiste tsütokiinide (TNF- α , IL-6, IFN- γ) ekspressiooni, viidates sellele, et IL-24 võib osaleda tsütokiinide võrgustikus põletiku korral (Gaudell *et al.*, 2002; Wang & Liang, 2004).

IL-24 geeni polümorfisme ei ole seni komplekshaigustega seoses uuritud.

2. TÖÖ EESMÄRGID

1. Genotüpeerida naastulise psoriaasiga patsiente ja kontrollindiviide, et leida võimalikke assotsiatsioone IL-24 geeni polümorfismide ja naastulise psoriaasi geneetilise vastuvõtlikkuse vahel. Kirjeldada LD mustrit IL-24 geenis ja leida enamlevinud haplotüübid IL-24 geenis. Jälgida, kas enamlevinud haplotüübid IL-24 geenis omavad efekti haigusfenotübile.

2. TÜ Füsioloogia Instituudis on varem näidatud, et SNP-d rs2981572, rs2981573 ja rs2232360 IL-20 geenist on omavahel peaaegu täielikult aheldunud ($|D'|$ vahemikus 0,88-0,99). Samas, SNP rs1518108, mis asub IL-20 geeni 3' otsas ning järgneb eelpool mainitud SNP-dele, ei ole aheldunud nimetatud kolme SNP-ga (Kingo *et al.*, 2004). Kuna inimese genoomis järgneb IL-24 geen IL-20 geenile, siis pakkus huvi, kas SNP rs1518108 on aheldunud käesolevas magistritöös käsitletavate SNP-dega IL-24 geenist. Ja kui on aheldus esineb, siis leida, millised on enamlevinud haplotüübid, millist efekti omavad enamlevinud haplotüübid haigusfenotüübi suhtes ning millist efekti võiks SNP rs1518108 omada haplotüüpide kontekstis.

3. Toetudes juba varem saadud tulemustele IL-19 ja IL-20 geeni kohta (Köks *et al.*, 2004), kirjeldada võimalikku LD mustrit IL-19 alamperekonna tsütokiinide geene hõlmavas regioonis.

3. MATERJAL JA METOODIKA

3.1 Uuringus osalenud individid

Antud uuring viidi läbi kooskõlas TÜ Inimuuringute Eetikakomisjoniga. Kõik uuringus osalenud isikud andsid kirjaliku nõusoleku uuringus osalemiseks peale kirjalikku ja suulist teavitamist selle eesmärkidest ja meetodidest.

Uuringusse kaasatud patsiendid ja kontrollindividid olid Eestis elavad kaukasoidid. Naastulise psoriaasiga patsientide (254 mittesuguluses olevat indiviidi) ja kontrollindividide (148 mittesuguluses olevat indiviidi) vereproovid koguti dr. Külli Kingo poolt TÜ Nahahaiguste Kliinikus.

Patsiendid jagati naastulise psoriaasi esmaavaldumise ea ning perekondliku ja sporaadilise psoriaasi vormi alusel alagruppideks (nii naastulise psoriaasiga patsientide kui kontrollindividide peamised karakteristikud on näidatud Tabelis 4). Patsiendid, kellel avaldus naastuline psoriaas esmakordselt varem kui 40-aastaselt, klassifitseeriti varase algusega psoriaasi patsientideks ning patsiendid, kellel avaldus naastuline psoriaas esmakordselt 40-aastaselt või hiljem, hilise algusega psoriaasi patsientideks. Patsient põdes perekondlikku psoriaasi juhul, kui vähemalt üks esimese või teise astme sugulane põdes samuti psoriaasi. Patsiendid, kellel ei esinenud ühtegi psoriaasi diagnoosiga sugulast, klassifitseeriti sporaadilise psoriaasiga patsientideks (Henseler & Christophers, 1985).

Psoriaasi ägedus määrati PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) abil. PASI skoori arvutamise aluseks oli nahal asuvate psoriaasi kollete punetuse, ketenduse ja infiltratsiooni määr ning nahapinna hõivatus kollete poolt. Psoriaasi ägedust hinnati patsientidel sel hetkel, kui nad ei saanud süsteemset psoriaasivastast ravi. PASI skooride alusel jaotati patsiendid kahte rühma: $PASI \leq 20$ (151 indiviidi) ja $PASI > 20$ (85 indiviidi). Mida kõrgem on PASI skoor, seda ägedam on psoriaas.

Patsiendid jagati gruppidesse ka ainult kollete ulatuse suhtes nahal. Moodustati kolm gruppi: psoriaasi patsiendid, kellel oli nahapinna hõivatus kollete poolt $\leq 10\%$ ($n=66$), patsiendid, kellel oli nahapinna hõivatus kollete poolt 11-30% ($n=76$) ja patsiendid, kellel oli nahapinna hõivatus kollete poolt $>30\%$ ($n=94$).

Tabel 4. Uuringus osalenud indiviidide peamised tunnused.

Uuritavate staatus	Indiviidide arv			Vanus		
	Kokku	Mehi/naisi	Perekondliku psoriaasiga	Vanusepiirid	Keskmine vanus	Keskmine sümptomite esmaavaldumise iga
Naastulise psoriaasi patsiendid	254	135/119	101	18-89	40	30
Varase algusega psoriaasi patsiendid	180	94/86	85	18-73	39	20
Hilise algusega psoriaasi patsiendid	74	41/33	16	43-89	61	53
Terved kontrollindiviidid	148	57/91	-	18-71	36	-

Kontrollgrupi moodustasid psoriaasi suhtes terved indiviidid, kellel ei olnud varem esinenud teisi dermatoose ning kelle sugulaste hulgas ei olnud psoriaasi diagnoosiga patsiente (Tabel 4).

3.2 DNA proovid

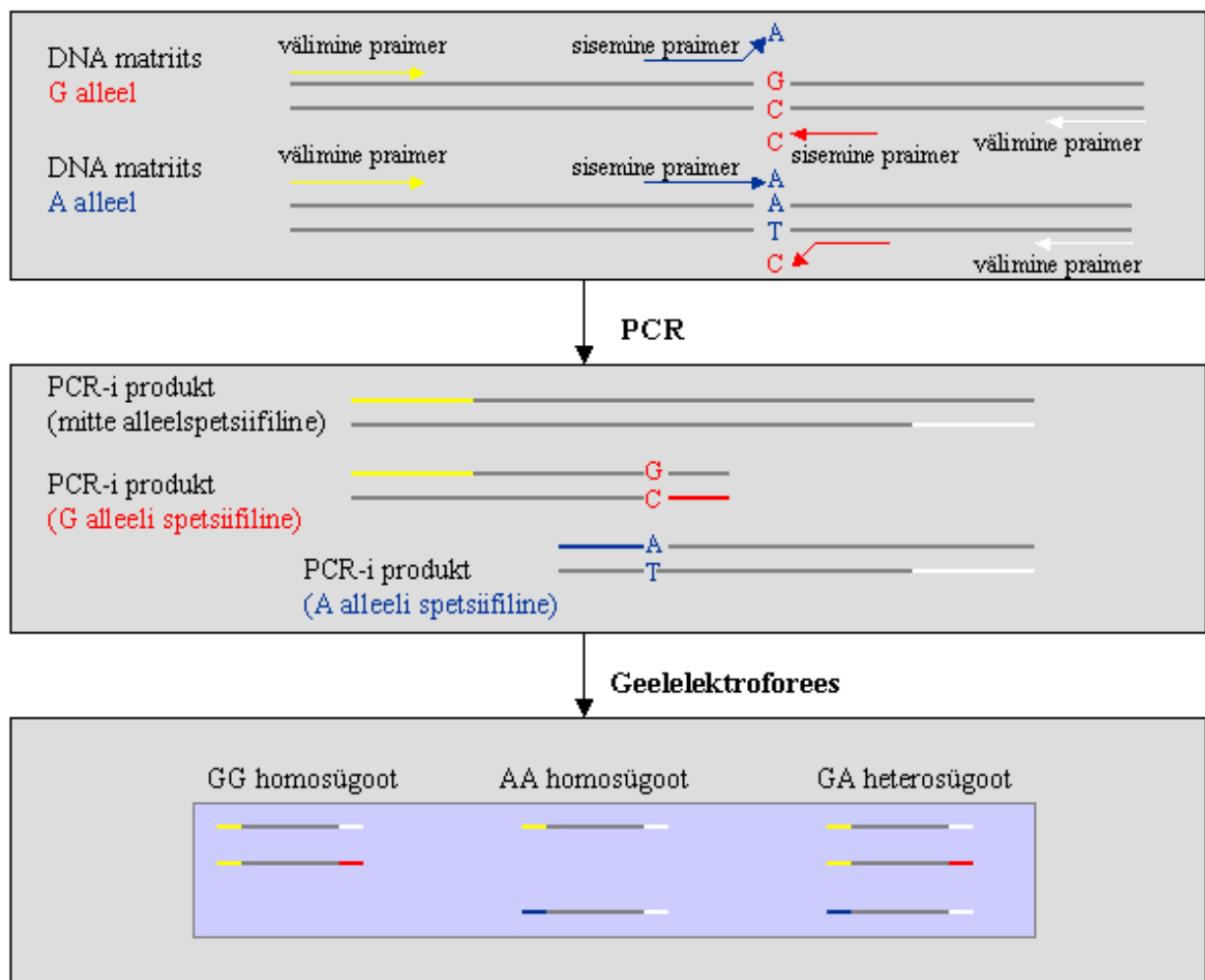
Genoomne DNA eraldati ~14 ml täisverest TÜ Füsioloogia Instituudis. Eraldamiseks kasutati DNA väljasoolamisel põhinevat standardprotokolli ning saadud genoomne DNA lahustati TE-s. Eraldatud genoomse DNA kontsentratsioonid olid vahemikus 100-260 ng/μl.

3.3 SNP-de valik

SNP-de valikuks IL-24 geenist kasutati dbSNP andmebaasi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>). SNP-de valiku kriteeriumideks oli minoorse alleeli esinemissagedus >10%, kahe SNP vaheline kaugus vähemalt 1000 bp ja SNP valideeritus. IL-24 geenist valiti genotüpeerimiseks 5 SNP-d: rs3762344, rs291111, rs1150253, rs1150256, rs1150258.

3.4 Polümorfismide genotüpeerimine

SNP-de genotüpeerimiseks kasutati tetra-praimer ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system polymerase chain reaction*) meetodit (Ye *et al.*, 2001). Antud meetodi puhul kasutatakse ühes polümeraasi ahelreaktsioonis kahte paari primereid, millega on võimalik amplifitseerida vastavalt ühe SNP kahte erinevat alleeli. Ühe SNP alleeli amplifitseerimiseks kasutatakse ühte alleelile spetsiifilist sisemist praimerit ja ühte mittespetsiifilist välimist praimerit. Lisaks alleelspetsiifilistele PCR-i produktidele saadakse ka üks kontrollprodukt, mis tekitatakse kahe välimise praimerit poolt (Joonis 4). Saadud PCR-i produktid lahutatakse geelelektroforeesil.



Joonis 4. Tetra-praimer ARMS-PCR-i põhimõte (kohandatud Ye *et al.*, 2001 järgi). Antud joonisel on näiteks toodud G→A polümorfism, kuid meetod võimaldab genotüpeerida ka teisi ühenukleotiidseid polümorfisme. Kasutades kahte paari praimereid, genereeritakse kaks alleelspetsiifilist amplikoni – üks paar praimereid (kollane ja punane nool) G alleelile vastava amplikoni ning teine paar praimereid (valge ja sinine nool) A alleelile vastava amplikoni. Alleelspetsiifilisus tagatakse sisemise praimeri 3' otsa viimase nukleotiidi ja matriits-DNA vahelise komplementaarsuse alusel. Spetsiifilisust aitab tõsta sisemistesse praimeritesse 3' otsast –2 positsiooni sünteesitud *mismatch* nukleotiid matriits-DNA suhtes. Kaks välimist praimerit asuvad polümorfismi suhtes erinevatel kaugustel, mistõttu kaks alleelspetsiifilist amplikoni on erineva pikkusega ja on lahutatavad agarosgeelis.

3.4.1 Tetra-praimer ARMS-PCR-i reaktsioon

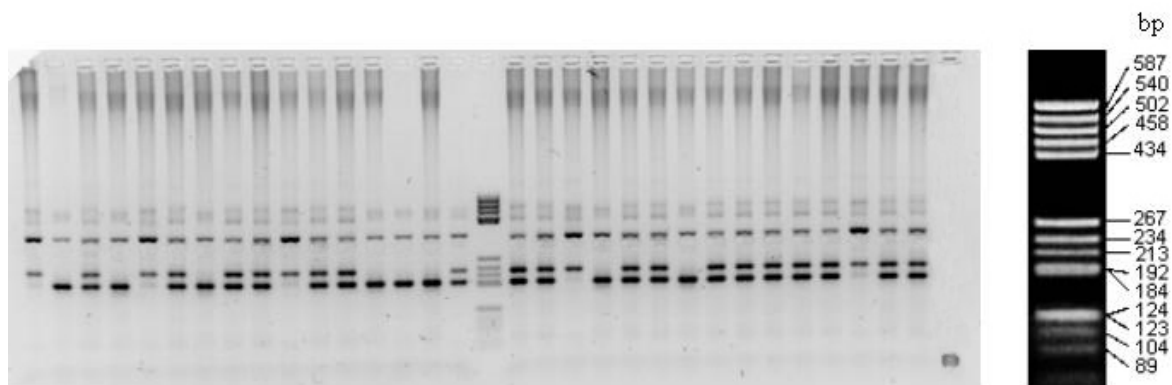
IL-24 geenis asuva viie polümorfismi genotüpeerimiseks disainiti 20 praimerit (Lisa 1). Praimerite disainimisel kasutati internetis olevat *online* programmi (http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html).

Iga tetra-praimer ARMS-PCR-i reaktsioonisegu (20 µl) sisaldas 1× reaktsioonipuhvrit [75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,1 mg/ml tartrasiin, 1% sahharoos; Naxo, Tartu, Eesti], 0,2 mM dNTP (MBI Fermentas, Vilnius, Leedu), 20 pmol mõlemat sisemist praimerit (TAG Copenhagen A/S, Kopenhaagen, Taani), 2 pmol mõlemat välimist praimerit (TAGC), 0,5 U rekombinantset Smart-Taq DNA polümeraasi (Naxo), 100 ng uuritavat genoomset DNA-d ning ddH₂O-d lõppmahuni. Praimerite järjestused, sulamistemperatuurid ja seondumistemperatuurid ning MgCl₂ kontsentratsioonid SNP-de genotüpeerimiseks on näidatud Lisas 1.

Amplifikatsioonid viidi läbi Eppendorf Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Hamburg, SLV) ja GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) termotsükleritega. PCR reaktsiooni spetsiifilisuse tõstmiseks tehti *touchdown* PCR järgnevatel tingimustel:

algne denaturatsioon	95°C 2 min	
denaturatsioon:	95°C 1 min	\
praimerite seondumine:	10°C kõrgemal temperatuuril, kui lõplik seondumistemperatuur 1 min	{ 10 tsükli (temperatuuri langus
ekstensioon:	72°C 1 min	) tsükli kohta 1°C)
denaturatsioon:	95°C 1 min	\
praimerite seondumine:	(vt. Lisa 1) 1 min	{ 25 tsükli
ekstensioon:	72°C 1 min	)
lõplik ekstensioon:	72°C 10 min	

Kõik PCR-i produktid lahutati geelelektroforeesil 2% agarosgeelis 0,5×TBE [45 mM Tris-boraat, 1 mM EDTA-Na₂ (dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat)] puhvris ja visualiseeriti etiidiumbromiidi abil (Joonis 5).



Joonis 5. Näide SNP rs3762344 genotüpeerimisest. Tetra-praimer ARMS-PCR-i meetodil on genotüpeeritud 31 erinevat patsienti ja saadud PCR-i produktid on lahutatud geelelektroforeetilisel 2% agarosgeelil. Kontrollproduktile vastab 357 bp pikkune fragment, G alleelile 225 bp pikkune fragment ja A alleelile 189 bp pikkune fragment. Agarosgeeli kõige parempoolsemal rajal on negatiivne kontroll. Keskmisel rajal on PCR-i produktide pikkuste hindamiseks pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 5 (MBI Fermentas), mille täpsed parameetrid on näidatud parempoolsel paneelil.

Tetra-praimer ARMS-PCR-il saadud genotüpeerimise tulemused kontrolliti üle resekveneerimise abil. Iga SNP puhul resekveneeriti vähemalt 3 DNA-d (mõlema alleeli suhtes homosügootsed indiviidid ja heterosügootne indiviid), kasutades BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit'i ja ABI Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) DNA sekvenaatorit.

3.5 Statistiline analüüs

Tetra-praimer ARMS-PCR reaktsioonil saadud tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati arvutiprogrammi GENEPOP (Version 3.3) (Raymond & Rousset, 1995). Esiteks kontrolliti *Fisher's exact* testi abil iga polümorfismi lookuse genotüüpide vastavust Hardy-Weinbergi tasakaalule. Seejärel arvutati alleelisagedused kümnes patsiendirühmas ja kontrollidel ning määrati 10 assotsiatsioonitesti abil genotüüpse ja alleelse jaotuvuse erinevused kontrollidel ja patsientidel, milleks kasutati samuti *Fisher's exact* testi. Statistilise analüüsi tulemuste interpretatsioon sõltub sellest, millist P-väärtust (P-väärtus on tõenäosus, et

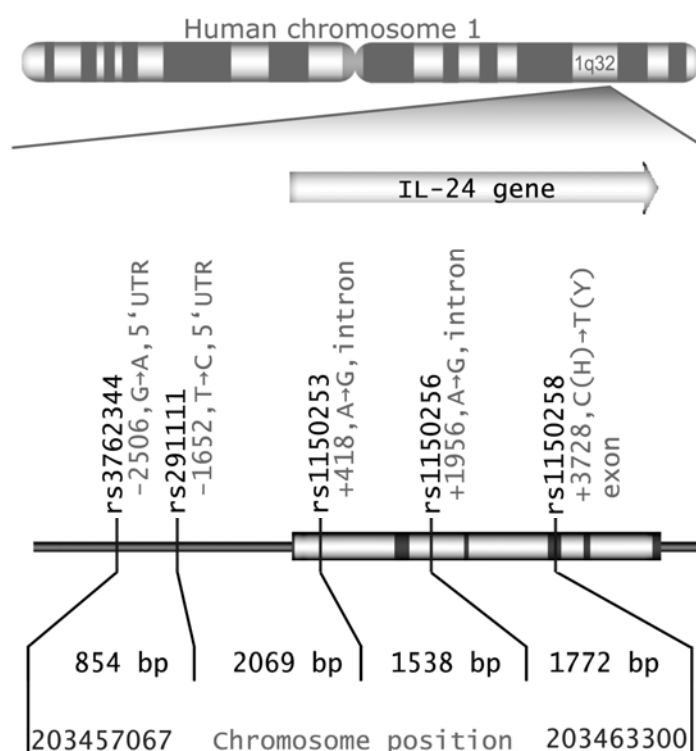
antud tulemused on saadud juhuslikult) lugeda statistiliselt oluliseks ehk kuhu asetada α (*significance level*) tase. Kuna IL-19 alamperekonna tsütokiinide geenide polümorfisme ei ole varem assotsiatsiooniuuringutes kasutatud, loeti antud töös statistiliselt oluliseks tulemust $P \leq 0,05$.

Enne haplotüübianalüüsi läbiviimist oli vaheetapina vaja teha ühendpopulatsiooni (patsiendid + terved individid) polümorfismide lookuspaaridevaheline LD analüüs, milleks kasutati arvutiprogrammi THESIAS (Version 3) (Tregouet *et al.*, 2002; Tregouet & Tired, 2004) ning tulemuste visualiseerimiseks arvutiprogrammi Haploview (Barrett *et al.*, 2005). LD-d hinnati paaride kaupa log-lineaarse mudeliga ja väljendati $|D'|$ -ga. $|D'|$ on vastavalt alleelisagedustele standardiseeritud LD koefitsient D. D määrab kahe lookuse vahelise juhusliku assotsiatsiooni hälbe. Kahte polümorfismi peeti täielikult aheldunuks, kui $|D'|$ oli $\geq 0,9$ (maksimaalne $|D'| = 1$). Aheldunuks peeti ka polümorfisme, kui $|D'|$ oli $\geq 0,6$.

Haplotüübianalüüs viidi läbi samuti programmiga THESIAS (Version 3). Antud arvutiprogramm hindab haplotüübi ja fenotüübi vahelist assotsiatsiooni maksimaalse tõenäosuse algoritmi (*maximum likelihood method for haplotype-phenotype association*) kasutades. Haplotüübi efekti haigusfenotüübile hinnati riskifaktoriga OR (*odds ratio*). OR näitab teatud sündmuse (antud juhul haplotüübi) esinemissageduste erinevusi patsientide ja kontrollindiviidide seas ning arvutatakse, jagades sündmuse esinemise patsientidel sündmuse esinemisega kontrollindiviidide rühmas. Saadud riskifaktori väärtust interpreteeritakse sõltuvalt 95% usaldusväärsuse intervallist (*confidence interval*, C.I. – riskifaktori väärtuste vahemik, kuhu paiknevad 95% saadud riskifaktori väärtustest) ja konkreetsest haigusfenotüübist. Siiski saab järeldada, et kui $OR < 1$, siis omab haplotüüp protektiivset efekti ning $OR > 1$, siis on haplotüüp seotud vastuvõtlikkusega antud haiguse suhtes. Juhul, kui usaldusväärsuse intervalli jääb ka $OR = 1,0$, ei saa tulemust statistiliselt usaldusväärseks pidada.

4. TULEMUSED

Käesoleva magistritöö raames genotüpeeriti tetra-praimer ARMS-PCR meetodiga (Joonis 4) 402 indiviidi, kellest 254 olid naastulise psoriaasi diagnoosiga patsiendid ning 148 kontrollindiviidid. Antud töö käigus genotüpeeriti ja analüüsiti 5 SNP-d IL-24 geenist (Joonis 6) ning hiljem võeti haplotüübianalüüsi veel lisaks 1 SNP IL-20 geenist.



Joonis 6. Genotüpeeritud SNP-d IL-24 geenist. SNP-d on joonisel esitatud dbSNP andmebaasi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) ID numbrite abil. Nool näitab IL-24 transkriptsiooni suunda. Kõikide SNP-de puhul on näidatud nende positsioon startkoodoni suhtes. Esimese ja viimase SNP korral on näidatud ka nende positsioon genoomis dbSNP andmetel. IL-24 geeni kodeeriv järjestus on esitatud alumisel skeemil kastina (mustad alad kastis tähendavad eksoneid) horisontaalsel triibul, kusjuures horisontaalne triip on mittekodeeriv järjestus. Kõikide SNP-de puhul on antud alleelsed variandid ja rs1150258 puhul on sulgudes toodud ka alleeli muutusest tingitud aminohappe muutus.

Kõigi viie analüüsitud polümorfismi genotüüpide jaotuvused vastasid Hardy-Weinbergi (H-W) tasakaalule (patsientide ja kontrollide ühendrühmas oli $P > 0,05$) (rs3762344 $P = 0,75$, rs291111 $P = 0,13$, rs1150253 $P = 0,40$, rs1150256 $P = 0,51$, rs1150258 $P = 0,50$). Alleelse ja genotüüpse jaotuvuse erinevused leiti kümne assotsiatsioonitesti abil (kümne assotsiatsioonitesti aluseks olid kümme diagnoosist sõltuvalt erinevat patsientide rühma vs kontrollindiviidide rühm). Alleelse ja genotüüpse jaotuvuse tulemuste interpretatsioon (P-väärtus) langes nii tervete indiviidide rühma kui patsientide kümne erineva rühma vahel enamasti kokku (lisad 2, 3, 4, 5, 6). Assotsiatsioonianalüüsi tulemusel ei leitud ühtegi statistiliselt olulist seost ($P \leq 0,05$) analüüsitud polümorfismide ja naastulise psoriaasi vahel. Kui võrreldi naastulise psoriaasi alatüüpidega patsiente kontrollindiviididega, leiti, et SNP rs1150253 oli statistiliselt oluliselt assotsieerunud (alleelne $P = 0,02$) limiteeritud psoriaasi vormiga (nahapinna hõivatus kollete poolt $\leq 10\%$) ja patsientide rühmas oli minoorse alleeli sagedus tõusnud (limiteeritud vormiga patsientidel 54,4%, kontrollidel 42,2%). SNP-de rs3762344, rs1150256 ja rs1150258 minoorsete alleelide esinemissagedused olid samuti limiteeritud vormiga psoriaasi patsientidel tõusnud, kuid erinevused ei olnud statistiliselt olulised (Tabel 5, Lisad 2, 3, 4, 5, 6).

Tabel 5. IL-24 geeni assotsiatsioonitestide tulemused.

	rs3762344			rs291111			rs1150253			rs1150256			rs1150258		
	Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)		
	A	G	Alleelne P	T	C	Alleelne P	A	G	Alleelne P	A	G	Alleelne P	C	T	Alleelne P
Kontroll n=148	48,6	51,4	-	96,6	3,4	-	57,8	42,2	-	51,7	48,3	-	51,4	48,6	-
Naastuline psoriaas n=254	52,8	47,2	0,28	98,0	2,0	0,24	51,6	48,4	0,08	47,4	52,6	0,24	57,5	42,5	0,28
Varane psoriaas n=180	51,7	48,3	0,49	98,3	1,7	0,21	52,2	47,8	0,16	48,3	51,7	0,42	47,8	52,2	0,39
Hiline psoriaas n=74	55,3	44,7	0,20	97,3	2,7	0,78	50,0	50,0	0,12	45,3	54,7	0,23	46,0	54,1	0,33
Perekondlik psoriaas n=101	54,0	46,0	0,28	97,5	2,5	0,61	52,0	48,0	0,15	45,5	54,5	0,19	45,0	55,0	0,16
Sporaadiline psoriaas n=153	52,0	48,0	0,47	98,4	1,6	0,20	52,0	48,0	0,17	48,7	51,3	0,46	48,7	51,3	0,57
PASI ≤20 n=151	52,3	47,7	0,41	98,1	1,9	0,31	51,3	48,7	0,12	47,1	52,9	0,28	47,5	52,5	0,36
PASI>20 n=85	52,1	47,9	0,29	97,9	2,1	0,58	52,1	47,9	0,22	47,9	52,1	0,45	46,9	53,1	0,35
Kollete ulatus ≤10% n=66	58,3	41,7	0,07	98,5	1,5	0,36	45,6	54,4	0,02	42,6	57,4	0,09	42,6	57,4	0,09
Kollete ulatus 11-30% n=76	52,0	48,0	0,56	96,8	3,2	1,00	51,9	48,1	0,23	46,8	53,2	0,39	47,4	52,6	0,48
Kollete ulatus >30% n=94	50,0	50,0	0,78	98,6	1,4	0,25	55,1	44,9	0,55	50,9	49,1	0,93	50,0	50,0	0,79

Vaheetapina enne haplotüübianalüüsi teostati IL-24 geeni sisene lookuspaaridevaheline LD analüüs patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis. Kuna SNP rs291111 minoorse alleeli esinemissagedus oli väiksem kui 10%, siis jäeti antud SNP LD analüüsist välja. LD analüüsi tulemusel leiti, et IL-24 geenis olevad 4 polümorfismi (rs3762344, rs1150253, rs1150256 ja rs1150258) on omavahel peaaegu täielikult aheldunud (Tabel 6).

Tabel 6. Geenisisese lookuspaaridevahelise LD analüüsi tulemused IL-24 geenis patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis.

LD IL-24 geenis ($ D' $)				
SNP ID	rs3762344	rs1150253	rs1150256	rs1150258
rs3762344		0,94	0,97	0,97
rs1150253			0,95	0,95
rs1150256				0,99
rs1150258				

Lähtuvalt geenisisese lookuspaaridevahelise LD analüüsi tulemustest viidi läbi haplotüübianalüüs nelja omavahel aheldunud IL-24 geeni polümorfismiga. IL-24 geenis esines 4 enamlevinud haplotüüpi ($\geq 1\%$), mis moodustasid 98,24% kõikidest võimalikest alleelide kombinatsioonidest (Tabel 7).

Seejärel leiti enamesinenud haplotüüpide esinemissagedused 10 patsientide grupis ja kontrollindiviidide seas ning analüüsiti, kas mõni haplotüüpidest omab ka vastuvõtlikkusega/protektiivsusega seotud efekti haigusfenotüübi suhtes. Kuigi HT2 GGGT esines mõnevõrra sagedamini naastulise psoriaasiga patsientide hulgas ja HT3 GAGT ning HT4 AGAC kontrollindiviidide hulgas, ei olnud tegemist statistiliselt olulise vahega (Tabel 9). Kui võrreldi omavahel kontrollindiviidide ja psoriaasi alatüüpidest sõltuvaid patsientide grupe, leiti, et limiteeritud vormiga psoriaasi patsientidel (nahapinna hõivatus kollete poolt $\leq 10\%$) esines HT2 GGGT statistiliselt oluliselt sagedamini, kui kontrollidel (OR=1,548, 95% CI 1,007-2,380, P=0,05) (Tabel 10).

Tabel 7. IL-24 geenis leitud enamesinevad haplotüübid ja nende esinemissagedused.

Haplotüüp					Haplotüübi sagedus %	
Haplotüübi tähistus	rs3762344	rs1150253	rs1150256	rs1150258	Patsiendid n=254	Kontrollid n=148
HT1	A	A	A	C	46,2	48,2
HT2	G	G	G	T	47,6	39,4
HT3	G	A	G	T	4,2	8,3
HT4	A	G	A	C	-	2,8

Lähtuvalt püstitatud töö eesmärkidest, viidi järgmisena läbi laiendatud lookuspaaride vaheline LD analüüs 5 SNP-ga (SNP rs1518108 IL-20 geenist ja rs3762344, rs1150253, rs1150256, rs1150258 IL-24 geenist), mille tulemusel selgus, et SNP rs1518108 on oluliselt aheldunud IL-24 geenis oleva 4 SNP-ga ($|D'|$ vahemikus 0,61-0,79) (Joonis 7). Haplotüübianalüüsil leiti antud regioonis 5 enam esinenud ($\geq 1\%$) haplotüüpi, mis moodustasid 96,39% kõikidest võimalikest alleelide kombinatsioonidest (Tabel 8).

Tabel 8. IL-20 ja IL-24 geenide kombineeritud haplotüübianalüüsi tulemused: enamesinevad haplotüübid ja nende esinemissagedused.

Haplotüüp						Haplotüübi sagedus %	
Haplotüübi tähistus	rs1518108 (IL-20)	rs3762344 (IL-24)	rs1150253 (IL-24)	rs1150256 (IL-24)	rs1150258 (IL-24)	Patsiendid n=254	Kontrollid n=148
HT1	T	A	A	A	C	44,7	38,4
HT2	C	G	G	G	T	40,6	28,0
HT3	T	G	G	G	T	7,0	11,4
HT4	C	G	A	G	T	3,5	6,8
HT5	C	A	A	A	C	1,5	10,1

Tabel 9. IL-24 geeni haplotüüpide ja IL-20/IL-24 geenide kombineeritud haplotüüpide analüüsi tulemused naastulise psoriaasi üldgrupis (n=254).

IL-24 haplotüübid	OR (95% CI)	P-väärtus
AAAC	*	*
GGGT	1,241 (0,910-1,693)	0,17
GAGT	0,604 (0,311 - 1,173)	0,14
AGAC	-	-
IL-20 ja IL-24 kombineeritud haplotüüp		
TAAAC	*	*
CGGGT	1,292 (0,887 – 1,884)	0,18
TGGGT	0,591 (0,356 – 0,981)	0,04
CGAGT	0,457 (0,215 – 0,974)	0,04
CAAAC	0,154 (0,059 – 0,411)	0,0002

Laiendatud haplotüübianalüüsil leiti, et HT5 CAAAC esines kontrollgrupis oluliselt kõrgema sagedusega kui naastulise psoriaasiga patsientide hulgas (OR=0,154, 95% CI 0,059-0,411, P=0,0002), viidates väga tähendusrikkale haplotüüp-fenotüüp assotsiatsioonile (Tabel 9). Kui võrreldi omavahel kontrollindiviide ja psoriaasi alatüüpidega patsiente, saadi sarnane tulemus: HT5 CAAAC esines kontrollgrupis statistiliselt oluliselt sagedamini kui varase avaldumisega psoriaasi patsientidel (n=180) (OR=0,121, 95% CI 0,038-0,385, P=0,000346), hilise avaldumisega psoriaasi patsientidel (n=74) (OR=0,152, 95% CI 0,033-0,711, P=0,0167), perekondliku psoriaasiga patsientidel (n=101) (OR=0,059, 95% CI 0,007-0,477, P=0,00795) ning sporaadilise vormiga psoriaasi patsientidel (n=153) (OR=0,179, 95% CI 0,061-0,525, P=0,00174) (Lisa 7). HT5 CAAAC protektiivne efekt on peamiselt tingitud IL-20 geeni SNP rs1518108 individuaalsest efektist – T alleeli muutumisel C alleeliks (OR=0,154, 95% CI 0,058-0,411, P=0,000186).

Laiendatud haplotüübianalüüsil selgus veel, et kontrollgrupis esineb statistiliselt oluliselt kõrgema sagedusega HT3 TGGGT. Antud haplotüüp omas protektiivset efekti naastulise psoriaasi (OR=0,591, 95% CI 0,356-0,981, P=0,04)

(Tabel 9), varase avaldumisega psoriaasi (n=180) (OR=0,548, 95% CI 0,316-0,951, P=0,0325) ja sporaadilise psoriaasi (n=153) (OR=0,523, 95% CI 0,295-0,925, P=0,026) suhtes (Lisa 8). Samuti esines kontrollgrupis oluliselt sagedamini HT4 CGAGT: jaotuvuse erinevus oli statistiliselt oluline, kui võrreldi naastulist psoriaasi (OR=0,457, 95% CI 0,215-0,974, P=0,04) (Tabel 9), varase avaldumisega psoriaasi (n=180) (OR=0,430, 95% CI 0,185-0,998, P=0,0497) ja sporaadilist psoriaasi (n=153) (OR=0,390, 95% CI 0,154-0,962, P=0,0411) kontrollgrupiga (Lisa 9).

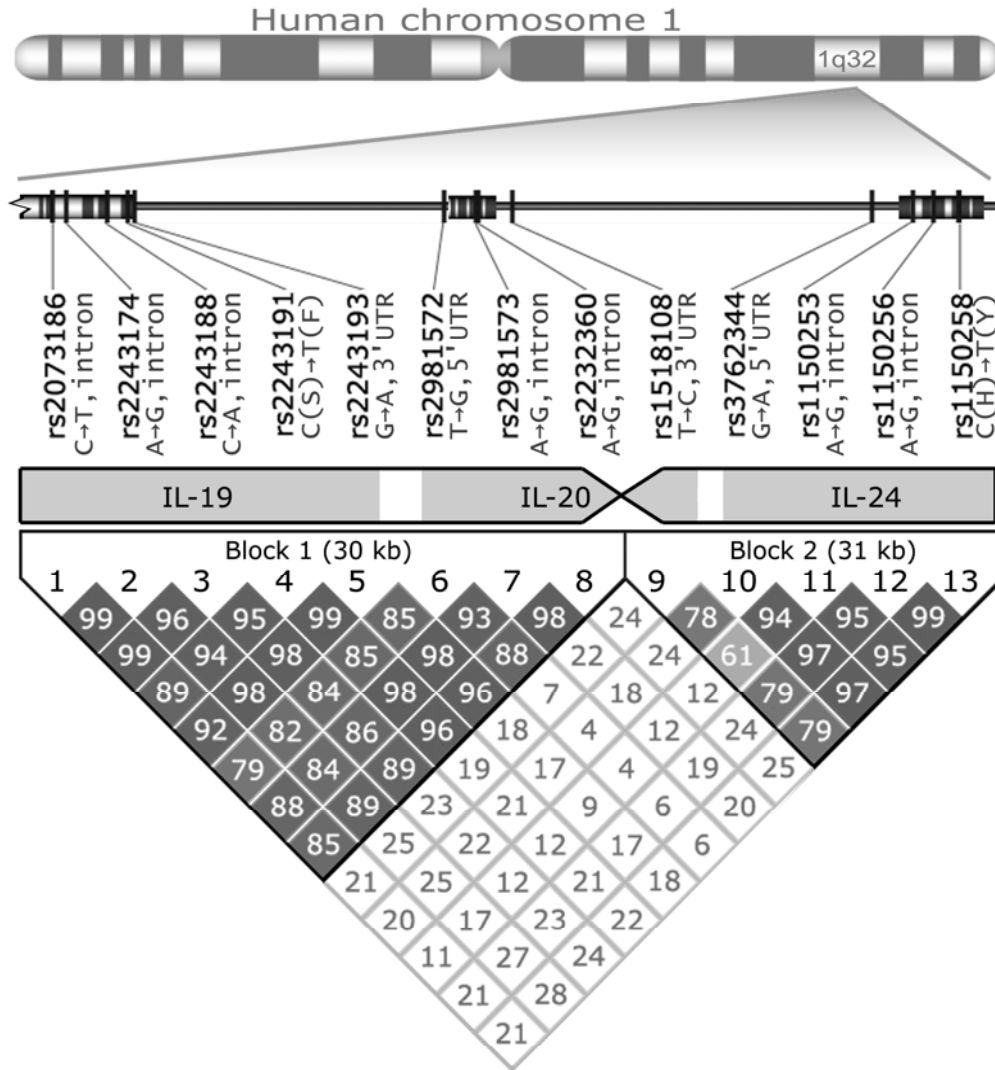
Kuigi HT1 TAAAC ja HT2 CGGGT olid naastulise psoriaasiga patsientide üldgrupis suurema esinemissagedusega kui kontrollgrupis, ei olnud erinevused statistiliselt olulised (Tabelid 8 ja 9).

IL-24 geeni haplotüübi GGGT limiteeritud psoriaasi vormi vastuvõtlikkusega seotud efekt ei jäänud peale laiendatud haplotüübianalüüsi püsima (Tabel 10).

Tabel 10. IL-24 geeni haplotüüpide ja IL-20/IL-24 geenide kombineeritud haplotüüpide analüüsi tulemused limiteeriud psoriaasi vormiga patsientidel (nahapinna hõivatus kollete poolt $\leq 10\%$).

IL-24 haplotüübid	Kontrollid n=148	Psoriaasi patsiendid nahapinna hõivatusega $\leq 10\%$ n=66	OR (95% CI)	P-väärtus
AAAC	48,1	40,8	*	*
GGGT	39,3	53,7	1,548 (1,007 - 2,380)	0,05
GAGT	8,3	2,3	0,441 (0,119 - 1,641)	0,22
AGAC	2,5	0,06	-	-
IL-20 ja IL-24 kombineeritud haplotüübid				
TAAAC	38,0	37,4	*	*
CGGGT	27,5	43,5	1,618 (0,975 - 2,685)	0,06
TGGGT	11,7	10,2	0,930 (0,467 - 1,852)	0,84
CAAAC	10,5	3,4	0,383 (0,099 - 1,471)	0,16
CGAGT	6,8	2,3	0,393 (0,097 - 1,591)	0,19

IL-19, IL-20 ja IL-24 geene sisaldava regiooni LD analüüs näitas, et antud regioonis moodustub kaks haplotüübiblokki. Rekombinatsioonisait jääb IL-20 geeni, SNP-de rs2232360 ja rs1518108 vahele (Joonis 7). Tuginedes varasematele andmetele (Kõks *et al.*, 2004), sisaldab esimene haplotüübiblokk (30 kb) viit SNP-d IL-19 geenist (rs2243191, rs2073186, rs2243174, rs2243188 ja rs2243193) ja kolme SNP-d IL-20 geenist (rs2981572, rs2981573 ja rs2232360). Käesolevas magistritöös näidati, et teise haplotüübiblokki (31 kb) jääb üks SNP IL-20 geenist (rs1518108) ja neli SNP-d IL-24 geenist (rs3762344, rs1150253, rs1150256 ja rs1150258). Mõlemas blokis esineb viis enamlevinud haplotüüpi.



Joonis 7. LD muster ja moodustunud haplotüübiblokid IL-19 tsütokiini alamperekonna geenides (67 264 bp lõik inimese kromosoomis 1q32). Pildil on 1. kromosoom; selle all oleval horisontaalsel triibul on näidatud geenide kodeerivad regioonid (kastid, milles mustad alad tähendavad eksoneid) ja SNP-d (vertikaalsed triibud), mis on proportsioonis reaalsete genoomsete distantidega. SNP-d on joonisel esitatud dbSNP andmebaasi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) ID numbrite abil, millele on lisatud võimalikud alleelid. Kui võimalik, siis on sulgudes toodud ka alleeli muutusest tingitud aminohappe muutus. Lai triip SNP-de ID numbri all näitab, millises geenis SNP asub (geenide alad antud triibul ei väljenda geenide tegelikke proportsioone inimese genoomis) ja rist triibu keskel väljendab rekombinatsiooni punkti. LD mustri leidmiseks ja haplotüübiblokkide määratlemiseks antud regioonis kasutati arvutiprogrammi Haploview. Parema hinnatavuse huvides on D' väärtused sajakordsed.

5. ARUTELU

Hiljuti on näidatud, et IL-24 (MDA-7) võib käituda kui tsütokiin ja olla osa immuunsüsteemist. IL-24 suudab sarnaselt IL-19-le ja IL-20-le seonduda IL-20 retseptoritele, käivitades niiviisi STAT signaaliraja (Dumoutier *et al.*, 2001; Parrish-Novak *et al.*, 2002). Lisaks on näidatud IL-24 ekspressiooni psoriaasi kolletes, mis viitab IL-24 võimalikule osalusele psoriaasi patogeneesis (Romer *et al.*, 2003). Nii IL-19, IL-20 kui IL-24 ekspresseeritakse monotsüütide poolt ja oletatavalt mängivad need tsütokiinid rolli põletiku tekkel nahas ning immuunvastuse kujunemisel psoriaasi korral.

TÜ Füsioloogia Instituudis on juba varem uuritud IL-19 ja IL-20 geenide polümorfismide võimalikku osalust psoriaasi kujunemisel (Kingo *et al.*, 2004; Kõks *et al.*, 2004). Käesoleva töö eesmärk oli genotüpeerida naastulise psoriaasiga patsiente ja kontrollindiviide Eesti populatsioonis ning leida võimalikke seoseid IL-24 geeni polümorfismide ja naastulise psoriaasi kujunemise vahel. Samuti selgitada välja LD muster regioonis, mis hõlmab endas IL-20 ja IL-24 geene, uurida võimalike haplotüüpide esinemist IL-24 geeni piirkonnas ning jälgida, kas esineb haplotüübiefekti haigusfenotüübi kujunemisel.

5.1 Uuringurühmad

Kontrollindiviidide rühm komplekteeriti teadlikult nii, et keskmine vanus jääks 30. ja 40. eluaasta vahele. Sellisel juhul on välistatud varase algusega psoriaas ja on vähenenud tõenäosus, et kontrollil võiks hiljem psoriaas kujuneda. Pealegi, liiga eakatel kontrollindiviididel esineb sagedamini psoriaasile sarnase profiiliga haiguseid (näiteks kõrgvererõhutõbi, kus olulist rolli mängivad Th1 rakud), mis segaksid uuringut.

Käesolevas uuringus osalenud kontrollindiviidide hulgas oli naisi rohkem kui mehi (vastavalt 91 ja 57). Patsientide hulgas oli seevastu rohkem mehi (mehi 135 ja naisi 119) (Tabel 4). Reeglina peaks *case-control* assotsiatsiooniuringutes patsientide ja kontrollindiviidide ealine ja sooline jaotuvus kokku langema, kuid

selles uuringus ei peetud soolisi erinevusi määravaks – naastuline psoriaas esineb nii meestel kui naistel võrdse esinemissagedusega.

Hilise algusega psoriaasi patsientide (keskmine vanus 61 aastat) ja kontrollindiviidide (keskmine vanus 35 aastat) (Tabel 4) ealine jaotuvus oli liiga erinev. Kuna mitte ühelgi uuringus osalenud psoriaasi põdeval haigel (sealhulgas ka hilise algusega psoriaasi patsientidel) ei kaasnenud psoriaasile sarnase profiiliga haiguseid ning kontrollgruppi keskmise vanusega 60 aastat oli äärmiselt raske moodustada, siis otsustati statistilised analüüsid siiski läbi viia. Kuigi hilise algusega psoriaasi patsientide rühmaga tehtud analüüse võis mingil määral mõjutada populatsioonide kihistumine, võib saadud tulemusi sellegipoolest oluliseks pidada – hilise algusega psoriaasi patsientide rühm ja kontrollindiviidide rühm olid võimalike esinevate haiguste (va. psoriaas) suhtes ühtlustatud. Teiste patsiendirühmade ja kontrollindiviidide ealine jaotuvus oli sarnane (Tabel 4).

5.2 Assotsiatsioonianalüüs IL-24 geeni SNP-dega

Enamasti on assotsiatsiooniuuringutel kasutatav minoorse alleeli sageduse piir vaikumisi $\geq 5\%$, kuna harvem esineva alleeliga polümorfisme peetakse raskemini detekteeritavateks ning saadud tulemused võivad osutuda juhuslikeks. Kuna käesolevas töös oli kontrollpopulatsiooni valimis indiviidide hulk 148 ja eesmärgiks oli detekteerida SNP-de mõlemad alleelid, siis võeti uuringusse ainult sellised SNP-d, mille minoorse alleeli esinemissagedus oli dbSNP andmebaasi andmetel $\geq 10\%$. Antud alampiiri määramisel võeti arvesse ka see, et hilisemasse haplotüübianalüüsi plaaniti võtta ainult sellised SNP-d, mille minoorse alleeli esinemissagedus Eesti populatsioonis on $\geq 10\%$. Töö käigus selgus, et SNP rs291111 korral oli minoorse alleeli esinemissagedus Eesti populatsioonis naastulise psoriaasiga patsientidel vaid 2,0% ja kontrollindiviididel 3,4%. Ülejäänud nelja SNP (rs3762344, rs1150253, rs1150256, rs1150258) puhul olid kõikide alleelide esinemisagedused $>10\%$ (Tabel 5).

Hardy-Weinbergi tasakaalu korral $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, kus p ja q on antud lookuse (näiteks SNP) alleelisagedused populatsioonis. Kontrollides genotüüpide sageduste vastavust H-W tasakaalule, oli null-hüpoteesiks (H_0) gameetide juhuslik ühinemine (*random union of gametes*) genotüüpide moodustamisel. Kõigi viie SNP

(rs3762344, rs291111, rs1150253, rs1150256, rs1150258) korral vastas genotüüpide jaotuvus H-W tasakaalule ($P > 0,05$).

Alleelse ja genotüüpse jaotuvuse võrdlemisel patsientide ja kontrollindiviidide vahel oli null-hüpoteesiks (H_0) identne alleelne (või genotüüpne) jaotuvus populatsioonide vahel. IL-24 geeni polümorfismide assotsiatsioonianalüüsil ei leitud ühtegi statistiliselt olulist seost uuritud SNP-de ja naastulise psoriaasi vahel. Siiski näidati, et SNP rs1150253 minoorne alleel võib olla riskialleel limiteeritud psoriaasi vormi suhtes (Tabel 5). Assotsiatsioonianalüüsil (samuti haplotüübianalüüsil) saadud tulemused võivad olla ka juhuslikud, kuna naastulise psoriaasi alatüüpidega patsientide hulk võis olla ebapiisav (hilise algusega psoriaasi patsiente 74 ja PASI >20 patsiente 85, 66 patsienti, kellel oli nahapinna hõivatus kollete poolt $\leq 10\%$, 76 patsienti, kellel oli nahapinna hõivatus kollete poolt 11-30% ja 94 patsienti, kellel oli nahapinna hõivatus kollete poolt $>30\%$) (vt. lõik 3.1 Uuringus osalenud indiviidid).

Assotsiatsioonianalüüsides puhul on mitmeid üldaktsepteeritud probleeme:

- 1) Tüüp I (vale-positiivne) viga: statistiliselt oluline (*significant*) assotsiatsioon fenotüübi ja polümorfismi vahel tuleneb kontrollide ja patsientide juhuslikust valikust. Selle probleemi tekkimise võimalus tõuseb, kui kasutatakse väikest hulka kontrole ja patsiente.
- 2) Tüüp II (vale-negatiivne) viga: uurimustöö tulemuste õigsus sõltub selle statistilisest võimsusest. Statistiline võimsus sõltub, kuhu on asetatud olulisuse tase (*significance level*, α), valimi suurusest, riskifaktori esinemisest kontrollide hulgas ja riskifaktori poolt tingitud relatiivsest riskist.
- 3) Publikatsiooni mõjutusfaktor: positiivseid tulemusi (nii õigeid kui valesid) publitseeritakse tihedamini kui negatiivseid, tekitades moonutatud mulje, et huvipakkuval fenotüübil on mingi geneetiline põhjuslikkus.
- 4) Populatsiooni kihistumine: sellisel juhul kontrollid ja patsiendid erinevad mitte ainult fenotüübi ja seda põhjustava geneetilise riski komponentide poolest, aga ka üldise geneetilise tausta poolest.
- 5) Heterogeensus: päranduv fenotüüp võib olla põhjustatud erinevatest omavahel interakteeruvatest keskkonna ja/või geneetilistest riskifaktoritest, mille tõttu ükski testitud marker ei ole piisavalt haigusega seotud hoolimata tähelepanu all oleva fenotüübi üldisest pärandumisest (Cardon & Bell, 2001; Sullivan *et al.*, 2001).

Antud töös saadud tulemusi võisid oletatavalt mõjutada kõik mainitud veatüübid. Mitmed komplekshaiguste uuringud on näidanud, et assotsiatsiooni leidmine ühe haigusseoselise markeri (nt. SNP alleeli) ja haiguse vahel ei pruugigi õnnestuda ning uuringu võimsuse tagamiseks ja assotsiatsiooni tundlikuks detekteerimiseks oleks vaja laiendatud markerite haplotüüpi ehk haplotüpeerimist (Clayton & Jones; 1999; Fallin *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2002).

5.3 Haplotüübianalüüs

Haplotüübianalüüs koosneb kahest etapist – esialgne lookuspaaridevaheline LD analüüs on eelduseks järgnevale haplotüübianalüüsile. Genotüüpse LD arvutamise null-hüpoteesiks H_0 oli: ühe lookuse genotüübid on sõltumatud teise lookuse genotüüpidest. Geenisiseste haplotüüpide arvutamise null-hüpoteesiks (H_0) oli: ühe lookuse genotüübid (haplotüübid) on sõltumatud teiste lookuste genotüüpidest (haplotüüpidest).

5.3.1 IL-24 geeni haplotüübianalüüs

Analüüsitud SNP-d IL-24 geenist olid omavahel peaaegu täielikult aheldunud. Haplotüübianalüüsil leiti, et haplotüüp GGGT võib olla limiteeritud psoriaasi vormi riskihaplotüüp (Tabel 10). Ükski haplotüüp ei omanud statistiliselt olulist efekti naastulisele psoriaasile üldiselt. Kuna nii assotsiatsioonianalüüsil kui ka haplotüübianalüüsil limiteeritud psoriaasi vormiga patsientidega saadud tulemused ei peegeldunud PASI ≤ 20 patsientidega saadud tulemustes, siis käesolevas töös leitud statistiliselt olulised assotsiatsioonid ei tundu olevat tõesed. Ainult nahapinna hõivatuse määr psoriaasi kollete poolt ei ole ilmselt piisav kriteerium hindamaks psoriaasi ägedust. Veelgi enam, arvestades psoriaasi patogeneesi iseärasusi, võib arvata, et kollete ulatust nahal määravad pigem keskkonnafaktorid kui geneetiline taust. Seega ei näita saadud andmed tegelikult IL-24 geeni ja selle polümorfismide osalemist naastulise psoriaasi ja selle alatüüpide geneetilise eelsoodumuse tekitamisel.

5.3.2 Laiendatud haplotüübianalüüs

Laiendatud haplotüübianalüüsi tulemusel leiti, et SNP rs1518108 IL-20 geenist on oluliselt aheldunud SNP-dega IL-24 geenist (Joonis 7). Kolm kombineeritud haplotüüpi (CAAAC, TGGGT, CGAGT) omasid naastulise psoriaasi vastuvõtlikkuse suhtes statistiliselt olulist protektiivset efekti (vastavalt $P=0,0002$, $P=0,04$ ja $P=0,04$) (Tabel 9). IL-24 geeni haplotüübi GGGT riskiefekt ei jäänud laiendatud haplotüübianalüüsil püsima (Tabel 10). Saadud tulemused toetavad hüpoteesi, et komplekshaiguste geneetikas mängivad olulist rolli ka protektiivsed haplotüübid. Näiteks mitmete autoimmuunhaiguste nagu diabeet 1, reumatoidartriidi ja süsteemse erütematoosse luupuse korral on juba näidatud, et HLA süsteemi geenides olevad haplotüübid võivad omada protektiivset efekti autoimmuunhaiguste suhtes (Gibson & Froguel, 2004; Laivoranta-Nyman *et al.*, 2004; Camargo *et al.*, 2004). Lisaks on näidatud, et teatud HLA süsteemi haplotüübid omavad protektiivset efekti ka psoriaasi suhtes (Kim *et al.*, 2000; Choonhakarn *et al.*, 2002; Contu *et al.*, 2004). Väljaspool HLA süsteemi esinevaid protektiivseid haplotüüpe ei ole psoriaasi puhul seni kirjeldatud.

Käesoleva töö tulemused viitavad asjaolule, et psoriaasi kujunemisega seotud haplotüübid võivad olla populatsioonis kõrge esinemissagedusega (Tabel 8) ning assotsieerunud immuunsüsteemis esineva normaalse varieeruvusega. See toetab omakorda komplekshaiguste puhul kehtivat *common variant/common disease* (levinud variatsioon/levinud haigus) hüpoteesi. Antud hüpoteesi sisuks ongi see, et komplekshaigusi põhjustavad geneetilised variandid, mis on üldpopulatsioonis kõrge esinemissagedusega (Zondervan & Cardon, 2004).

Praeguse seisukoha järgi sisaldab inimese genoom suures osas haplotüübiblokke (Cardon & Abecasis, 2003; Kauppi *et al.*, 2004). LD tõttu tekkivaid haplotüübiblokke on tsütokiinide klastrites varemgi näidatud (Rioux *et al.*, 2000; Hafler & Jager, 2005). Toetudes varasematele tulemustele (Kõks *et al.*, 2004) ja käesolevas uurimustöös saadud tulemustele, leiti, et inimese kromosoomis 1q32 IL-19, IL-20 ja IL-24 geene hõlmavas 67 264 aluspaarilises regioonis moodustub kaks haplotüübiblokki (Joonis 7). Leitud haplotüübiblokkide piirid langevad üldjoontes kokku *HapMap* projekti CEPH-i populatsiooni andmetega (www.hapmap.org). Nii esimesest haplotüübiblokist (30 kb) kui ka teisest haplotüübiblokist (31 kb) leiti 5

enamlevinud haplotüüpi. Haplotüübi-fenotüübi vahelist assotsiatsiooni hinnates on leitud, et üks haplotüüp (CACCGGAA) blokist 1 on seotud naastulise psoriaasi geneetilise vastuvõtlikkusega (Kõks *et al.*, 2004) ja praeguses töös leiti, et kolm haplotüüpi blokist 2 (CAAAC, TGGGT, CGAGT) omavad naastulise psoriaasi kujunemise suhtes protektiivset efekti.

Saadud tulemused osutavad sellele, et erinevad lookused IL-19 alamperekonna geenides omavad erinevat efekti psoriaasi vastuvõtlikkusele. IL-19, IL-20 ja IL-24 geenide üksikud polümorfismide variandid ja (laiendatud) haplotüübid võivad seotud olla näiteks antud tsütokiinide erinevate ekspressioonitasemetega. Võib oletada, et naastulise psoriaasi riskihaplotüüp (CACCGGAA) esimesest haplotüübiblokist tõstab IL-20 ekspressioonitaset ja kolm protektiivset haplotüüpi teisest haplotüübiblokist (CAAAC, TGGGT, CGAGT) alandavad IL-20 ekspressioonitaset. Varem on näidatud, et tsütokiini IL-20 üleekspressioneerivate transgeensete hiirte nahale tekivad kolded, mis sarnanevad histoloogiliselt psoriaasi kolletega. Lisaks, IL-20 retseptori α ja β subühikud on psoriaasi koldes oluliselt üleekspressioneeritud võrreldes normaalse nahaga. Nende subühikute mRNA-d on üleekspressioneeritud nii keratinotsüütides, endoteeli rakkudes, kui immuunsüsteemis osalevates rakkudes, mis kõik mängivad olulist rolli psoriaasi patogeneesis (Blumberg *et al.*, 2001).

Tsütokiini IL-20 võib keskele kohale asetada ka seetõttu, et on näidatud olulisi assotsiatsioone IL-20 geeni potentsiaalsetes regulaatoralades paiknevate SNP-de ja psoriaasi vahel (Kõks *et al.*, 2004). Lisaks omasid IL-20 geeni promootoralas paikneva SNP rs2981572 alleel G ja IL-20 3' UTR-is paikneva SNP rs1518108 alleel C statistiliselt olulist efekti vastavalt IL-19/IL-20 ja IL20/IL-24 laiendatud haplotüüpidele. Samas ei omanud ükski SNP ega haplotüüp IL-24 geeni sees efekti haigusfenotüübile.

Kuna käesolevas töös ei leitud assotsiatsioone naastulise psoriaasi ägeduse (PASI skoori alusel) ning IL-24 geeni üksikute polümorfismide või leitud (kombineeritud) haplotüüpide vahel, siis on alust arvata, et IL-24 geeni polümorfismid ning haplotüübid ei osale psoriaasi ägeduse determineerimisel. Probleem võis olla ka selles, et patsiendid jagati liiga kõrge PASI skoori (20) alusel gruppidesse – patsientide jagamine madalama skoori alusel võib anda teistsugused statistiliste analüüside tulemused.

Et kinnitada IL-19, IL-20 ja IL-24 geenide osalemist naastulise psoriaasi geneetilise vastuvõtlikkuse kujunemisel, tuleks teha täiendavalt perekonnal põhinevaid uuringuid, assotsiatsiooniuuringuid erinevates populatsioonides ning antud tsütokiinide funktsioonide uuringuid.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaates käsitletakse lähemalt komplekshaigusi ja nende omadusi, komplekshaiguste kaardistamise võimalusi ning ühenukleotiidsed polümorfisme. Lisaks antakse ülevaade naastulisest psoriaasist, selle patoloogiast ning tutvustatakse psoriaasiga seostatavat tsütokiini interleukiini 24.

Töö praktilises osas genotüpeeriti tetra-praimer ARMS-PCR meetodiga 402 indiviidi Eesti populatsioonist, kellest 254 olid naastulise psoriaasi diagnoosiga patsiendid ning 148 kontrollindiviidid. Patsiendid jagati vastavalt diagnoosile veel 9 uuringurühma: varase ja hilise algusega psoriaasi patsiendid, perekondliku ja sporaadilise vormiga psoriaasi patsiendid, PASI ≤ 20 ja PASI > 20 patsiendid ning patsiendid, kellel psoriaasi kolded hõivasid $\leq 10\%$, 11-30% või $> 31\%$ nahast. Genotüpeeriti 5 polümorfismi IL-24 geenist. Saadud genotüüpidega viidi läbi assotsiatsioonitestid, 4 polümorfismiga ka LD analüüs ja haplotüübianalüüs. Hiljem võeti haplotüübianalüüsidesse ka 1 SNP IL-20 geenist.

Assotsiatsiooni- ja haplotüübianalüüs IL-24 geeni polümorfismidega ei näidanud ühtegi statistiliselt olulist ja samas usaldusväärset seost polümorfismide/haplotüüpide ja naastulise psoriaasi vahel. LD analüüsi tulemusena selgus, et SNP rs1518108 IL-20 geenist on oluliselt aheldunud IL-24 geeni polümorfismidega. IL-20/IL-24 kombineeritud haplotüübianalüüsil leiti, et kolm haplotüüpi (CAAAC, TGGGT, CGAGT) omasid statistiliselt olulist protektiivset efekti nii naastulise psoriaasi suhtes üldiselt kui ka teatud naastulise psoriaasi alatüüpide suhtes. LD analüüsi põhilise tulemusena näidati, et IL-19, IL-20 ja IL-24 geene hõlmav regioon koosneb kahest haplotüübiblokist (30 kb ja 31 kb), mille haplotüübid omavad vastandlikke efekte psoriaasi vastuvõtlikkuse suhtes.

Käesolevas töös saadud tulemuste põhjal võib oletada, et IL-24 geeni polümorfismid ei osale otseselt naastulise psoriaasi geneetilise vastuvõtlikkuse tekitamisel. Küll aga võivad kombineeritud IL-20/IL-24 haplotüübid moduleerida IL-20 ekspressioonitaset ja seeläbi vastuvõtlikkust psoriaasile. Et kinnitada IL-19 alamperekonna geenide võimalikku osalust naastulise psoriaasi kujunemisel, tuleks läbi viia perekondadel põhinevad analüüsid ja assotsiatsioonianalüüsid ka teistes populatsioonides. Olulist selgust tooksid ka IL-19 alamperekonna tsütokiinide ja nende geenide funktsiooniuuringud seoses naastulise psoriaasiga.

SUMMARY

Possible relations between the polymorphisms of the genes of interleukin 20 and interleukin 24 and plaque-type psoriasis

Psoriasis is a common inflammatory skin disease with a prevalence of 2-3% in general population. Family studies have suggested that psoriasis has a complex mode of inheritance involving the interaction of multiple genes in combination with environmental factors. 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. Association studies involving candidate genes are preferable for searching allelic variants carrying genetic predisposition to the disease. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) as the most abundant genomic variations are favourable markers for association studies.

There is increasing evidence to suggest that cytokines of the interleukin 10 (IL-10) family, IL-10 itself and the three homologues – IL-19, IL-20 and IL-24 – have a role in the function of epidermis and in development of psoriasis. Polymorphisms in IL-24 gene have not been investigated in complex diseases up to now. The aim of the present study was to elucidate the role of the IL-24 gene in predicting risk for plaque-type psoriasis and to describe the linkage disequilibrium (LD) pattern emerging from the genes of IL-19, IL-20 and IL-24.

We performed a case-control association study with 5 genetic variants in the interleukin 24 gene, using tetra-primer ARMS-PCR for genotyping. 254 unrelated patients with plaque-type psoriasis and 148 unrelated control individuals were recruited from Estonian population.

Authentic association between the SNPs or haplotypes of the IL-24 gene and plaque-type psoriasis was not found. LD analysis indicated that SNP rs1518108 from the IL-20 was in LD with the polymorphisms of the IL-24 gene. Moreover, statistically significant protective effect of the combined haplotype of IL-20 and IL-24 genes CAAAC to plaque-type psoriasis was established (OR=0,154, P=0,0002).

Protective effect to psoriasis was also observed with haplotypes TGGGT (OR=0,591, P=0,04) and CGAGT (OR=0,457, P=0,04). After performing a comprehensive analysis using previously published data (regarding IL-19 and IL-20 SNPs) together with the data of IL-24 SNPs, we identified two haplotype blocks within the region q32 of chromosome 1. While the IL-20/IL-24 extended haplotype CACCGGAA is a significant factor contributing susceptibility to psoriasis (previously published data), IL-20/IL-24 haplotypes CAAAC, TGGGT and CGAGT have a significant protective effect.

The results of the present study indicate that different loci within the chromosome 1q32 possess different effects in genetic predisposition to plaque-type psoriasis. It seems that individual polymorphisms of the IL-24 gene are not associated with the susceptibility to psoriasis. Further family-based studies and association studies in different populations, functional studies as well, are required to confirm the impact of the IL-19, IL-20 and IL-24 genes in the genetic predisposition to psoriasis.

TÄNUAVALDUSED

Magistriöö valmimise puhul soovin kõige enam tänada juhendajaid Sulev Kõks'i ja dotsent Ants Kurg'e. Lisaks professor Andres Metspalu mõistva suhtumise eest ning professor Eero Vasar'at TÜ Füsioloogia Instituudist, kelle juhitas õppetoolis antud töö teoks sai. Olen väga tänulik dr. Külli Kingo'le heade nõuannete ja minu magistritöö kaasjuhendamise eest. Hindan väga ka Ranno Rätsep'a ja Tiit Nikopensius'e abi. Suur tänu ka kõigile teistele õppetooli inimestele abi ja meeldiva töökeskkonna loomise eest.

Antud uuring finatseeriti EV Haridus-ja Teadusministeeriumi sihtfinantseeritavate grantide nr. 0182128s02 (TARNH2128) ja nr. 0182584Bs03 (TARFS0416), Eesti Teadusfondi grantide nr. 5712 ja nr. 5688 ning Molekulaarse ja kliinilise meditsiini keskuse grandide VARMC-TIPP poolt.

VIITED

- Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. 2002.** Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 3: 299-309.
- Asadullah K, Sabat R, Wiese A *et al.* 1999.** Interleukin-10 in cutaneous disorders: implications for its pathophysiological importance and therapeutic use. *Arch Dermatol Res* 291: 628-636.
- Barbujani G, Magagni A, Minch E *et al.* 1997.** An apportionment of human DNA diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4516-4519.
- Barrett JC, Fry B, Maller J *et al.* 2005.** Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-265.
- Bickeboller H, Campion D, Brice A *et al.* 1997.** Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet* 60: 439-446.
- Biondi Oriente C, Scarpa R, Pucino A *et al.* 1989.** Psoriasis and psoriatic arthritis. Dermatological and rheumatological co-operative clinical report. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 146: 69-71.
- Blumberg H, Conklin D, Xu WF *et al.* 2001.** Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 104: 9-19.
- Bos JD, De Rie MA. 1999.** The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 20:40-46.
- Bos JD, Meinardi MM, van Joost T *et al.* 1989.** Use of cyclosporin in psoriasis. *Lancet* 2: 1500-1502.
- Bowcock AM. 2004.** Psoriasis genetics: the way forward. *J Invest Dermatol* 122: xv-xvii.
- Brandrup F, Holm N, Grunnet N *et al.* 1982.** Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol* 62: 229-236.
- Brookes AJ. 1999.** The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.
- Brookes AJ. 2003.** Single nucleotide polymorphism (SNP). pp.291-294. In: *Nature encyclopedia of the human genome*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Burmeister M. 1999.** Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biol Psychiatry* 45: 522-532.
- Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J *et al.* 2004.** Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun* 5: 609-614.
- Capon F, Munro M, Barker J *et al.* 2002.** Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol* 118: 745-751.
- Cardon LR, Abecasis GR. 2003.** Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 19: 135-140.
- Cardon LR, Bell JI. 2001.** Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2: 91-99.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002.** Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3: 285-298.
- Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N *et al.* 2002.** The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits

- immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol* 168: 6041-6046.
- Chada S, Mhashilkar AM, Ramesh R *et al.* 2004.** Bystander activity of Ad-mda7: human MDA-7 protein kills melanoma cells via an IL-20 receptor-dependent but STAT3-independent mechanism. *Mol Ther* 10: 1085-1095.
- Chakravarti A. 1999.** Population genetics – making sense out of sequence. *Nat Genet* 21: 56-60.
- Choonhakarn C, Romphruk A, Puapairoj C *et al.* 2002.** Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *Int J Dermatol* 41: 330-334.
- Christophers E. 2001.** Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 26: 314-320.
- Clayton D, Jones H. 1999.** Transmission/disequilibrium tests for extended marker haplotypes. *Am J Hum Genet* 65: 1161-1169.
- Collins A, Lonjou C, Morton NE. 1999.** Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15173-15177.
- Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. 1997.** Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278: 1580-1581.
- Contu L, Orru S, Carcassi C *et al.* 2004.** A psoriasis vulgaris protective gene maps close to the HLA-C locus on the EH18.2-extended haplotype. *Tissue Antigens* 64: 43-57.
- Dawson E, Abecasis GR, Bumpstead S *et al.* 2002.** A first-generation linkage disequilibrium map of human chromosome 22. *Nature* 418: 544-548.
- De La Vega FM, Dailey D, Ziegler J *et al.* 2002.** New generation pharmacogenomic tools: a SNP linkage disequilibrium Map, validated SNP assay resource, and high-throughput instrumentation system for large-scale genetic studies. *Biotechniques Suppl*: 48-50, 52, 54.
- Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D *et al.* 2001.** Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 167: 3545-3549.
- Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Mhashilkar AM *et al.* 2001.** Down-regulated melanoma differentiation associated gene (mda-7) expression in human melanomas. *Int J Cancer* 94: 54-59.
- Elder JT, Nair RP, Henseler T *et al.* 2001.** The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 137: 1447-1454.
- Fallin D, Cohen A, Essioux L *et al.* 2001.** Genetic analysis of case/control data using estimated haplotype frequencies: application to APOE locus variation and Alzheimer's disease. *Genome Res* 11: 143-151.
- Farber EM, Nall ML, Watson W. 1974.** Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol* 109: 207-211.
- Fickenscher H, Hor S, Kupers H *et al.* 2002.** The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 23: 89-96.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H *et al.* 2002.** The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225-2229.
- Gallagher G, Eskdale J, Jordan W *et al.* 2004.** Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol* 4: 615-626.
- Gibson F, Froguel P. 2004.** Genetics of the APM1 locus and its contribution to type 2 diabetes susceptibility in French Caucasians. *Diabetes* 53: 2977-2983.

- Glatt CE, Freimer NB. 2002.** Association analysis of candidate genes for neuropsychiatric disease: the perpetual campaign. *Trends Genet* 18: 307-312.
- Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. 2000.** Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet* 9: 2403-2408.
- Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H *et al.* 2004.** Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 135: 1-8.
- Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A *et al.* 2003.** 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: 233-235.
- Hacia JG, Fan JB, Ryder O *et al.* 1999.** Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 22: 164-167.
- Hafler DA, De Jager PL. 2005.** Applying a new generation of genetic maps to understand human inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 5: 83-91.
- Halushka MK, Fan JB, Bentley K *et al.* 1999.** Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22: 239-247.
- 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, Huffmeier U *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.
- Huang EY, Madireddi MT, Gopalkrishnan RV *et al.* 2001.** Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene* 20: 7051-7063.
- Isaksson A, Landegren U, Syvanen AC *et al.* 2000.** Discovery, scoring and utilization of human single nucleotide polymorphisms: a multidisciplinary problem. *Eur J Hum Genet* 8: 154-156.
- Ishihara 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.
- Jiang H, Lin JJ, Su ZZ *et al.* 1995.** Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 11: 2477-2486.
- Kamatani N, Sekine A, Kitamoto T *et al.* 2004.** Large-scale single-nucleotide polymorphism (SNP) and haplotype analyses, using dense SNP Maps, of 199 drug-related genes in 752 subjects: the analysis of the association between uncommon SNPs within haplotype blocks and the haplotypes constructed with haplotype-tagging SNPs. *Am J Hum Genet* 75: 190-203.
- Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S. 2004.** Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet* 5: 413-424.
- Kim TG, Lee HJ, Youn JI *et al.* 2000.** The association of psoriasis with human leukocyte antigens in Korean population and the influence of age of onset and sex. *J Invest Dermatol* 114: 309-313.
- Kingo K, Kōks S, Nikopensius T *et al.* 2004.** Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 5: 117-121.

- Kirby B, Griffiths CE. 2001.** Psoriasis: the future. *Br J Dermatol* 144 Suppl 58: 37-43.
- Krueger JG, Bowcock A. 2005.** Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2: ii30-36.
- Kruglyak L. 1999.** Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 22: 139-144.
- Kruglyak L, Nickerson DA. 2001.** Variation is the spice of life. *Nat Genet* 27: 234-236.
- Kõks S, Kingo K, Rätsep R et al. 2004.** Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 5: 662-667.
- Lai E. 2001.** Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res* 11: 927-929.
- Laivoranta-Nyman S, Mottonen T, Hermann R et al. 2004.** HLA-DR-DQ haplotypes and genotypes in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 63: 1406-1412.
- Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. 1998.** Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 8: 769-776.
- Lander ES, Schork NJ. 1994.** Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2048.
- Lebwohl M. 2003.** Psoriasis. *Lancet* 361(9364): 1197-1204.
- Nevitt GJ, Hutchinson PE. 1996.** Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 135: 533-537.
- Nickoloff BJ. 1991.** The cytokine network in psoriasis. *Arch Dermatol* 127: 871-884.
- Nickoloff BJ, Nestle FO. 2004.** Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113: 1664-1675.
- Ni X, Trakalo JM, Mundo E et al. 2002.** Linkage disequilibrium between dopamine D1 receptor gene (DRD1) and bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 52: 1144-1150.
- Nordborg M, Tavaré S. 2002.** Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *Trends Genet* 18: 83-90.
- Nowotny P, Kwon JM, Goate AM. 2001.** SNP analysis to dissect human traits. *Curr Opin Neurobiol* 11: 637-641.
- Orrù S, Giuressi E, Carcassi C et al. 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.
- Parrish-Novak J, Xu W, Brender T et al. 2002.** Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem* 277: 47517-47523.
- Pataer A, Vorburger SA, Barber GN et al. 2002.** Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). *Cancer Res* 62: 2239-2243.
- Raychaudhuri SP, Gross JA. 2000.** Comparative study of pediatric onset psoriasis with adult onset psoriasis. *Pediatr Dermatol* 17: 174-178.
- Raymond M, Rousset F. 1995.** GENEPop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 86: 248-249.

- Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ *et al.* 2000.** Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 66: 1863-1870.
- Risch NJ. 2000.** Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405: 847-856.
- Risch N, Merikangas K. 1996.** The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- Romer J, Hasselager E, Norby PL *et al.* 2003.** Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol. *J Invest Dermatol* 121: 1306-1311.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC *et al.* 2001.** A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933.
- Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW *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: 1401-1405.
- Sauane M, Gopalkrishnan RV, Lebedeva I *et al.* 2003.** Mda-7/IL-24 induces apoptosis of diverse cancer cell lines through JAK/STAT-independent pathways. *J Cell Physiol* 196: 334-345.
- Schaefer G, Venkataraman C, Schindler U. 2001.** Cutting edge: FISP (IL-4-induced secreted protein), a novel cytokine-like molecule secreted by Th2 cells. *J Immunol* 166: 5859-5863.
- Schlaak JF, Buslau M, Jochum W *et al.* 1994.** T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102: 145-149.
- Soo C, Shaw WW, Freymiller E *et al.* 1999.** Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. *J Cell Biochem* 74: 1-10.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA *et al.* 2001.** Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 293: 489-493.
- Sullivan PF, Eaves LJ, Kendler KS *et al.* 2001.** Genetic case-control association studies in neuropsychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 58: 1015-1024.
- Syvänen AC. 2001.** Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2: 930-942.
- Teraoka Y, Naruse TK, 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.
- Zhao Z, Boerwinkle E. 2002.** Neighboring-nucleotide effects on single nucleotide polymorphisms: a study of 2.6 million polymorphisms across the human genome. *Genome Res* 12: 1679-1686.
- Zhao Z, Fu YX, Hewett-Emmett D *et al.* 2003.** Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene* 312: 207-213.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. 2002.** Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3: 391-397.
- Thompson EA, Neel JV. 1997.** Allelic disequilibrium and allele frequency distribution as a function of social and demographic history. *Am J Hum Genet* 60: 197-204.

- Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S *et al.* 2002.** Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 11: 2015-2023.
- Tregouet DA, Tiret L. 2004.** Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. *Eur J Hum Genet* 12 :971-974.
- Tsui C, Coleman LE, Griffith JL *et al.* 2003.** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map to gaps in the human SNP map. *Nucleic Acids Res* 31: 4910-4916.
- Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I *et al.* 1995.** Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 16: 145-149.
- Veal CD, Capon F, Allen MH *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: 554-654.
- Wang M, Liang P. 2005.** Interleukin-24 and its receptors. *Immunology* 114: 166-170.
- Wang M, Tan Z, Zhang R *et al.* 2002.** Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J Biol Chem* 277: 7341-7347.
- Wright AF, Carothers AD, Pirastu M. 1999.** Population choice in mapping genes for complex diseases. *Nat Genet* 23: 397-404.
- Ye S, Dhillon S, Ke X *et al.* 2001.** An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29: E88.
- Yu A, Zhao C, Fan Y *et al.* 2001.** Comparison of human genetic and sequence-based physical maps. *Nature* 409: 951-953.
- Zondervan KT, Cardon LR. 2004.** The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 5: 89-100.

Avaldatud artikli äratrükk

Kõks S, Kingo K, Vabrit K, Rätsep R, Karelson M, Silm H, Vasar E.

Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis.

Genes and Immunity, May 12, 2005.

FULL PAPER

Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis

S Kõks^{1,3}, K Kingo^{2,3}, K Vabrit^{1,3,4}, R Rätsep^{1,3,5}, M Karelson², H Silm² and E Vasar^{1,3}

¹Department of Physiology, University of Tartu, Estonia; ²Department of Dermatology and Venerology, University of Tartu, Estonia;

³Centre of Molecular and Clinical Medicine, University of Tartu, Estonia; ⁴Department of Biotechnology, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Estonia; ⁵Institute of Zoology and Hydrobiology, University of Tartu, Estonia

The aim of present study was to elucidate the role of the interleukin (IL)-24 gene in predicting risk for plaque-type psoriasis and to describe the linkage disequilibrium (LD) pattern emerging from the genes of IL-19, IL-20 and IL-24. Genes encoding IL-19, IL-20 and IL-24 locate in the region q32 of chromosome 1. The association between the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) or haplotypes of the IL-24 gene and the susceptibility of psoriasis was not found. However, a significant protective effect of the combined haplotype CAAAC of IL-20 and IL-24 genes against plaque-type psoriasis was established (OR 0.154). Protective effect against psoriasis was also observed with haplotype TGGGT (OR 0.591) and haplotype CGAGT (OR 0.457). Performing a comprehensive analysis using the data regarding SNPs of IL-24 gene together with the previously published data regarding IL-19 and IL-20 SNPs, we identified two haplotype blocks within the region q32 of chromosome 1. The main result of the present study is that while the IL-19/IL-20 extended haplotype CACCGGAA is a significant susceptibility factor for psoriasis (previous study), IL-20/IL-24 haplotypes CAAAC, TGGGT and CGAGT have a significant protective effect. Nevertheless, family-based studies are required to confirm the impact of IL-19, IL-20 and IL-24 genes in the genetic predisposition for psoriasis.

Genes and Immunity advance online publication, 12 May 2005; doi:10.1038/sj.gene.6364216

Keywords: interleukin-24; single-nucleotide polymorphism (SNP); plaque-type psoriasis; association; haplotype analysis

Introduction

Psoriasis is an ancient and universal inflammatory disease, initially described at the beginning of medicine in the *Corpus Hippocraticum*. Hippocrates used the term *psora*, meaning 'to itch'. For centuries psoriasis was described as a variant of leprosy and was regarded as contagious until Von Hebra identified it as a distinct disease entity.¹

Psoriasis (OMIM 177900) is defined as a common inflammatory skin disorder of unknown etiology.² This chronic skin disorder is supposed to be a T-cell-mediated autoimmune disease with similarities to other complex autoimmune disorders (AIDs) such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease and diabetes. The resemblances of psoriasis to other AIDs are the distinct role of genetic and environmental factors, variable age of onset, the great variability of the tissue reaction with different degrees of activity, extent of body involvement and frequency of relapses. In contrast to other organ-specific AIDs, which demonstrate an increasing prevalence rate, no significant changes in incidence rates are reported in psoriasis. This

fact indicates that perhaps the environmental influence on the pathogenesis of psoriasis is less important than it is on the other autoimmune conditions mentioned above.³

The most potent genetic influence on susceptibility to several AIDs is the major histocompatibility complex (MHC). The highest risk to susceptibility to psoriasis has also been reported for a region located on the short arm of chromosome 6. In contrast to other AIDs that are mostly linked to a certain class II human leukocyte antigen (HLA) alleles, psoriasis is the only known chronic inflammatory disease that has a strong association with a region encoding HLA-C and specifically with the *HLA-Cw6* allele.^{4,5} The susceptibility region in chromosome 6 (PSORS1—psoriasis susceptibility 1) has refined to an approximately ~300 kb region around *HLA-C* gene and contains several candidate genes including *HLA-C*, octamer transcription factor-3 (*OTF3*), transcription factor-19 (*TCF19*), corneodesmosin (*CDSN*) and α -helix coiled-coil rod homolog (*HCR*) genes.^{6–9}

In addition, several non-MHC psoriasis susceptibility loci (1q21, 16q and 17q) associate with different AIDs such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, Crohn's disease and diabetes.¹⁰ This provides support for the hypothesis that susceptibility to different AIDs may be driven by the same susceptibility genes and immunopathways. Gene expression studies on involved psoriatic skin, uninvolved psoriatic skin and normal skin

Correspondence: Dr S Kõks, Department of Physiology, University of Tartu, 19 Ravila Street, Tartu 50411, Estonia.
E-mail: Sulev.Koks@ut.ee
Received 3 February 2005; revised 8 March 2005; accepted 22 March 2005

applying the Affimetrix Gene Chips identified 1338 genes with potential roles in the pathogenesis of psoriasis.¹¹ Many of these identified genes are known to be involved in immune response and proliferation.

Interleukin (IL)-10 gene cluster locates in a 200 kb region of chromosome 1 within the q31–32 locus and holds four genes: *IL-10*, *IL-19*, *IL-20* and *IL-24*.^{12–15} The relevance of *IL-10* gene polymorphisms has been demonstrated by their involvement in determining the susceptibility and/or the severity for a number of immune inflammatory diseases including rheumatoid arthritis,¹⁶ inflammatory bowel disease,¹⁷ systemic lupus erythematosus¹⁸ and severe asthma.¹⁹ We demonstrated previously that *IL-10* promoter polymorphisms influence clinical course of plaque-type psoriasis.²⁰ Hensen *et al*²¹ observed the protective effect of the microsatellite marker IL-10.G9 allele 3 from the *IL-10* promoter region to familial psoriasis.

The IL-10 family cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 form an individual subgroup named as IL-19 subfamily.²² The IL-19 subfamily is characterized by their amino-acid homologies and by the fact that all the members of this subfamily are able to bind to and signal through the IL-20 receptor beta chain. Binding of the IL-19 subfamily members to the IL-20 receptor activates the STAT pathway in cytokine-responsive cells.^{23,24} The role of IL-19 and IL-20 in the function of epidermis and in the pathogenesis of psoriasis has been established.^{13,25,26} Recent studies also indicate that the third member of the IL-19 subfamily—IL-24 (MDA-7)—might have a pathogenic role in psoriasis. The rat ortholog of the human IL-24 named as *c49a* has been found in fibroblast-like cells during skin wound healing.²⁷ Elevated expression of *c49a* gene before and during the proliferation phase of repairing indicate that *c49a* might promote cell proliferation. Several investigators have postulated that psoriatic plaques represent persistent reactions of wound healing.^{28,29} Moreover, the expression of IL-24 mRNA has been found in mononuclear cells located in the papillae and in the dense inflammatory areas in the subpapillary dermis in psoriatic lesions.²⁵ The production of IL-24 by the infiltrating monocytes in the dermis may initiate persistent activation of receptor and abnormal proliferation of keratinocytes in the epidermis. Abnormal proliferation of keratinocyte is crucial to the development of psoriasis.

We have previously screened polymorphisms in the *IL-19* and *IL-20* genes and identified an association between plaque-type psoriasis and extended haplotype CACCG GAA of *IL-19* and *IL-20* genes.³⁰ In the present study, we attempted to elucidate the role of the IL-24 gene in predicting risk for psoriasis and to describe the linkage disequilibrium (LD) pattern of the *IL-19*, *IL-20* and *IL-24* genes. The association and haplotype analyses of the *IL-24* gene were carried out. Furthermore, we performed the extended haplotype analysis of the *IL-24* polymorphisms and *IL-20* polymorphism rs1518108, which was not in LD with the other polymorphisms in the *IL-20* gene. No polymorphisms of the *IL-24* gene have been investigated in complex diseases up to the present time.

Results

The dbSNP database (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) search was performed to find out the single-nucleotide

polymorphisms (SNPs) of the *IL-24* gene in an initial study. The selection criteria for SNP inclusion were the following: frequency of minor allele higher than 10% and distance between SNPs approximately 1000–2000 bp. Only validated SNPs were included in the study. The selected SNPs were rs3762344, rs291111, rs1150253, rs1150256 and rs1150258 of the *IL-24* gene (Figure 1).

Genotype distributions of the analyzed polymorphisms of *IL-24* gene were in Hardy–Weinberg equilibrium. Allele frequencies and allelic *P*-values of *IL-24* SNPs in the plaque-type psoriasis and in different subtypes of psoriasis compared to the control group are presented in Table 1. Comparing psoriasis patients with controls, none of the analyzed *IL-24* SNPs showed statistically significant association with susceptibility to psoriasis. However, performing association analyses according to different psoriasis subtypes, the SNP rs1150253 showed statistically significant association with limited form of psoriasis (extent of body involvement $\leq 10\%$) relying on allelic *P*-value 0.02. The frequency of allele G was higher in psoriasis compared to the control group (54.4 and 42.2, respectively). Similarly, frequencies of minor alleles of SNPs rs3762344, rs1150256 and rs1150258 were higher in psoriasis patients with the extent of the eruption equal or below 10% of body involvement, but the differences were not statistically significant.

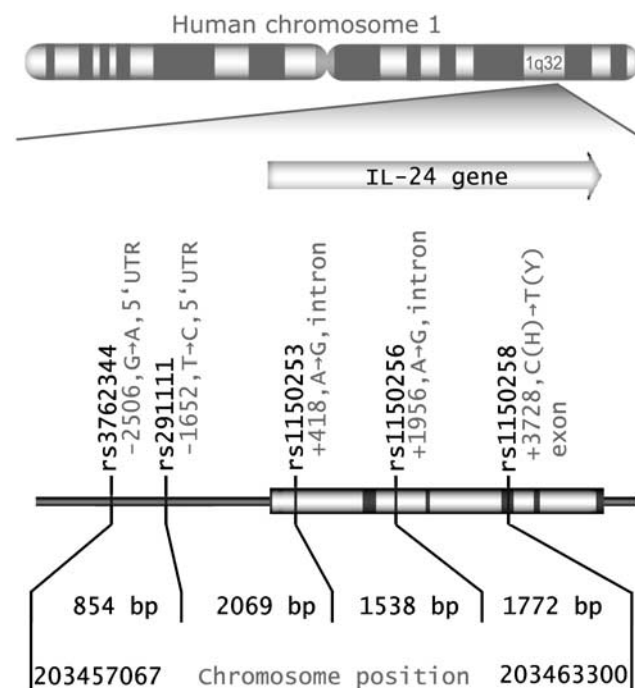


Figure 1 Selected SNPs of the *IL-24* gene. Selected SNPs are represented on the illustration by their cluster ID numbers in public SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Arrow represents the direction of transcription of *IL-24* gene. The position in reference to the starting site of *IL-24* coding region is shown for all SNPs and for first and last SNP of the selected region reference chromosomal position is shown as given in public SNP database. Coding region of the *IL-24* gene is shown as a box (dark bands representing exons) on a horizontal bar, whereas the horizontal bar represents the noncoding region of illustrated fragment. For all SNPs, allelic variations are shown, and for single SNP (rs1150258) causing amino-acid change, the change caused by allelic variations is shown in parenthesis.

Table 1 Results of association analysis of *IL-24* gene SNPs in plaque-type psoriasis

	<i>rs3762344</i> Alleles (%)			<i>rs291111</i> Alleles (%)			<i>rs1150253</i> Alleles (%)			<i>rs1150256</i> Alleles (%)			<i>rs1150258</i> Alleles (%)		
	G	A	P-value	T	C	P-value	A	G	P-value	A	G	P-value	C	T	P-value
Controls (<i>n</i> = 148)	51.4	48.6	—	96.6	3.4	—	57.8	42.2	—	51.7	48.3	—	51.4	48.6	—
Psoriasis patients (<i>n</i> = 254)	47.2	52.8	0.28	98.0	2.0	0.24	51.6	48.4	0.08	47.4	52.6	0.24	47.2	52.8	0.28
Early-onset psoriasis (<i>n</i> = 180)	48.3	51.7	0.49	98.3	1.7	0.21	52.2	47.8	0.16	48.3	51.7	0.42	47.8	52.2	0.39
Late-onset psoriasis (<i>n</i> = 74)	44.7	55.3	0.20	97.3	2.7	0.78	50.0	50.0	0.12	45.3	54.7	0.23	46.0	54.1	0.33
Familial psoriasis (<i>n</i> = 101)	46.0	54.0	0.28	97.5	2.5	0.61	52.0	48.0	0.15	45.5	54.5	0.19	45.0	55.0	0.16
Sporadic psoriasis (<i>n</i> = 153)	48.0	52.0	0.47	98.4	1.6	0.20	52.0	48.0	0.17	48.7	51.3	0.46	48.7	51.3	0.57
PASI ≤ 20 (<i>n</i> = 151)	47.7	52.3	0.41	98.1	1.9	0.31	51.3	48.7	0.12	47.1	52.9	0.28	47.5	52.5	0.36
PASI > 20 (<i>n</i> = 85)	47.9	52.1	0.29	97.9	2.1	0.58	52.1	47.9	0.22	47.9	52.1	0.45	46.9	53.1	0.35
Extent ≤ 10% (<i>n</i> = 66)	41.7	58.3	0.07	98.5	1.5	0.36	45.6	54.4	0.02*	42.6	57.4	0.09	42.6	57.4	0.09
Extent 11–30% (<i>n</i> = 76)	48.0	52.0	0.56	96.8	3.2	1.00	51.9	48.1	0.23	46.8	53.2	0.39	47.4	52.6	0.48
Extent ≥ 31% (<i>n</i> = 94)	50.0	50.0	0.78	98.6	1.4	0.25	55.1	44.9	0.55	50.9	49.1	0.93	50.0	50.0	0.79

Allele frequencies of the five studied polymorphisms of the *IL-24* gene were compared between the psoriasis patients and the controls, *P*-values for allelic association were calculated using Fisher's exact test.

**P* < 0.05.

The haplotype analysis of *IL-24* gene was performed according to pairwise LD pattern in the pooled samples. We excluded SNP rs291111 from the haplotype analyses because the frequency of its minor allele was lower than 0.10. The pairwise LD matrix showed that the polymorphisms of the *IL-24* gene were in the nearly complete LD ($|D'|$ between 0.94 and 0.99). Four common haplotypes (HT1 AAAC, HT2 GGGT, HT3 GAGT and HT4 AGAC) each with the frequency ≥ 1% within *IL-24* gene were revealed, and in sum, these covered 98.24% of all possible marker combinations in the pooled samples. No significant association was observed concerning these common haplotypes in susceptibility to psoriasis (Table 2). However, we found that the subgroup of limited eruption (extent ≤ 10%) had a higher frequency of the haplotype HT2 GGGT (*P* = 0.05, OR 1.548, 95% CI 1.007–2.380) in comparison with the control group. The effect of rs1150253 allele G was marginally significant within the GGGT haplotypic background (*P* = 0.05, OR 3.508, 95% CI 0.978–12.582). As the susceptibility effect of haplotype GGGT was not observed in the subgroup of patients with PASI (Psoriasis Area and Severity Index) equal or below 20 (*P* = 0.26, OR 1.213 95% CI 0.865–1.700), this association seems not to be crucial. The determination of skin involvement only by the extent of eruption is probably insufficient for discrimination for psoriasis severity.

We demonstrated previously that the nearly complete LD ($|D'|$ between 0.88 and 0.99) existed between the polymorphisms rs2981572, rs2981573 and rs2232360 within the *IL-20* gene. Inversely, the *IL-20* rs1518108 polymorphism, which is located in the 3'-end of the *IL-20* gene, was not in LD with the other polymorphisms of the *IL-20* gene. In the individual evaluation of *IL-20* SNPs, we demonstrated that rs1518108 heterozygous genotype T/C had a protective effect against psoriasis (*P* = 0.03).³¹ As the *IL-24* gene follows the *IL-20* gene in the human genome, the LD analysis was performed between the *IL-20* rs1518108 and the polymorphisms of *IL-24* gene. The pairwise LD matrix indicated the significant LD ($|D'|$ between 0.61 and 0.79) (Figure 2).

The presence of five common haplotypes (HT1 TAAAC, HT2 CGGGT, HT3 TGGGT, HT4 CGAGT and

Table 2 Results of *IL-24* haplotype analysis and *IL-20/IL-24* extended haplotype analysis in plaque-type psoriasis

	Controls (<i>n</i> = 148)	Psoriasis patients (<i>n</i> = 254)	Haplotypic OR (95% CI)	P-value
<i>IL-24</i> haplotypes				
AAAC	48.2	46.2	*	
GGGT	39.4	47.6	1.241 (0.910–1.693)	0.17
GAGT	8.3	4.2	0.604 (0.311–1.173)	0.14
AGAC	2.8	0.03	—	—
<i>IL-20/IL-24</i> extended haplotypes				
TAAAC	38.4	44.7	*	
CGGGT	28.0	40.6	1.292 (0.887–1.884)	0.18
TGGGT	11.4	7.0	0.591 (0.356–0.981)	0.04
CGAGT	6.8	3.5	0.457 (0.215–0.974)	0.04
CAAAC	10.1	1.5	0.154 (0.059–0.411)	0.000186

Haplotype frequencies (%) and haplotypic ORs with their 95% CIs and *P*-values by comparison to the reference haplotype in plaque-type psoriasis compared with controls are indicated. Haplotype frequencies and haplotype–phenotype associations were estimated using maximum-likelihood method.

— Haplotype is too rare to estimate haplotypic OR value.

*Haplotype combining the most frequent alleles at each position is chosen as the reference haplotype.

HT5 CAAAC) each with frequencies ≥ 1% was found in the extended haplotype analysis. These haplotypes covered 96.39% of all possible haplotypes in the pooled samples.

The extended haplotype analysis pointed out that the control group had a significantly higher frequency of the haplotype HT5 CAAAC compared with psoriasis patients (*P* = 0.000186, OR 0.154, 95% CI 0.059–0.411). Similarly, the haplotype HT5 CAAAC was more frequent in the control group in comparison with the subgroup of early-onset psoriasis (*P* = 0.000346, OR 0.121, 95% CI 0.038–0.385) and late-onset psoriasis (*P* = 0.016721, OR 0.152, 95% CI 0.033–0.711), and also with familial (*P* = 0.007950, OR 0.059, 95% CI 0.007–0.477) and sporadic psoriasis (*P* = 0.001744, OR 0.179, 95% CI 0.061–0.525). The detected protective effect of the HT5

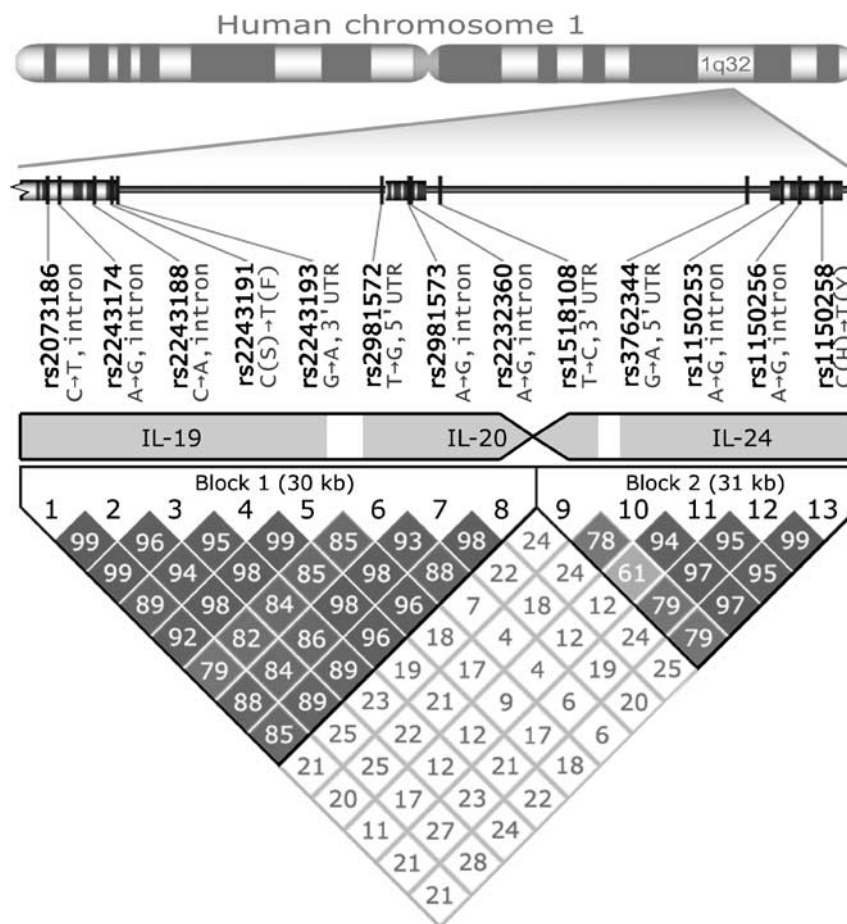


Figure 2 The extent of LD and formed haplotype blocks within the 67264 bp fragment of human chromosome 1q32, in a region of IL-19 subfamily genes are indicated. On the horizontal bar located below the illustration of chromosome 1 coding regions (horizontal boxes) and SNPs (vertical bars) are shown in proportion to illustrate their positions. With the SNP IDs displayed on the image, the information of allelic variations is included and if amino acid is changed, information of amino-acid replacement is included. The broad band below the SNP IDs is showing in which of the genes the SNPs occur (gene areas on the broad band do not reflect actual lengths of the genes human genome) and the narrowness of the band represents a recombination site. In order to establish the LD structure and for defining haplotype blocks within the region Haploview software was used. For better visibility the D' values shown on the squares have been multiplied by 100.

CAAAC mainly reflects an individual effect of the allele C of *IL-20* rs1518108 ($P = 0.000186$, OR 0.154, 95% CI 0.058–0.411).

The control group had a higher frequency of the HT3 TGGGT ($P = 0.04$, OR 0.591, 95% CI 0.356–0.981) compared with the psoriasis group. Comparing the subgroups of psoriasis, the HT3 TGGGT was more frequent in the control group only in comparison with the group of early-onset psoriasis ($P = 0.03$, OR 0.548, 95% CI 0.316–0.951) and sporadic psoriasis ($P = 0.03$, OR 0.523, 95% CI 0.295–0.925). A protective effect against psoriasis was also observed with haplotype HT4 CGAGT. The frequency of haplotype HT4 CGAGT was higher in control group in comparison with the whole psoriasis group ($P = 0.04$, OR 0.457, 95% CI 0.215–0.974) and with subgroups of early-onset psoriasis ($P = 0.05$, OR 0.430, 95% CI 0.185–0.998) and sporadic psoriasis ($P = 0.04$, OR 0.390, 95% CI 0.154–0.962).

The higher frequency of other two haplotypes—HT1 TAAAC and HT2 CGGGT—in the psoriasis group was observed, but the differences compared to controls were not statistically significant. Detailed results of the haplotype analysis of the *IL-24* gene and also results of

the extended haplotype analysis of the *IL-20* and *IL-24* genes are presented in Table 2.

The susceptibility effect of the *IL-24* haplotype GGGT in the subgroup of psoriasis with the extent of eruption equal or below 10% of body involvement did not withstand after extended haplotype analysis of the *IL-20* and *IL-24* polymorphisms (Table 3).

The LD analysis of the region comprising of *IL-19*, *IL-20* and *IL-24* genes revealed the existence of two haplotype blocks with a recombination site between SNPs rs2232360 and rs1518108 (Figure 2). The first haplotype block (30 kb) includes five SNPs across the *IL-19* gene (rs2243191, rs2073186, rs2243174, rs2243188 and rs2243193) and three SNPs from the *IL-20* gene (rs2981572, rs2981573 and rs2232360). The second haplotype block (31 kb) includes one SNP (rs1518108) from the *IL-20* gene and four SNPs across the *IL-24* gene (rs3762344, rs1150253, rs1150256 and rs1150258). Five common haplotypes were discovered within the both blocks. Within block 1, the haplotype CACCGGAA had susceptibility effect to psoriasis as we have demonstrated previously.³⁰ Within block 2, the three haplotypes

Table 3 Results of *IL-24* haplotype analysis and *IL-20/IL-24* extended haplotype analysis in the subgroup of patients with extent of eruption equal or below 10% of body involvement

<i>IL-24</i> haplotypes	Controls (<i>n</i> = 148)	Psoriatic patients with extent of the skin lesions ≤10% (<i>n</i> = 66)	Haplotypic OR (95% CI)	<i>P</i> -value
AAAC	48.1	40.8	*	
GGGT	39.3	53.7	1.548 (1.007–2.380)	0.046
GAGT	8.3	2.3	0.441 (0.119–1.641)	0.22
AGAC	2.5	0.06	—	—
<i>IL-20/IL-24</i> extended haplotypes				
TAAAC	38.0	37.4	*	
CGGGT	27.5	43.5	1.618 (0.975–2.685)	0.06
TGGGT	11.7	10.2	0.930 (0.467–1.852)	0.84
CAAAC	10.5	3.4	0.383 (0.099–1.471)	0.16
CGAGT	6.8	2.3	0.393 (0.097–1.591)	0.19

Haplotype frequencies (%) and haplotypic ORs with their 95% CIs and *P*-values by comparison to the reference haplotype in limited form of psoriasis compared with controls are indicated. Haplotype frequencies and haplotype–phenotype associations were estimated using maximum-likelihood method.

—Haplotype is too rare to estimate haplotypic OR value.

*Haplotype combining the most frequent alleles at each position is chosen as the reference haplotype.

CAAAC, TGGGT and CGAGT had protective effect to psoriasis (Table 2).

Discussion

The long arm of chromosome 1 has been of interest for mapping a susceptibility locus for psoriasis since the scan of one of the largest Italian pedigrees with psoriasis revealed the evidence for linkage to the 1cen-q21 markers.³² This locus has been termed as PSORS4 susceptibility locus. Additional LD analysis with cohort of 79 Italian triads proved the association between psoriasis and markers of chromosome 1q21 lying in the region of the Epidermal Differentiation Cluster.³³

There is a cluster of *IL-10* gene encoding the cytokines IL-10, IL-19, IL-20 and IL-24 on the long arm of region q31–32 of the same chromosome.³⁴ Three cytokines of the *IL-10* gene cluster—IL-19, IL-20 and IL-24—have also been represented as IL-19 subfamily cytokines.²² The exact biological functions of the IL-19 subfamily cytokines are still unknown, but several evidences indicate their role in the pathogenesis of psoriasis.

The overexpression of IL-20 induced lesions on transgenic mice similarly to the skin changes observed in psoriasis. The histological analysis of the skin of IL-20 transgenic mice showed hyperkeratosis, thickened epidermis and proliferation in the suprabasal layer resembling human psoriatic abnormalities. Immunohistochemical analysis of epidermal markers in transgenic mice demonstrated the expression of the differentiation and proliferation markers in the suprabasal layers, which are normally confined to the basal layer.¹³ The above-described changes in the skin appear to be caused by circulating IL-20, because even mice expressing the transgene in other tissues (liver) were similarly affected with described skin changes. In addition, both IL-20Rα

and IL-20Rβ receptor subunits are markedly upregulated in human psoriatic skin compared to normal skin.^{13,25} The upregulations of both IL-20 receptor subunit mRNAs are detected in keratinocytes as well as in endothelial cells and immune cells. These are the main cell types, which interact in the pathogenesis of psoriasis. IL-19 is the proinflammatory cytokine that is markedly elevated in psoriasis lesions and is strongly suppressed by administration of IL-4 during the improvement of psoriasis.³⁵ Since IL-19 shares with IL-20 the same receptor complex (type I IL-20R that is composed from IL-20Rα and IL-20Rβ subunits), this indicates that IL-19 may have partially overlapping biological activities with IL-20.

Recently a potential role of IL-24 (MDA-7) as a cytokine and its involvement in the immune system has been described. IL-24 mRNA was detected in human monocytes by RT-PCR. Its expression in monocytes was upregulated by stimulation of LPS and in T cells by the activation of anti-CD3 monoclonal antibody.³⁶ Treatment of PBMC with IL-24 causes the induction of IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-12 and GM-CSF.³⁷ For that reason, the IL-24 may be a member of a complex cascade of cytokines involved in inflammation. The finding that IL-24 binds to IL-20 receptor complexes (type I IL-20R that is composed from IL-20Rα and IL-20Rβ subunits and type II IL-20R that is composed from IL-20Rβ and IL-22R subunits) indicates that IL-24 is involved in the pathogenesis of psoriasis. Moreover, expression of IL-24 was detected in dermal infiltrate in psoriatic skin.²⁵ Since IL-24 together with IL-19 and IL-20 are expressed by monocytes, these cytokines could form innate immune pathways of psoriasis and play the part in the epidermal response to inflammation.

In our prior studies, we have determined the LD of *IL-19* and *IL-20* genes and established the extended haplotype CACCGGAA that was related to increased risk (OR 2.548) for psoriasis in the sample of unrelated patients.³⁰ The aim of present study was to search for additional psoriasis susceptibility loci in human *IL-10* gene cluster. For mapping disease loci, we used SNP markers because of their high variability, abundance and their low mutation rate.³⁸

The association analysis of the *IL-24* SNPs demonstrated that minor allele of *IL-24* rs1150253 is the presumable risk allele in the subgroup of patients with eruption equal or below 10% of body involvement. While several reports have indicated that in the detecting of associations the determination of haplotypes might offer more power than simple measuring of individual SNPs,^{39,40} we performed the LD analysis and haplotype analysis of the four polymorphic loci of *IL-24* gene. The nearly complete LD was detected between the polymorphisms within the *IL-24* gene. The results of haplotype analyses of the *IL-24* gene indicate that the *IL-24* haplotype GGGT could be the potential risk haplotype in subgroup of psoriasis with limited eruption (OR 1.548). Nevertheless, this finding is probably not crucial because it seems that the determination of psoriasis severity only by extent of eruption is not sufficient.

According to recent understandings, a large part of the human genome consists of the haplotype blocks.^{41,42} The block-like distribution of LD has also been observed in cytokine clusters.^{43,44} According to our previous³⁰ and

present results, we have verified the occurrence of two haplotype blocks within the 67 264 bp fragment of human chromosome 1q32, in the region of *IL-19* subfamily genes. The first haplotype block (30 kb) includes five SNPs across the *IL-19* gene and three SNPs from the *IL-20* gene. The second haplotype block (31 kb) includes one SNP from the *IL-20* gene and four SNPs across the *IL-24* gene (Figure 2). Out of all the possible haplotypes, five common haplotypes (frequency $\geq 1\%$) were observed within both blocks. Estimating the haplotype–phenotype association, we identified one haplotype within block 1 as being psoriasis susceptibility haplotype (CACCGGAA) and three haplotypes within block 2 as being protective haplotypes in psoriasis susceptibility (CAAAC, CGAGT and TGGGT). Our results indicate that the common haplotypes of disease risk may be associated with common immune variations that have the role in autoimmune disease, like psoriasis, therefore confirming the common variant/common disease hypothesis in complex diseases. This hypothesis presents that complex traits have underlying genetic variants that occur with a relatively high frequency.^{40,45}

The importance of examining extended haplotypes of gene clusters has been clearly demonstrated in several studies.^{46,47} In an analysis of *IL-20/IL-24* extended haplotypes, the susceptibility effect to psoriasis with limited eruption (extent equal or below 10%) of the *IL-24* haplotype GGGT did not withstand. Nevertheless, we found that the *IL-20/IL-24* extended haplotype CAAAC was associated with a significant protective effect against plaque-type psoriasis (OR 0.154). Protective effects against psoriasis were also observed with the extended haplotype TGGGT (OR 0.591) and with the extended haplotype CGAGT (OR 0.457). Our data maintained the concept of protective haplotypes in the genetics of complex diseases. The protective haplotypes of the HLA complex genes have been shown in several autoimmune diseases like diabetes, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.^{48–50} Similarly, certain HLA haplotypes have been shown to be protective in psoriasis.^{51–53} The knowledge about the non-MHC protective genes in psoriasis is insufficient at the present time. However, the existence of both susceptible and protective loci in plaque-type psoriasis has been demonstrated in the chromosome 19p13.⁵⁴

The results of the present study indicate that different loci within the chromosome 1q32 possess different effects in susceptibility to psoriasis. Alterations in expression levels of *IL-19*, *IL-20* and *IL-24* might be related to individual polymorphisms, haplotypes and extended haplotypes of *IL-19*, *IL-20* and *IL-24* genes. Supportive to this hypothesis is the fact that we found significant associations with *IL-20* SNPs that are located in the potential regulatory regions in the *IL-20* gene. More-

over, *IL-20* promoter rs2981572 allele G and *IL-20* 3'-UTR rs1518108 allele C had a significant individual effect in the context of *IL-19/IL-20* and *IL-20/IL-24* extended haplotypes. We suppose that the identified risk haplotype of the *IL-19* and *IL-20* genes (CACCGGAA) may be associated with higher *IL-20* expression level and the identified protective haplotypes of the *IL-20* and *IL-24* genes (CAAAC, CGAGT and TGGGT) may confer a lower level of *IL-20* expression. However, functional studies will be necessary to confirm the impact of the examined SNPs and haplotypes to psoriasis susceptibility.

In conclusion, we identified two haplotype blocks within the region of *IL-19* subfamily genes on human chromosome 1q32. While the *IL-19/IL-20* extended haplotype CACCGGAA within the first haplotype block is a significant susceptibility factor for psoriasis (previous study), then *IL-20/IL-24* haplotypes CAAAC, TGGGT and CGAGT within the second block have a significant protective effect. However, family-based studies and association studies of different populations are required to confirm the impact of the genes of *IL-19* subfamily in the genetic predisposition for psoriasis.

Materials and methods

We used a population identical to our previous studies for *IL-19* and *IL-20* gene investigations.^{30,31} The main characteristics of participants are shown in Table 4. Unrelated patients with plaque psoriasis from the Department of Dermatology, University of Tartu were divided into subgroups according to the age of disease onset and family history of psoriasis. The age of disease onset was defined as the age at which the patient first became aware of psoriatic skin lesions. Patients with disease onset below the age of 40 years were assigned as early-onset psoriasis, while patients with the onset of disease at the age of 40 and later years were referred to as late-onset disease. Patients were considered to have familial psoriasis if they had at least one first- or second-degree relative with psoriasis, and considered to have sporadic disease if they had no relatives with psoriasis.⁵⁵

The severity of psoriasis was quantified by the PASI.⁵⁶ The PASI scores were calculated on the basis of the degree of erythema, desquamation and infiltration of lesions combined with the surface extension. According to the PASI scores, the patients were divided into two groups—PASI equal or below 20 ($n=151$) and PASI above 20 ($n=85$). The higher PASI score represents a greater degree of psoriatic severity. Disease severity was also scored solely in terms of the extent of the skin lesions at the time of the examination. On the basis of the extent of eruption, the patients were divided into three

Table 4 Characteristics of study participants

	Total number of individuals	Sex female/male	Patients with family history	Age range (year)	Mean age of onset of psoriasis (year)
Psoriasis patients	254	119/135	101	18–89	30
Early-onset psoriasis patients	180	86/94	85	18–73	20
Late-onset psoriasis patients	74	33/41	16	43–89	53
Healthy controls	148	91/57	—	18–71	—

groups: the extent equal or below 10% ($n = 66$), the extent between 11 and 30% ($n = 76$) and the extent above 30% ($n = 94$) of psoriatic involvement of the body. We excluded the psoriasis patients who were treated with systemic antipsoriasis therapy at the time of the examination of the severity of psoriasis. Healthy volunteers, free from the positive family history of psoriasis, served as a control group. Individuals with a history of other dermatoses were not included in the control group. All the subjects enrolled in this study gave written informed consent for the study as indicated in the approval note by the Ethics Review Committee on Human Research of the University of Tartu.

Tetraprimer ARMS-PCR⁵⁷ was applied to detect allelic variations of chosen SNPs. This method employs two primer pairs to amplify, respectively, the two different alleles of an SNP in a single PCR reaction. Either of the allele-specific amplicons is generated using one allele-specific inner primer and one not allele-specific outer primer. Outer primers are also used to generate not allele-specific control product. Sets of four primers, specific to each SNP, were designed using online program available at http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. Each PCR reaction was carried out in a total volume of 20 μ l, containing 100 ng of template DNA, 20 pmol of each inner primer, 2 pmol of each outer primer, 0.2 mM dNTP, 1 $\times$ reaction buffer (75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Tween-20, 0.1 mg/ml Tartrazine, 1% sucrose; produced by Naxo, Tartu, Estonia), 0.5 U Smart-Taq DNA polymerase (also by Naxo, Tartu, Estonia). Sequences and

melting temperatures of primers, annealing temperatures for specific PCR reactions and optimized concentrations of Mg^{2+} used for genotyping of SNPs are shown in Table 5. Similar data for genotyping reactions of *IL-19* and *IL-20* was shown in our previous articles.^{30,31} To increase PCR reaction specificity, we applied touchdown cycles: initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 10 cycles of 1 min denaturation at 95°C, annealing at 10°C higher than annealing temperature (in Table 5) for 1 min (decreasing by 1°C per cycle) and extension at 72°C for 1 min. The following 25 cycles were performed at an appropriate annealing temperature, followed by the final extension at 72°C for 10 min. PCR products were separated on gel electrophoresis using 2% agarose gel and were visualized by ethidium bromide staining.

The direct sequencing of incidental DNA samples was performed using ABI Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for verification of the tetraprimer ARMS-PCR results and validation of the polymorphisms. The results of the tetraprimer ARMS-PCR were completely consistent with the results of direct sequencing.

Statistical analysis of the genotype-phenotype associations was performed using population genetics software package GENEPOP version 3.3.⁵⁸ For LD and haplotype analysis, the THESIAS software was used. Pairwise LD was estimated by a log-linear model and the extent of disequilibrium was expressed in terms of standardized D' characteristic. Haplotype analysis was performed using maximum-likelihood method for estimating simultaneously haplotype frequencies and haplotype-phenotype

Table 5 Sequences and melting temperatures of primers, annealing temperatures for specific PCR reactions and optimized concentrations of Mg^{2+} used for genotyping of SNPs of *IL-24* gene

Genetic polymorphism	Primers (5'-3')	T_m (°C)	Annealing temperature (°C)	Mg^{2+} (mM)	Amplicon size
<i>rs3762344</i> G/A					
Forward inner primer (A allele)	GTT CTC TCC TTG ACC TTC CTT CTG CAA	67	60	2.5	357 bp—control
Reverse inner primer (G allele)	CCT CCG ATG AGC TTA TCA TAG CAT TAT GAC	67			225 bp—G allele
Forward outer primer	CAG GTC ATC ACA TCC TCA TGG TCT TAT G	67			189 bp—A allele
Reverse outer primer	AAC AGA GGC ATG AGG TCA TGG ATA CAC	67			
<i>rs291111</i> T/C					
Forward inner primer (T allele)	AGT CAC AAC TAC TCA TCT CTG CCT CGG T	67	60	3.5	401 bp—control
Reverse inner primer (C allele)	GAC ATA TTG TTG CTA ATT GCT TTC GTG ATG	67			264 bp—C allele
Forward outer primer	GTG CCA GAG AGA TTG GGA AGA GTC TG	67			195 bp—T allele
Reverse outer primer	AGA ATG GCT TAA CCT TGC GAC CTA AGA G	67			
<i>rs1150253</i> A/G					
Forward inner primer (G allele)	TTG AGG GAG ATG CTA AAG CAT AGC CCA CG	73	63	2.5	399 bp—control
Reverse inner primer (A allele)	CCC CTG GGT TAT GGG TCA CGG GGT AT	73			249 bp—G allele
Forward outer primer	GCA TGA GCA TCA CTT GAA CCT GGT AGG CA	73			205 bp—A allele
Reverse outer primer	TCC TTC TTT CCT CTC TCG CTC CCT CCC T	73			
<i>rs1150256</i> A/G					
Forward inner primer (A allele)	AGA GAG CTA GAT TCA TCC AGG CTG CA	67	60	2.5	381 bp—control
Reverse inner primer (G allele)	AGA TTT AGA GCC GAA GAC TCT ATT CGG TAC	65			239 bp—G allele
Forward outer primer	GAG GGG ATG CTA TTT TAT GAT TCT GGA GT	66			198 bp—A allele
Reverse outer primer	TTT AAG AAC CAC TAT GGG CAG GAT TTT G	66			
<i>rs1150258</i> C/T					
Forward inner primer (C allele)	CTA CTT GAA AAC TGT TTT CAA AAC CC	60	60	2.5	412 bp—control
Reverse inner primer (T allele)	CCT GAC TTC AAC TGT TCT ATT GTG TTA	60			249 bp—C allele
Forward outer primer	CAC CTT CTA GAA GAT CCC TAT CTC TG	60			219 bp—T allele
Reverse outer primer	ATC CCC ATT TTA CAG ATA ACA AAC TG	60			

association as described by Tregouet *et al.*⁵⁹ The significance level of the tests for declaring a probability value as significant was set to 0.05.

Acknowledgements

This study was financially supported by the target-based funding from the Estonian Ministry of Education Grant No. 0182128s02 (TARNH2128) and the Estonian Science Foundation Grant Nos. 5712 and 5688 and by the Centre of Molecular and Clinical Medicine Grant VARMC-TIPP.

References

- Glickman FS. Lepra, psora, psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1986; **14**: 863–866.
- Camp RDR. Psoriasis. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM (eds). *Textbook of Dermatology*. Blackwell Science: Oxford, 1992, pp 1589–1649.
- Christophers E. Psoriasis—epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; **26**: 314–320.
- Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL *et al.* 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* 1997; **6**: 813–820.
- Nair RP, Henseler T, Jenisch S *et al.* Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1349–1356.
- Balendran N, Clough RL, Arguella JR *et al.* Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 1999; **113**: 322–328.
- Oka A, Tamiya G, Tomizawa M *et al.* Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 2165–2170.
- Veal CD, Capon F, Allen MH *et al.* 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* 2002; **71**: 554–564.
- Asumalahti K, Veal C, Laitinen T *et al.* Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 589–597.
- Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001; **2**: 802–809.
- Zhou X, Krueger JG, Kao MC *et al.* Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63 100-element oligonucleotide array. *Physiol Genom* 2003; **13**: 69–78.
- Kim JM, Brannan CI, Copeland NG *et al.* Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992; **148**: 3618–3623.
- Blumberg H, Conklin D, Xu WF *et al.* Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001; **104**: 9–19.
- Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J *et al.* Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun* 2000; **1**: 442–450.
- Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 1995; **11**: 2477–2486.
- Crawley E, Kay R, Sillibourne J *et al.* Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**: 1101–1108.
- Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V *et al.* Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 386–390.
- Gibson AW, Edberg JC, Wu J *et al.* Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001; **166**: 3915–3922.
- Shin HD, Winkler C, Stephens JC *et al.* Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 14467–14472.
- Kingo K, Kõks S, Silm H, Vasar E. IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun* 2003; **4**: 455–457.
- Hansen P, Asadullah K, Windemuth C *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphism IL10. G and familial early onset psoriasis. *Br J Dermatol* 2003; **149**: 381–385.
- Gallagher G, Eskdale J, Jordan W *et al.* Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol* 2004; **4**: 615–626.
- Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 2001; **167**: 3545–3549.
- Parrish-Novak J, Xu W, Brender T *et al.* Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor–ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem* 2002; **277**: 47517–47523.
- Romer J, Hasselager E, Norby PL *et al.* Epidermal overexpression of interleukin-19 and -20 mRNA in psoriatic skin disappears after short-term treatment with cyclosporine a or calcipotriol. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 1306–1311.
- Kotenko SV. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**: 223–240.
- Soo C, Shaw WW, Freymiller E *et al.* Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. *J Cell Biochem* 1999; **74**: 1–10.
- Otonne JP. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 1996; **135** (Suppl 49): 1–5.
- Piepkorn M, Pittelkow MR, Cook PW. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J Invest Dermatol* 1998; **111**: 715–721.
- Kõks S, Kingo K, Ratsep R *et al.* Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 2004; **5**: 662–667.
- Kingo K, Kõks S, Nikopoulou T, Silm H, Vasar E. Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes Immun* 2004; **5**: 117–121.
- Capon F, Novelli G, Semprini S *et al.* Searching for psoriasis susceptibility genes in Italy: genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol* 1999; **112**: 32–35.
- Capon F, Semprini S, Chimenti S *et al.* Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 2001; **116**: 728–730.
- Fickenscher H, Hor S, Kupers H *et al.* The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002; **23**: 89–96.
- Ghoreschi K, Mrowietz U, Rocken M. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J Mol Med* 2003; **81**: 471–480.
- Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002; **168**: 5397–5402.
- Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N *et al.* The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated

- gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol* 2002; **168**: 6041–6046.
- 38 Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 2002; **3**: 391–397.
- 39 Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 2004; **429**: 446–452.
- 40 Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 89–100.
- 41 Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet* 2003; **19**: 135–140.
- 42 Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 413–424.
- 43 Hafler DA, Jager PL. Opinion: applying a new generation of genetic maps to understand human inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 83–91.
- 44 Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ et al. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 1863–1870.
- 45 Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med* 2005; **56**: 303–320.
- 46 Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ et al. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1–IL1A–IL1B–IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 2004; **5**: 451–460.
- 47 Undlien DE, Lie BA, Thorsby E. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends Genet* 2001; **17**: 93–100.
- 48 Gibson F, Froguel P. Genetics of the APM1 locus and its contribution to type 2 diabetes susceptibility in French Caucasians. *Diabetes* 2004; **53**: 2977–2983.
- 49 Laivoranta-Nyman S, Mottonen T, Hermann R et al. HLA-DR-DQ haplotypes and genotypes in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; **63**: 1406–1412.
- 50 Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun* 2004; **5**: 609–614.
- 51 Contu L, Orru S, Carcassi C et al. A psoriasis vulgaris protective gene maps close to the HLA-C locus on the EH18.2-extended haplotype. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 43–57.
- 52 Choonhakarn C, Romphruk A, Puapairoj C et al. Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais. *Int J Dermatol* 2002; **41**: 330–334.
- 53 Kim TG, Lee HJ, Youn JI, Kim TY, Han H. The association of psoriasis with human leukocyte antigens in Korean population and the influence of age of onset and sex. *J Invest Dermatol* 2000; **114**: 309–313.
- 54 Hensen P, Windemuth C, Huffmeier U et al. Association scan of the novel psoriasis susceptibility region on chromosome 19: evidence for both susceptible and protective loci. *Exp Dermatol* 2003; **12**: 490–496.
- 55 Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; **13**: 450–456.
- 56 Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis—oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; **157**: 238–244.
- 57 Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: E88–8.
- 58 Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 1995; **86**: 284–295.
- 59 Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 2015–2023.

LISAD

Lisa 1. Praimerite järjestused ja sulamistemperatuurid. PCR-i reaktsioonitingimused ja amplikonide suurused iga polümorfismi genotüpeerimiseks.

Polümorfism		Praimerid (5' - 3')	T _m	Praimerite seondumise temperatuur	Mg ²⁺ (mM)	Amplikoni suurus
rs3762344 G→A	<i>Forward inner primer</i> (A alleel):	GTT CTC TCC TTG ACC TTC CTT CTG CAA	67°C	60°C	2,5	357 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (G alleel):	CCT CCG ATG AGC TTA TCA TAG CAT TAT GAC	67°C			225 bp - G alleel
	<i>Forward outer primer:</i>	CAG GTC ATC ACA TCC TCA TGG TCT TAT G	67°C			189 bp - A alleel
	<i>Reverse outer primer:</i>	AAC AGA GGC ATG AGG TCA TGG ATA CAC	67°C			
rs291111 T→C	<i>Forward inner primer</i> (T alleel):	AGT CAC AAC TAC TCA TCT CTG CCT CGG T	67°C	60°C	3,5	401 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (C alleel):	GAC ATA TTG TTG CTA ATT GCT TTC GTG ATG	67°C			264 bp - C alleel
	<i>Forward outer primer:</i>	GTG CCA GAG AGA TTG GGA AGA GTC TG	67°C			195 bp - T alleel
	<i>Reverse outer primer:</i>	AGA ATG GCT TAA CCT TGC GAC CTA AGA G	67°C			

Lisa 1 (järg).

Polümorfism		Praimerid (5' - 3')	T_m	Praimerite seondumise temperatuur	Mg²⁺ (mM)	Amplikoni suurus
rs1150253 A→G	<i>Forward inner primer</i> (G alleel):	TTG AGG GAG ATG CTA AAG CAT AGC CCA CG	73°C	63°C	2,5	399 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (A alleel):	CCC CTG GGT TAT GGG TCA CGG GGT AT	73°C			249 bp - G alleel
	<i>Forward outer primer:</i>	GCA TGA GCA TCA CTT GAA CCT GGT AGG CA	73°C			205 bp - A alleel
	<i>Reverse outer primer:</i>	TCC TTC TTT CCT CTC TCG CTC CCT CCC T	73°C			
rs1150256 A→G	<i>Forward inner primer</i> (A alleel):	AGA GAG CTA GAT TCA TCC AGG CTG CA	67°C	60°C	2,5	381 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (G alleel):	AGA TTT AGA GCC GAA GAC TCT ATT CGG TAC	65°C			239 bp - G alleel
	<i>Forward outer primer:</i>	GAG GGG ATG CTA TTT TAT GAT TCT GGA GT	66°C			198 bp - A alleel
	<i>Reverse outer primer:</i>	TTT AAG AAC CAC TAT GGG CAG GAT TTT G	66°C			
rs1150258 C→T	<i>Forward inner primer</i> (C alleel):	CTA CTT GAA AAC TGT TTT CAA AAC CC	60°C	60°C	2,5	412 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (T alleel):	CCT GAC TTC AAC TGT TCT ATT GTG TTA	60°C			249 bp - C alleel
	<i>Forward outer primer:</i>	CAC CTT CTA GAA GAT CCC TAT CTC TG	60°C			219 bp - T alleel
	<i>Reverse outer primer:</i>	ATC CCC ATT TTA CAG ATA ACA AAC TG	60°C			

Lisa 2. Assotsiatsioonitestide tulemused SNP-ga rs3762344 IL-24 geenist

rs3762344 G→A	Genotüübid (%)				Alleelid (%)		
	G/G	A/G	A/A	P-väärtus	G alleel	A alleel	P-väärtus
Kontrollid n=148	25,0	52,7	22,3	*	51,4	48,6	*
Naastuline psoriaas n=254	23,2	48,0	28,8	0,28	47,2	52,8	0,28
Varase avaldumisega psoriaas n=180	24,0	48,6	27,4	0,47	48,3	51,7	0,49
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	21,3	46,7	32,0	0,20	44,7	55,3	0,20
Perekondlik psoriaas n=101	21,8	48,5	29,7	0,27	46,0	54,0	0,28
Sporaadiline psoriaas n=153	24,2	47,7	28,1	0,45	48,0	52,0	0,47
PASI ≤20 n=151	24,5	46,4	29,1	0,41	47,7	52,3	0,41
PASI >20 n=85	28,3	53,4	18,3	0,27	47,9	52,1	0,29
Kollete ulatus ≤10% n=66	33,3	50,0	16,7	0,07	58,3	41,7	0,07
Kollete ulatus 11-30% n=76	30,3	43,4	26,3	0,55	52,0	48,0	0,56
Kollete ulatus >30% n=94	24,5	51,1	24,4	0,78	50,0	50,0	0,78

Lisa 3. Assotsiatsioonitestide tulemused SNP-ga rs291111 IL-24 geenist

rs291111 T→C	Genotüübid (%)				Alleelid (%)		
	T/T	T/C	C/C	P-väärtus	T alleel	C alleel	P-väärtus
Kontrollid n=148	94,6	4,0	1,4	*	96,6	3,4	*
Naastuline psoriaas n=254	96,1	3,9	0	0,29	98,0	2,0	0,24
Varase avaldumisega psoriaas n=180	96,7	3,4	0	0,26	98,3	1,7	0,21
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	94,7	5,3	0	0,81	97,3	2,7	0,78
Perekondlik psoriaas n=101	95,1	4,9	0	0,65	97,5	2,5	0,61
Sporaadiline psoriaas n=153	96,7	3,3	0	0,25	98,4	1,6	0,20
PASI ≤20 n=151	96,2	3,8	0	0,37	98,1	1,9	0,31
PASI >20 n=85	95,9	4,1	0	0,49	97,9	2,1	0,58
Kollete ulatus ≤10% n=66	97,1	2,9	0	0,43	98,5	1,5	0,36
Kollete ulatus 11-30% n=76	93,6	6,4	0	1	96,8	3,2	1
Kollete ulatus >30% n=94	97,2	2,8	0	0,23	98,6	1,4	0,25

Lisa 4. Assotsiatsioonitestide tulemused SNP-ga rs1150253 IL-24 geenist

rs1150253 A→G	Genotüübid (%)				Alleelid (%)		
	A/A	A/G	G/G	P-väärtus	A alleel	G alleel	P-väärtus
Kontrollid n=148	35,1	45,3	19,6	*	57,8	42,2	*
Naastuline psoriaas n=254	30,7	41,7	27,6	0,12	51,6	48,4	0,08
Varase avaldumisega psoriaas n=180	31,8	40,8	27,4	0,20	52,2	47,8	0,16
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	28,0	44,0	28,0	0,15	50,0	50,0	0,12
Perekondlik psoriaas n=101	30,7	40,6	28,7	0,17	52,0	48,0	0,15
Sporaadiline psoriaas n=153	30,7	42,5	26,8	0,19	52,0	48,0	0,17
PASI ≤20 n=151	31,2	40,2	28,6	0,14	51,3	48,7	0,12
PASI >20 n=85	29,9	44,3	25,8	0,24	52,1	47,9	0,22
Kollete ulatus ≤10% n=66	23,5	44,1	32,4	0,03	45,6	54,4	0,02
Kollete ulatus 11-30% n=76	33,3	37,2	29,5	0,30	51,9	48,1	0,23
Kollete ulatus >30% n=94	33,3	43,5	23,2	0,61	55,1	44,9	0,55

Lisa 5. Assotsiatsioonitestide tulemused SNP-ga rs1150256 IL-24 geenist

rs1150256 A→G	Genotüübid (%)				Alleelid (%)		
	A/A	A/G	G/G	P-väärtus	A alleel	G alleel	P-väärtus
Kontrollid n=148	25,0	53,4	21,6	*	51,7	48,3	*
Naastuline psoriaas n=254	24,4	46,1	29,5	0,28	47,4	52,6	0,24
Varase avaldumisega psoriaas n=180	25,1	46,4	28,5	0,44	48,3	51,7	0,42
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	22,7	45,3	32,0	0,22	45,3	54,7	0,23
Perekondlik psoriaas n=101	22,8	45,5	31,7	0,21	45,5	54,5	0,19
Sporaadiline psoriaas n=153	25,5	46,4	28,1	0,46	48,7	51,3	0,46
PASI ≤20 n=151	24,8	44,6	30,6	0,30	47,1	52,9	0,28
PASI >20 n=85	23,7	48,5	27,8	0,46	47,9	52,1	0,45
Kollete ulatus ≤10% n=66	19,1	47,1	33,8	0,08	42,6	57,4	0,09
Kollete ulatus 11-30% n=76	25,6	42,3	32,1	0,37	46,8	53,2	0,39
Kollete ulatus >30% n=94	26,9	48,1	25,0	0,92	50,9	49,1	0,93

Lisa 6. Assotsiatsioonitestide tulemused SNP-ga rs1150258 IL-24 geenist

rs1150258 C→T	Genotüübid (%)				Alleelid (%)		
	C/C	C/T	T/T	P-väärtus	C alleel	T alleel	P-väärtus
Kontrollid n=148	24,3	54,1	21,6	*	51,4	48,6	*
Naastuline psoriaas n=254	23,6	47,2	29,1	0,28	47,2	42,5	0,28
Varase avaldumisega psoriaas n=180	24,0	47,5	28,5	0,40	47,8	52,2	0,39
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	22,7	46,7	30,6	0,31	46,0	54,1	0,33
Perekondlik psoriaas n=101	21,8	46,5	31,7	0,18	45,0	55,0	0,16
Sporaadiline psoriaas n=153	24,8	47,7	27,5	0,57	48,7	51,3	0,57
PASI ≤20 n=151	24,8	45,3	29,9	0,37	47,5	52,5	0,36
PASI >20 n=85	21,7	50,5	27,8	0,35	46,9	53,1	0,35
Kollete ulatus ≤10% n=66	19,1	47,1	33,8	0,09	42,6	57,4	0,09
Kollete ulatus 11-30% n=76	25,6	43,6	30,8	0,49	47,4	52,6	0,48
Kollete ulatus >30% n=94	25,0	50,0	25,0	0,78	50,0	50,0	0,79

Lisa 7. IL-20/IL-24 laiendatud haplotüübi CAAAC haplotüübianalüüsi tulemused psoriaasi alatüüpidel

Psoriaasi alatüüp	HT5 CAAAC haplotüübi sagedus (%)	OR (95% CI)	P-väärtus
Varase avaldumisega psoriaas n=180	1,2	0,122 (0,038 - 0,386)	0,000346
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	1,5	0,152 (0,033 - 0,712)	0,0167
Perekondlik psoriaas n=101	0,5	0,059 (0,007 - 0,478)	0,00795
Sporaadiline psoriaas n=153	1,8	0,179 (0,061 - 0,525)	0,00174
PASI ≤20 n=151	1,7	0,170 (0,058 - 0,495)	0,00115
PASI >20 n=85	0,3	0,336 (0,002 - 46,148)	0,664

Lisa 8. IL-20/IL-24 laiendatud haplotüübi TGGGT haplotüübianalüüsi tulemused psoriaasi alatüüpidel

Psoriaasi alatüüp	HT3 TGGGT haplotüübi sagedus (%)	OR (95% CI)	P-väärtus
Varase avaldumisega psoriaas n=180	6,5	0,548 (0,316 - 0,951)	0,0325
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	8,1	0,676 (0,330 - 1,385)	0,284
Perekondlik psoriaas n=101	8,5	0,686 (0,356 - 1,321)	0,259
Sporaadiline psoriaas n=153	6,0	0,523 (0,295 - 0,925)	0,026
PASI ≤20 n=151	7,4	0,611 (0,350 - 1,067)	0,0834
PASI >20 n=85	6,5	0,595 (0,293 - 1,210)	0,152

Lisa 9. IL-20/IL-24 laiendatud haplotüübi CGAGT haplotüübianalüüsi tulemused psoriaasi alatüüpidel

Psoriaasi alatüüp	HT4 CGAGT haplotüübi sagedus (%)	OR (95% CI)	P-väärtus
Varase avaldumisega psoriaas n=180	3,4	0,430 (0,185 - 0,999)	0,0497
Hilise avaldumisega psoriaas n=74	4,0	0,607 (0,211 - 1,750)	0,356
Perekondlik psoriaas n=101	4,5	0,638 (0,253 - 1,610)	0,341
Sporaadiline psoriaas n=153	2,9	0,386 (0,154 - 0,962)	0,0411
PASI ≤20 n=151	3,2	0,678 (0,289 - 1,796)	0,378
PASI >20 n=85	3,1	0,701 (0,312 – 1,823)	0,352