

Tartu Ülikool
Arstiteaduskond
Füsioloogia Instituut

Tanel Traks

**Interleukiin-10 perekonna tsütokiinide geenide
polümorfismide võimalikud seosed meeleolu- ja
ärevushäiretega**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendajad: Sulev Kõks, M.D., Ph.D.
Kati Koido, Ph.D.

Tartu 2007

Sisukord

Sisukord	2
Lühendid	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Meeleolu- ja ärevushäired	5
1.2 Aju ja immuunsüsteemi seosed	6
1.2.1 Põhilised kommunikatsiooniteed	6
1.2.2 Depressioon ja immuunsüsteem	7
1.2.3 Eksogeensed tsütokiinid	9
1.3 Interleukiin-10 klasteri tsütokiinid	9
1.3.1 Struktuurid, retseptorid ja signaalrajad	10
1.3.1.1 Interleukiin-10	10
1.3.1.2 Interleukiin-19 alamperekond	11
1.3.2 Geenid, ekspressioon ja funktsioonid	11
1.3.2.1 Interleukiin-10	11
1.3.2.2 Interleukiin-19	12
1.3.2.3 Interleukiin-20	13
1.3.2.4 Interleukiin-24	14
2. Töö eesmärgid	16
3. Materjalid ja meetodid	17
3.1 Uuringus osalenud inividid	17
3.2 DNA proovid	18
3.3 SNP-de valik	18
3.4 Polümorfismide genotüpeerimine	19
3.5 ARMS-PCR ja tetra-praimer ARMS-PCR reaktsioonid	21
3.6 Statistiline analüüs	22
4. Tulemused	24
5. Arutelu	29
Kokkuvõte	32
Summary	33
Tänuavaldused	35
Kirjandus	36

Lühendid

ARMS-PCR	<i>amplification refractory mutation system polymerase chain reaction</i>
bp	aluspaar (<i>base pair</i>)
CD3	T-raku retseptorkompleksi komponent (<i>cluster of differentiation 3</i>)
CD8	tsütotoksiliste T-rakkude spetsiifiline pinnamarker (<i>cluster of differentiation 8</i>)
CD68	makrofaagide spetsiifiline pinnamarker (<i>cluster of differentiation 68</i>)
CI	usaldusväärsuse intervall (<i>confidence interval</i>)
CPB	kardiopulmonaarne šunteermine, kunstlik vereringe (<i>cardiopulmonary bypass</i>)
CRF 2	tsütokiinide retseptorite perekond 2 (<i>cytokine receptor family 2</i>)
CRH	kortikotropiini vabastav hormoon (<i>corticotropin releasing hormone</i>)
D'	standardiseeritud LD koefitsient D
dNTP	desoksünukleotiidtrifosfaat (<i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
GM-CSF	granulotsüütide ja monotsüütide kolooniaid stimuleeriv faktor (<i>granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>)
HPA-telg	hüpotaalamo-hüpfüsaar-adrenokortikaal-telg (<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>)
IFN- γ	interferoon gamma (<i>interferon gamma</i>)
kb	tuhat aluspaari (<i>kilo base pairs</i>)
LD	aheldatuse tasakaalustamatus (<i>linkage disequilibrium</i>)
LPS	lipopolüsahhariid (<i>lipopolysaccharide</i>)
MAP-kinaas	mitogeen aktiveeritud proteiinkinaas (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NF- κ B	nukleaarfaktor kapp B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
OR	riskifaktor (<i>odds ratio</i>)
PBMC	perifeerne mononukleaarne rakk (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
rs#	SNP koodnumber dbSNP kohaselt
SNP	ühenukleotiidne polümorfism (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
STAT	transkriptsioonifaktor (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> 'e DNA polümeraas
Th	T-helper
THP-1	leukeemia monotsüütide rakuliin (<i>monocytic leukemia cell line</i>)
T _m	sulamistemperatuur (<i>melting temperature</i>)
TNF- α	tuumori nekroosifaktor alfa (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
UTR	mittetransleeritav regioon (<i>untranslated region</i>)

Sissejuhatus

Meeleolu- ja ärevushäirete näol on tegemist komplekshaigustega, mis lisaks tagajärgedele individuaalsele elukvaliteedile, toovad kaasa raskusi ka patsiendi lähedastele ning on olulisteks töövõimetuse põhjustajateks. Vaatamata sagedasest esinemisest tingitud intensiivsele uurimistööle on nende häirete tekkemehhanismid lõpuni välja selgitamata. Seni on põhiliselt uuritud muutusi monoamiinidest neurotransmitterite funktsioneerimises, kuid tegemist on vaid osaga tervikust. Samas viitab järjest suurenev andmete hulk loomuliku immuunsüsteemi, eriti põletikuvastuse, osalusele depressiooni väljakujunemises. Ärevushäirete puhul on vastavaid tõendeid vähem, kuid tänu kõrgele komorbiidsusele meeleoluhäiretega, on ka selles osas võimalik jagatud bioloogiliste tekkemehhanismide olemasolu.

Interleukiin-10 (IL-10) ja selle hiljuti avastatud paraloogid interleukiin-19 (IL-19), interleukiin-20 (IL-20) ja interleukiin-24 (IL-24) osalevad kõik põletikuliste protsesside regulatsioonis. Ühtlasi on tuvastatud nende olulisus põletikuliste haiguste patofüsioloogias. Sellest lähtuvalt oli antud uurimustöö eesmärgiks kindlaks määrata seosed mainitud tsütokiinide geenide polümorfismide ning meeleolu- ja ärevushäirete vahel. Läbi viidi juht-kontroll assotsiatsiooniuuring Eesti populatsioonis ning lisaks analüüsidele üksikute polümorfismide lõikes, teostati ka nendevaheline aheldusanalüüs ja assotsiatsioonianalüüs saadud haplotüüpidega.

Käesolev magistr töö on valminud TÜ Arstiteaduskonna Füsioloogia Instituudis koostöös TÜ Psühhiaatriakliinikuga.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Meeleolu- ja ärevushäired

Meeleolu- ja ärevushäired on psühhiaatrilised haigused, mille tõttu kannatab märkimisväärne osa inimkonnast. Depressiooni, kui levinuima meeleoluhäire eluaegseks prevalentseks hinnatakse 2–19% (Lesch, 2004). Kõige sagedasemaks ärevushäireks on paanikahäire, umbes 1–3% populatsioonist (Weissman *et al.*, 1997). Mõlemaid esineb naistel umbes kaks korda sagedamini kui meestel (Moldin *et al.*, 1991; Kessler *et al.*, 1994).

Rahvusvahelise haiguste klassifikatsiooni ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) viienda peatüki kohaselt kuuluvad meeleoluhäirete (F30–F39) hulka maniakaalne episood ehk mania (F30), bipolaarne meeleoluhäire (F31), depressiivne episood ehk depressioon (F32), korduv depressiivne häire ehk korduv depressioon ehk unipolaarne häire (F33), püsivad meeleoluhäired (F34), muud meeleoluhäired (F38) ja täpsustamata meeleoluhäired (F39). Depressiooni põhisümptomiteks on alanenud meeleolu, huvi ja elurõõmu kadumine ning energia vähenemine. Iseloomulik on meeleolu püsivus ja mittevastavus tegelikule olukorrale.

Neurootiliste, stressiga seotud ja somatoformsete häirete (F40–49) hulka kuuluvad muu hulgas foobsed ärevushäired ehk foobiad (F40), mille üheks alakategooriaks on sotsiaalfobia (F40.1), muud ärevushäired (F41), kuhu kuuluvad paanikahäire (F41.0) ja generaliseerunud ärevushäire (F41.1) ning obsessiiv-kompulsiivne häire ehk sundseisund (F42). Paanikahäire põhiliseks tunnuseks on korduvad rasked ärevushood ehk paanikahood, mis ei ole seotud kindla situatsiooniga või muude välistingimustega ning on seetõttu subjektile ootamatud ja prognoosimatud. Füüsilised sümptomid varieeruvad, tavalisemad on südamekloppimine, valu rindkeres, lämbumistunne, nõrkus- ja ebareaalsustunne.

Nii meeleolu- kui ka ärevushäirete korral on haiguse väljakujunemises selge geneetiline komponent. Pärilikkuse osaks hinnatakse unipolaarse depressiooni puhul 31–42% (Sullivan *et al.*, 2000), kuid on pakutud ka kuni 70% (Levinson *et al.*, 2003), bipolaarse meeleoluhäire puhul 59–87% (Smoller & Finn, 2003) ja paanikahäire puhul ligikaudu 48% (Hettinger *et al.*, 2001). Lisaks esineb kõrge komorbiidsus, eriti

unipolaarse depressiooni ja paanikahäire vahel (Merikangas *et al.*, 1996), mis viitab võimalikele jagatud mehhanismidele etioloogias (Howland & Thase, 2005).

1.2 Aju ja immuunsüsteemi seosed

Vaatamata tähelepanekutele meditsiini algusaegadest alates on alles viimastel aastakümnetel võimalikuks muutunud põhjuslike seoste uurimine emotsioonide ja füüsiliste haiguste vahel. Seda tänu tehnilistele arengutele molekulaar- ja rakubioloogias, geneetikas, neuroteadustes ja aju kuvamismeetodites (Marques-Deak & Sternberg, 2004). Termin „psühhoneuroimmunoloogia” sünniaastaks on 1981, mil Robert Ader võttis selle kasutusele tähistamaks uurimisvaldkoda, mis keskendub interaktsioonidele kesknärvisüsteemi (KNS) ja immuunsüsteemi vahel ning käesolevaks ajaks on kogunenud suurel hulgal empiirilist informatsiooni selle kahesuunalise kommunikatsiooni kirjeldamiseks (Marques-Deak & Sternberg, 2004). Antud kommunikatsioonivõrgustik, mille kolmandaks komponendiks võib lugeda endokriinsüsteemi, võimaldab kesknärvisüsteemil reguleerida immuunsüsteemi talitlust neuroendokriinsel ja neuronaalsel teel ja vastupidi immuunsüsteemil signaliseerida aju humoraalsel ja neuronaalsel teel (Marques-Deak *et al.*, 2005).

1.2.1 Põhilised kommunikatsiooniteed

Hüpotaalamo-hüpopüsaar-adrenokortikaal-telg (HPA-telg) ja sümpaatiline närvisüsteem on peamisteks stressivastuse neuroendokriinseteks ja neuronaalseteks komponentideks (Raison *et al.*, 2006). Neerupeatiliste koorest vabanev kortisool, säsis vabanevad katehoolamiinid ja närvilõpmetest vabanev noradrenaliin valmistavad organismi ette metaboolseteks, füüsilisteks ja psühholoogilisteks stressoriteks ning toimivad veel kui immuunsüsteemi talitlust reguleerivad mediaatorid. Vastupidises suunas toimivad immuunsüsteemi poolt produtseeritud keemilised signaalmolekulid (tsütokiinid), mis vahendavad informatsiooni põletiku- ja teiste immuunvastuste korral, ja funktsioneerivad lisaks kui immuunsüsteemi ja neuroendokriinse süsteemi vahelised mediaatorid (Marques-Deak & Sternberg, 2004) ning toimivad kas vereringe või uinärvi kaudu (Marques-Deak *et al.*, 2005). Sealjuures stimuleerivad perifeerias vabanenud põletikulised tsütokiinid stressivastust ajus ja immuunsüsteemi

supresseerivate kortikosteroidide vabanemist. Moodustuv negatiivne tagasiside pidurdab immuunsüsteemi tegevust kui selleks vajadus lakkab ning häired selles regulatsioonis mängivad rolli autoimmuun-, põletikuliste, infektsioosete ja allergiliste haiguste etioloogias (Webster *et al.*, 2002).

1.2.2 Depressioon ja immuunsüsteem

Püüdes määratleda aju ja käitumise rolli immuunsüsteemi regulatsioonis oli depressioon ehk unipolaarne häire algselt suurepärase kliiniline mudel nende interaktsioonide uurimiseks. Nimelt kaasuvad depressiooniga selged muudatused käitumises (alanenud meeleolu, häirunud uni) koos neuroendokriinse ja sümpaatilise närvisüsteemi düsregulatsiooniga (Irwin & Miller, 2007). Kuivõrd antud psüühikahäirega on seotud peamiselt erinevate eluavalduste ja aktiivsuste kaotused, siis oli ehk loomulik esialgsete uuringute keskendumine nii rakulise kui ka humoraalse immuunsuse funktsionaalsuse vähenemisele (Herbert & Cohen, 1993). Vaatamata sellele on viimase 15 aasta jooksul kogunenud informatsioon viinud paradigma nihkele ja algne tähelepanu immunosupressioonile on järjest asendunud arusaamaga depressiivsetest häiretest kui aktiveerunud immuunsusega seisunditest, sealjuures eriti loomuliku immuunsuse põletikuvastuse hüperaktiivsusega (Raison *et al.*, 2006). See muudatus pole toimunud mitte isolatsioonis, vaid kooskõlas laiemate teadusliku suundumusega, kus põletikulisi protsesse nähakse mitmete vaevuste, nagu kardiovaskulaarsed haigused, diabeet ja vähk, keskmes (Willerson & Ridker, 2004; Wellen & Hotamisligil, 2005; Li *et al.*, 2005). Tänu silmatorkavale komorbiidsusele nende haiguste ja depressiooni vahel on uurimusi pühendatud potentsiaalsete jagatud etioloogiliste mehhanismide selgitamiseks (Evans *et al.*, 2005).

Depressiooni põhjustajatena on kirjeldatud mitmeid erinevatesse signaalsüsteemidesse kuuluvaid füsioloogilisi faktoreid. Esiteks ja levinuimaks on teooria, mille kohaselt indutseerivad depressiooni häired neurotransmitterite serotoniini, noradrenaliini ja dopamiini (monoamiinid) toimimises, ning ühtlasi on need ka peamised sihtmärgid farmakoloogilises ravis. Teise teooria kohaselt on tegemist häiretega peptiidide funktsioneerimises. Oluline on siin kortikotropiini vabastava hormooni (CRH) hüpersekreatsioon. Kuna CRH on peamine stressivastuse hormonaalse komponendi regulaator (HPA-telje ja sümpaatilise närvisüsteemi aktivatsioon), siis on tegemist olulise ühenduslüluga stressi ja depressiooni vahel (Owens & Nemeroff,

1991). Kolmandaks mehhanismiks on HPA-telje ja sümpaatilise närvisüsteemi hüperaktiivsus, mis on osaliselt põhjustatud CRH sekretsiooni kontrollimatusest glükokortikoidide resistentsuse esinemise tõttu (Pariante & Miller, 2001). Neljandaks on põhjalikult dokumenteeritud muutused aju regionaalsetes aktiivsustes, täpsemalt häirunud metaboolne aktiivsus prefrontaalses koos ja dopamiini metabolism basaalganglionites (Drevets, 2001; Martinot *et al.*, 2001). Viiendaks on järjest rohkem tähelepanu pööratud neuronaaelsele plastilisusele depressiooni korral (Duman, 2004). Kõikide eeltoodud komponentide puhul on avastatud seoseid immuunsüsteemiga.

Üldmeditsiiniliselt tervetel depressiooni diagnoosiga patsientidel on tuvastatud kõrgeenenud põletikuliste komponentide taset organismis. Täpsemalt põletikuliste tsütokiinide, akuutse faasi valkude, kemokiinide ja adhesioonimolekulide kontsentratsioonide tõusu võrreldes tervete indiviididega (Raison *et al.*, 2006). Kuna ühtlasi on varasemates uuringutes detekteeritud rakulise ja humoraalse immuunvastuse alanemist, siis on võimalik loomuliku immuunvastuse osalus selles (Moraska *et al.*, 2002; Raison & Miller, 2003).

Vaatamata tsütokiinide füüsilisele suurusele on võimalik nende sisenemine ajju tsirkumventrikulaarorganite või spetsiifiliste transporterite kaudu. Lisaks kanduvad tsütokiinide signaalid aju perifeersete närvide (eriti uitnäarvi) aferentsete neuronite kaudu (Raison *et al.*, 2006). Kesknärvisüsteemi tsütokiinide võrgustik, mis koosneb neuronitest ja gliia elementidest, mitte ainult ei ekspresseeri tsütokiine ja nende retseptoreid, vaid on võimeline ka perifeerseid signaale võimendada (Dantzer, 2004). Põhilised depressiooni korral aktiveerunud põletikulised tsütokiinid on IL-1, IL-6 ja TNF- α ning ajus on keskseks IL-1, mis lisaks autoregulaatorsele toimele reguleerib ka IL-6 ja TNF- α sünteesi (Laye *et al.*, 2000).

Psühhopatoloogia kontekstis on relevantsete põletikuliste tsütokiinide interaktsioonid neurotransmitterite metabolismi, neuroendokriinsete funktsioonide, sünaptilise plastilisuse ja informatsiooni töötlemisega (Raison *et al.*, 2006). Seoses neurotransmitterite metabolismiga on tuvastatud serotoniini prekursori trüptofaani lagundamise soodustamist. Antud efekt on vahendatud indoolamiin-2,3-dioksügenaasi kaudu ja produtseeritavad kinureniin ja kinoloon on neurotoksiliste omadustega (Dantzer, 2001). Teiseks võimendavad IL-6 ja TNF- α MAP-kinaaside aktiveerimise kaudu serotoniini transporterite aktiivsust ja ekspressiooni (Zhu *et al.*, 2006). Neuroendokriinsete efektide seas on tähtis põletikuliste tsütokiinide osalus glükokortikoidide resistentsuse kujunemises nii neuroendokriinses kui

immuunsüsteemis (Pace *et al.*, 2007). Antud protsessis on roll glükokortikoidide retseptoril, mille talitlust reguleerivad omakorda IL-1, IL-2, IL-4, TNF- α ja IFN- α . Tulemuseks on neuroendokriinse (CRH ja HPA-telje) ja immuunsüsteemi allumatus glükokortikoidide inhibitsioonile (Pace *et al.*, 2007). Perifeerse IL-1 põhjustatud NF- κ B aktivatsiooni ajus on seostatud sotsiaalse tagasitõmbumise ja vähenenud söömisega (Nadjar *et al.*, 2005), kuid ka muutustega neuronaaelses kasvus ja ellujäämuses (Lu *et al.*, 2004; Madrigal *et al.*, 2002).

1.2.3 Eksogeensed tsütokiinid

Selgeks kinnituseks immuunsüsteemi aktiivsest rollist psüühikahäirete korral on eksogeensetest tsütokiinidest tingitud depressiooni ja ärevuse sümptomid infektsioonhaiguste ja vähi ravis. Pikaajaline IL-2 ja IFN- α manustamine põhjustab lisaks palavikule depressiivseid episoode 20–30% patsientidest (Capuron & Dantzer, 2003). Liigseid ärevuse sümptomeid IFN- α teraapia korral on määratud 13–18% patsientidest (McHutchison *et al.*, 1998). Antud efektid on viinud mõttele tsütokiinide osalusest haiguskäitumise (*sickness behavior*) kujunemises ning põhilisteks uurimisobjektideks selles valdkonnas on olnud IL-1, IL-6 ja TNF- α (Johnson, 2002). Kokkuvõtvalt on haiguskäitumise puhul tegemist motivatsioonilise seisundiga, mis omab adaptatiivset väärtust erinevate haiguste korral, hõlmates selliseid kohastumusi nagu unisus, söögiisu langus, sotsiaalne tagasitõmbumine, palavik, liigesevalu ja kurnatus, ning kõrvalekalded selle regulatsioonis võivad viia psühhiaatriliste häirete väljakujunemisele (Dantzer, 2005).

1.3 Interleukiin-10 klasteri tsütokiinid

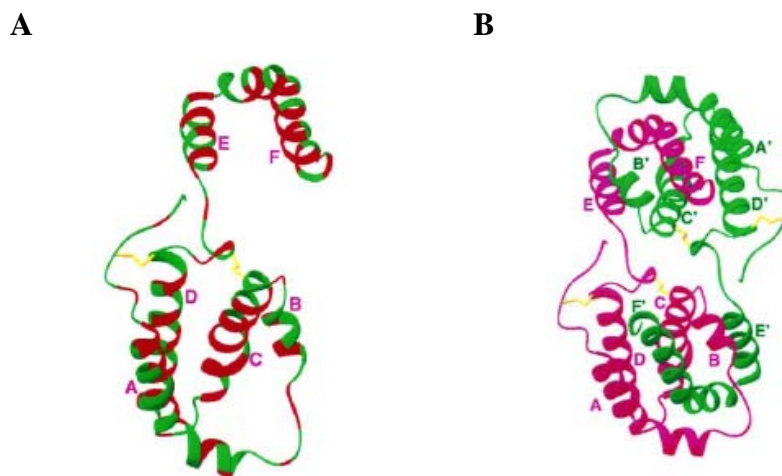
Interleukiinid-10, -19, -20 ja -24 kuuluvad IL-10 tsütokiinide perekonda (Fickenscher *et al.*, 2002) ning paiknevad järjestikku 195 kb suurusel alal 1. kromosoomi pikal õlal lookuses q31-32, moodustades seeläbi IL-10 geenide klasteri (Blumberg *et al.*, 2001). Sealjuures transkribeeritakse IL-10 geeni tsentromeeri ja ülejäänud kolme geeni telomeeri suunas. Lisaks interakteeruvad IL-19, IL-20 ja IL-24 ühise retseptorahelaga (IL-20R β) ning moodustavad eraldi IL-19 alam perekonna (Gallagher *et al.*, 2004). IL-10 kuulub endanimelisse alam perekonda koos interleukiinidega-22 ja -26. Vaatamata

struktuursele sarnasusele on antud valgud organismis erinevalt ekspresseeritud ja omavad erinevaid funktsioone.

1.3.1 Struktuurid, retseptorid ja signaalrajad

1.3.1.1 Interleukiin-10

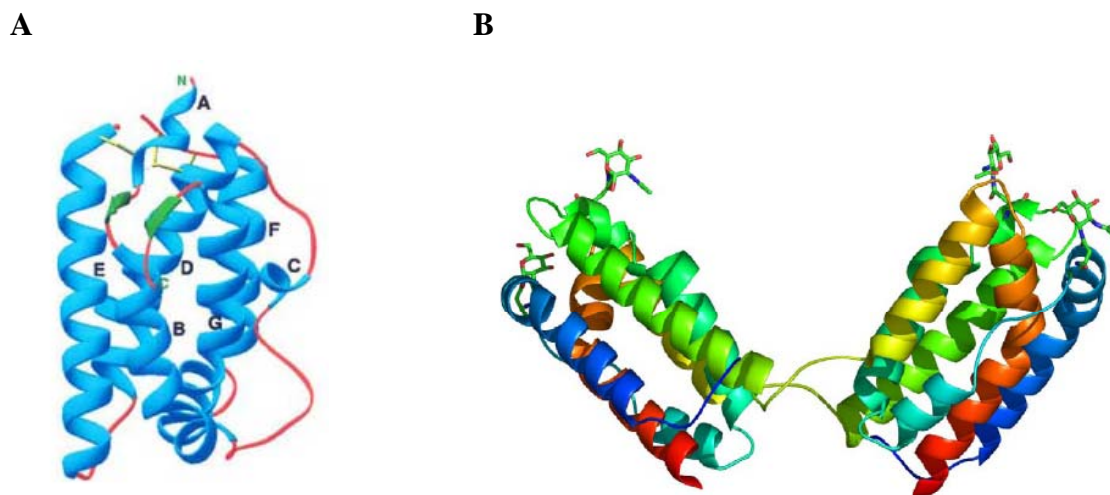
Interleukiin-10 molekul on V-kujuline dimeer, mille mõlemad domeenid koosnevad kuuest α -heeliksist, milledest neli on pärit ühelt ja kaks teiselt subühikult (Zdanov *et al.*, 1995) (Joonis 1). Antud tsütokiin seondub kahest peptiidahelast koosneva IL-10 retseptoriga – IL-10R α ja IL-10R β (Liu *et al.*, 1994; Kotenko *et al.*, 1997) ning stabiilse kompleksi moodustumiseks on vajalik kõigi kolme komponendi olemasolu. Esimesena seondub IL-10 kõrge afiinsusega ahelaga IL-10R α ja seejärel madalama afiinsusega ahelaga IL-10R β . Nagu kõik IL-10 perekonna tsütokiinide retseptorid, kuulub ka antud retseptor CRF 2 perekonda ning koosneb ühest pikast (IL-10R α) ja ühest lühikesest (IL-10R β) retseptorahelast (Fickenscher *et al.*, 2002). Edasises signaaliülekanDES toimub retseptorahelate tsütoplasmaatiliste domeenide ristfosforüleerimine IL-10R α -ga assotsieerunud Janus türosiini kinaas 1 (JAK1) ja IL-10R β -ga assotsieerunud türosiini kinaas Tyk2 poolt ning STAT transkriptsioonifaktorite aktiveerumine (Zdanov, 2006). Tuvastatud on STAT1, STAT3 ja STAT5 aktivatsiooni (Wehinger *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 1999).



Joonis 1. Interleukiin-10 kristallstruktuurid (Zdanov, 2004). A – monomeer, hüdrofoobsed aminohapped on esitatud punasega; B – dimeer, monomeerid on esitatud lilla ja rohelisega.

1.3.1.2 Interleukiin-19 alamperekond

Interleukiinid-19 ja -20 on seitsmest amfipaatilisest heeliksist koosnevad monomeerid, mille keskel asub hüdrofoobne tuum (Chang *et al.*, 2003; Blumberg *et al.*, 2001) (Joonis 2A). Interleukiin-24 puhul on võimalik nii monomeerne kui ka dimeerne konformatsioon (Chada *et al.*, 2004) (Joonis 2B). Kõik kolm tsütokiini interakteeruvad retseptoriga IL-20R1 (koosneb ahelatest IL20R α ja IL-20R β), kuid vaid IL-20 ja IL-24 seonduvad retseptoriga IL-20R2 (koosneb ahelatest IL22R ja IL-20R β) (Dumoutier *et al.*, 2001). Ka interleukiinide-19, -20 ja -24 signaaliülekandes aktiveeritakse Jak-STAT signaalrada. Kõikide antud tsütokiinide korral on näidatud transkriptsioonifaktor STAT3 osalust (Gallagher *et al.*, 2004; Blumberg *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002), lisaks IL-24 puhul ka STAT1 (Wang *et al.*, 2002). Interleukiin-20 signaaliülekandes on tuvastatud MAP-kinaaside aktivatsiooni (Hsieh *et al.*, 2006).



Joonis 2. Interleukiin-19 ja -24 kristallstruktuurid (Zdanov, 2004; Chada *et al.*, 2004). A – interleukiin-19 monomeer; B – interleukiin-24 võimalik dimeerne konformatsioon.

1.3.2 Geenid, ekspressioon ja funktsioonid

1.3.2.1 Interleukiin-10

Interleukiin-10 geen koosneb viiest eksonist ja neljast intronist, millelt sünteesitakse kahte alternatiivselt splaissitud transkripti (Kim *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2005). Antud tsütokiini produtseeritakse peamiselt aktiveeritud monotsüütides ja T-rakkudes, kuid ka

teistes rakutüüpides nagu keratinotsüüdid ja nuumrakud (Fickenscher *et al.*, 2002; Marietta *et al.*, 1996).

IL-10 avastati kõigepealt kui Th1 tsütokiinide inhibiitor (Moore *et al.*, 1990). Hiljem on tuvastatud pleiotroopseid inhibitsiooni ja stimulatsiooni efekte erinevatele vererakkudele, sealjuures osalus B-rakkude ellujäämises ja diferentseerumises. Kokkuvõtvalt toimib IL-10 kui oluline faktor perifeerses tolerantsuses ja kui peamine immuunvastuse ja põletiku inhibiitor (Fickenscher *et al.*, 2002). Psühholoogilise stressi korral on detekteeritud IL-10 ekspressiooni vähenemist võrreldes põletikuliste tsütokiinidega IL-1, IL-6, TNF- α ja IFN- γ (Maes *et al.*, 1998). Sealjuures on antidepressantidel demonstreeritud vastupidist mõju – põletikuliste tsütokiinide nagu TNF- α ja IFN- γ produktsiooni langus ja IL-10 produktsiooni tõus (Kenis & Maes, 2002). Lisaks on IL-10 manustamine otse aju vähendanud tsütokiinidest põhjustatud haiguskäitumist loomkatsetes (Raison *et al.*, 2006).

1.3.2.2 Interleukiin-19

Interleukiin-19, nagu ka IL-20, avastati IL-10 geenile sarnaste järjestuste otsingul andmebaasist (Gallagher *et al.*, 2000; Blumberg *et al.*, 2001). Leitud geen koosnes viiest eksonist ja neljast intronist ning vastavat valku sekreteeriti immuunrakkude poolt (Gallagher *et al.*, 2000). Edaspidi on tuvastatud veel kahe eksoni olemasolu esimesest kodeerivast eksonist ülesvoolu ja alternatiivse splaissingu toimumine mRNA 5'-UTR-s (Liao *et al.*, 2002). IL-19 geeni transkriptsiooni on detekteeritud GM-CSF ja LPS aktiveeritud ja puhkavates monotsüütides ning madalamal tasemel B-rakkudes (Wolk *et al.*, 2002).

Patoloogia kontekstis on suurenenud IL-19 mRNA ekspressioon psoriaasi põletikulises nahas võrreldes terve nahaga (Otkjaer *et al.*, 2005), kusjuures retseptorahelate IL-20R α ja IL-20R β mRNA ekspressioonis on mõõdetud nii repressiooni (Otkjaer *et al.*, 2005) kui ka aktivatsiooni (Romer *et al.*, 2003). Seoses süsteemse põletikuvastusega tuvastati kardiopulmonaarse šunteerimise (CPB – *cardiopulmonary bypass*) järgselt kõrgenenud IL-19 valgu kontsentratsioon seerumis ja mRNA ekspressioon perifeersetes monotsüütides koos samaaegselt kõrgenenud tsütokiinide TNF- α , IL-6 ja IL-10 kontsentratsioonidega seerumis. Lisaks indutseeris IL-6 ja TNF- α olemasolu *in vitro* tingimustes IL-19 valgu transkriptsiooni perifeersetes

monotsüütides. Saadud tulemused viitavad võimalusele, et IL-19 osaleb interaktiivselt koos vaadeldud põletikuliste tsütokiinidega süsteemse põletikuvastuse tekkes CPB järgselt (Hsing *et al.*, 2006b).

Uurides konkreetseid seoseid põletikuliste tsütokiinidega on saadud vastupidiseid tulemusi. IL-19 indutseeris põletikku soodustavate IL-6 ja TNF- α ekspressiooni põrnast eraldatud monotsüütides (Liao *et al.*, 2002) ja TNF- α ekspressiooni THP-1 monotsüütide rakuliinis (Zhong *et al.*, 2006). Samas detekteeriti IL-10 aktivatsioon ilma TNF- α aktivatsioonita perifeersetes mononukleaarsetes rakkudes (PBMC) ja nendest puhastatud monotsüütides ning IL-10 negatiivne tagasiside IL-19 produktsioonile (Jordan *et al.*, 2005). Kooskõlas viimase tulemustega on T-helper rakkude diferentseerumise kallutamise suunas Th2 rakkude suunas. Gallagher'i ja kaasautorite (2004) poolt läbi viidud uurimuses tuvastati IL-19 juuresolekul valkude IL-4 ekspressiooni tõus ja IFN- γ ekspressiooni langus CD3+ T-rakkude populatsioonis ning IL-10 ekspressiooni tõus puhastatud dendriitrakkudes. Samuti esines tsütokiinide IL-4, IL-5 ja IL-10 kontsentratsioonide tõus BALB/cJ albiino hiirte veres IL-19 cDNA intramuskulaarse elektroporatsiooni järgselt ning IL-13 kontsentratsiooni tõus kopsudes antud liini astmamudelil. Lisaks määrati kõrgeenenud IL-19 ja sellega korreleeruvate IL-4 ja IL-13 tsütokiinide kontsentratsioonid astmapatsientidel võrreldes tervete indiviididega (Liao *et al.*, 2004).

1.3.2.3 Interleukiin-20

Interleukiin-20 geen koosneb viiest eksonist ja neljast intronist. Tavaliselt transkribeeritakse kõik viis eksonit, kuid hiljuti demonstreeriti ka alternatiivselt splaissitud varianti, mis koosneb neljast eksonist ja vastav mRNA ekspresseerus ainult kopsudes (Hsieh *et al.*, 2006). IL-20 peamisteks rakulisteks allikateks on aktiveeritud monotsüüdid (Wolk *et al.*, 2002) ja tuvastatud sihtmärkideks keratinotsüüdid, endoteeli rakud, fibroblastid, neutrofiilid ja CD8+ T-rakud (Wei *et al.*, 2006).

Kuigi algselt peeti IL-20 peamiselt nahaspetsiifiliseks tsütokiiniks, siis hilisemad andmed on näidanud laialdasemat ekspressiooni kogu organismis. Tavalistes tingimustes on IL-20 mRNA madalat ekspressiooni detekteeritud nahas, hingetorus, käärsooles ja teistes kudedes (Blumberg *et al.*, 2001; Nagalakshmi *et al.*, 2004). Kõige kõrgemat mRNA ekspressiooni on detekteeritud käärsoole ja rinnanäärme

stroomarakkudes (Nagalakshmi *et al.*, 2004). Koe *microarray* meetodit kasutades on tuvastatud IL-20 valgu ekspressioon nahas, seedekulglas, maksas, kõhunäärmes, kopsudes, põrnas, neerudes ja teistes kudedes (Wei *et al.*, 2006). Sealjuures esines antud kudede piires ekspressioon mitmetes spetsiifilistes rakutüüpides nagu soomuselised epiteelrakud, endoteelrakud, makrofaagid ja lümfotsüüdid (Wei *et al.*, 2006). Eraldi märkimist väärib IL-20 valgu tuvastamine ajus CD68+ monotsüütides (Hsing *et al.*, 2006a). Kui arvestada lisaks eksperimentidega, kus gliiarakkude (>95 % astrotsüüdid, ~3 % mikroglia) indutseerimine bakteriaalse lipopolüsahhariidiga (LPS) põhjustas neis IL-20 mRNA ekspressiooni, mida oli võimalik ära hoida deksametasooni eelmanustamisega (Hosoi *et al.*, 2004), ja LPS süsteemne manustamine põhjustas STAT3 aktivatsiooni ajus (Harre *et al.*, 2002; Konsman *et al.*, 2000), siis on võimalik, et lisaks põletikulistele tsütokiinidele osaleb ka IL-20 kesknärvisüsteemi patofüsioloogia kujunemises infektsiooni ja põletiku korral.

Otseses seoses põletikuliste tsütokiinidega on IL-20 põhjustatud IL-6 ekspressioon liigete fibroblastides (Hsu *et al.*, 2006) ning IL-6 ja TNF- α ekspressioon CD8+ T-rakkudes (Wei *et al.*, 2006) ja aordis arterioskleroosi hiiremudelil (Chen *et al.*, 2006).

1.3.2.4 Interleukiin-24

Interleukiin-24 geen koosneb seitsmest eksonist ja kuuest intronist (Huang *et al.*, 2001), millelt sünteesitakse kahte erineva pikkusega mRNA transkripti alternatiivse splaissingu esinemise tõttu (Allen *et al.*, 2004). IL-24 mRNA ekspressiooni on tuvastatud monotsüütides ja aktiveeritud T-rakkudes (Wolk *et al.*, 2002) ning väljaspool immuunsüsteemi melanotsüütides ja indutseeritud vähirakkudes (Jiang *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2001).

Kuigi antud tsütokiini täpsed bioloogilised funktsioonid on määratlemata, on selle toimimises eristatavad kaks erinevat profiili. Esiteks retseptori kaudu kui klassikaline tsütokiin (Wang *et al.*, 2002). Teiseks intratsellulaarselt, ilma retseptori vahenduseta, kui tsütotoksiline agent teatud vähirakkudele (Sauane *et al.*, 2003). Kuna antud tuumor-supressiivne toime ei laiene normaalsetele rakkudele (Mhashilkar *et al.*, 2001), on IL-24 uuritud kui potentsiaalset efektorit vähivastases geeniteraapias (Gupta *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2006). Üks paljudest retseptor-vahendatud funktsioonidest on seotud

epidermisega, millele viitab IL-24 osalus haavade paranemises; samas kui IL-24 düsfunktsionaalsus on seostatav patoloogiliste seisunditega nagu psoriaas (Wang & Liang, 2005). Lisaks on IL-24 retseptorite (IL-20R1 ja IL-20R2) ekspressiooni ja ligand-vahendatud aktivatsiooni põhjal tuvastatud keratinotsüüdid kui ühed põhilised IL-24 märklaudrakud epidermises (Wang *et al.*, 2002). Nahahaavade korral on IL-24 geeni ekspressioon tõusnud kahjustatud pinna ääres. Kuivõrd antud efekt on jälgitav enne ja samaaegselt paranemise proliferatiivse faasiga (12 h kuni 5 päeva peale vigastuse teket), siis on võimalik IL-24 aktiivne osalus antud protsessis (Soo *et al.*, 1999). Samuti on tõusnud IL-24 ekspressioon psoriaasi põletikulises nahas. Erinevalt IL-19 ja IL-20, mida detekteeriti keratinotsüütides, esines IL-24 ekspressioon infiltreerunud monotsüütides (Romer *et al.*, 2003).

Lisaks vastusena mitogeenidele (LPS või fütohemaglutiniin - PHA) on IL-24 ekspressiooni *in vitro* tingimustes detekteeritud ka tsütokiinide IL-1 β juuresolekul kondrotsüütides (Vincenti & Brinckerhoff, 2001) või IL-2, IL-7 ja IL-15 juuresolekul PBMC rakkudes (Poindexter *et al.*, 2005). IL-24 kui pro-Th1 tsütokiinile viitab IL-6, TNF- α , IFN- γ ja vähemal määral IL-1 β , IL-12 ja GM-CSF indutseerimine PBMC rakkudes (Caudell *et al.*, 2002) ning IL-6 ja TNF- α indutseerimine puhastatud monotsüütides (Mumm *et al.*, 2006).

2. Töö eesmärgid

Käesoleva uuringu eesmärgiks oli leida seosed IL-10 klasteri tsütokiinide geenide ning meeolelu- ja ärevushäirete vahel. Selleks valiti antud genoomsest regioonist katseisikute genotüpeerimiseks 6 ühenukleotiidset polümorfismi (SNP – *single-nucleotide polymorphism*) ning saadud andmete põhjal kavatseti:

- 1) Määrata seosed üksikute SNP-de ja uuritavate psüühikahäirete vahel.
- 2) Kirjeldada vaatlusaluste SNP-de omavahelist aheldatust ning ühtlasi kinnitada varasemaid andmeid haplotüübiblokkidest antud piirkonnas. Blokkide esinemise korral teha kindlaks levinumad haplotüübid.
- 3) Teostada haplotüübianalüüs, et tuvastada enamlevinud haplotüüpide efekti haigusfenotüüpide väljakujunemisele.

3. Materjalid ja meetodid

3.1 Uuringus osalenud indiviidid

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. Diagnooside määramiseks kasutati psühhiaatrilist intervjuud ja verifitseeriti M.I.N.I. intervjuuga (*Mini International Neuropsychiatric Interview 5.0.0*) TÜ Psühhiaatrikliinikus. Kontrollindiviidide sobivuse määramiseks kasutati samuti M.I.N.I. intervjuud ja perekonna ajaloo küsitlust, et välistada psühhiaatriliste häirete esinemine subjektidel või nende esimese astme sugulastel.

Kaasatud isikuteks olid Eestis elavad kaukasoidsed mittesuguluses kontrollindiviidid (n=291) ja patsiendid (n=372). Vastavalt konkreetsetele diagnoosidele jagati patsiendid nelja alarühma: unipolaarne häire ja unipolaarne häire koos kaasuvate ärevushäiretega (edaspidi unipolaarne häire ja kaasuvad ärevushäired; n=236), unipolaarne häire (n=93), paanikahäire ja paanikahäire koos kaasuvate meeleoluhäiretega või muude ärevushäiretega (edaspidi paanikahäire ja kaasuvad meeleoluhäired või muud ärevushäired; n=151) ning paanikahäire ja paanikahäire koos kaasuvate ärevushäiretega (edaspidi paanikahäire ja kaasuvad ärevushäired; n=51) (Tabel 1). Ainult paanikahäire diagnoosiga patsientide vähesuse tõttu (n=41) vastavat alarühma ei moodustatud. Kaasuvaks meeleoluhäireks võis olla lisaks unipolaarsele häirele ka bipolaarne häire. Kaasuvateks ärevushäireteks võisid olla lisaks paanikahäirele generaliseerunud ärevushäire, obsessiiv-kompulsiiivne häire või sotsiaalfobia. Osadel juhtudel kvalifitseerusid patsiendid korraga kahte alarühma (ühel indiviidil esines nii unipolaarse häire kui paanikahäire diagnoos) (n=75). Moodustatud alarühmadest jäid välja ainult kaasuvate ärevushäiretega või täpsustamata diagnoosiga patsiendid (n=28) ning bipolaarse häire kuid ilma paanikahäire diagnoosita patsiendid (n=32).

Tabel 1. Subjektide demograafilised ja kliinilised karakteristikud.

Rühm	Indiviidide arv		Vanus	
	Kokku	Mehi/naisi	Vanusepiirid	Keskmine vanus
MDA	236	52/184	18–73	40,8±13,4
MD0	93	21/72	18–73	41,7±14,5
PDE	151	29/122	17–73	38,1±12,7
PDA	51	8/43	20–73	37,9±12,3
Kokku (patsiendid)	372	93/279	17–73	39,4±13,2
Kontroll	291	95/196	14–71	39,0±14,1
Kokku	663	188/475	14–73	39,2±13,6

MDA – unipolaarne häire ja kaasuvad ärevushäired; MD0 – unipolaarne häire; PDE – paanikahäire ja kaasuvad meeleoluhäired või muud ärevushäired; PDA – paanikahäire ja kaasuvad ärevushäired. Keskmise vanuse lahtris on lisaks ära toodud standardhälbed.

3.2 DNA proovid

Genoomne DNA eraldati ~9 ml täisverest TÜ Füsioloogia Instituudis. Kasutati standardprotokolli, mille kohaselt kõigepealt lüüsi rakud, siis tuumad ja DNA sadestati isopropanoolis (Naxo, Tartu, Eesti). Peale sademe pesemist 70% etanoolis lahustati see Tris/EDTA-s. DNA lõppkontsentratsioonid olid vahemikus 100–250 ng/µl.

3.3 SNP-de valik

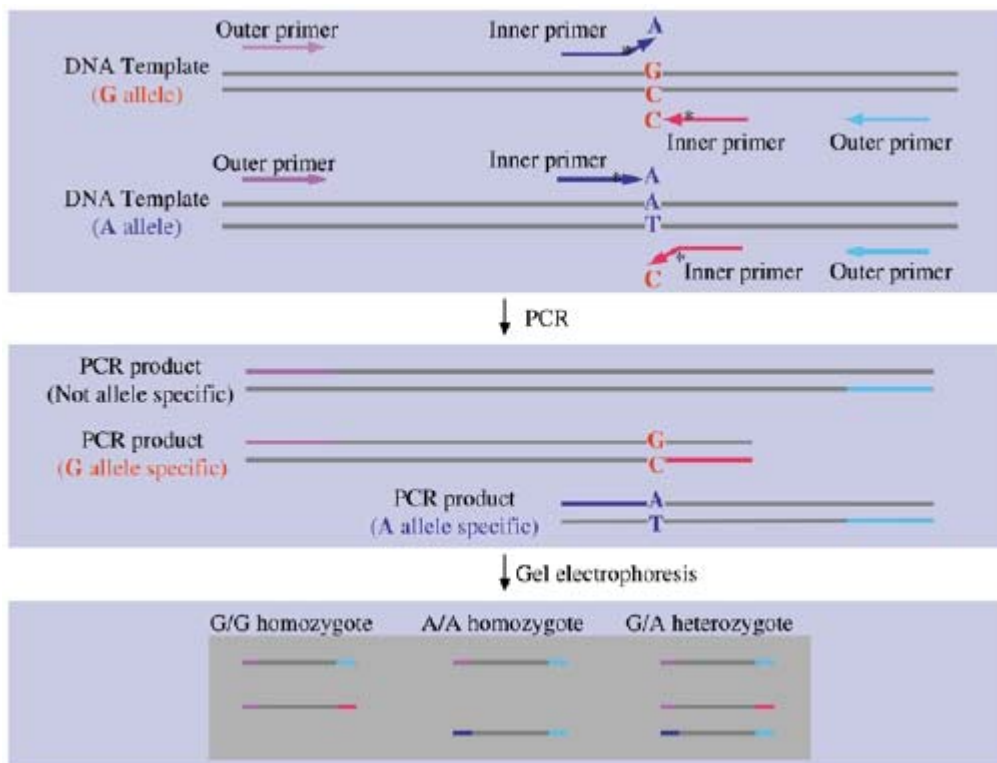
SNP-de valikul lähtuti kolmest peamisest kriteeriumist. Esiteks minoorse alleeli esinemissagedus >10%. Teiseks ühes geenis asuvate SNP-de puhul omavaheline kaugus vähemalt 3000 bp. Kolmandaks SNP-de valideeritus andmebaasi kohaselt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

IL-10 geenist valiti genotüpeerimiseks SNP koodiga rs1800872 (5' UTR), IL19 geenist rs2243193 (3' UTR), IL-20 geenist rs2981572 (5' UTR) ja rs1518108 (3' UTR) ning IL-24 geenist rs1150253 (intron 2) ja rs1150258 (ekson 5).

Lisaks paiknevad SNP-d rs1800872 ja rs2981572 vastavalt IL-10 ja IL-20 geenide regulaatorsetes piirkondades. Rs1800872 paikneb oletatavas transkriptsioonifaktor STAT3 seondumissaidis, ning on seotud IL-10 ekspressioonitasemega (Kube *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1997; Crawley *et al.*, 1999). Siiani puuduvad publitseeritud andmed transkriptsioonifaktorite seondumissaitide kohta IL-20 geenis, kuid konserveerunud järjestuste otsing andmebaasist määratles antud töös uuritud polümorfismi rs2981572 kui lähima SNP faktor Cdc5 seondumissaidile (<http://genome.ucsc.edu/>).

3.4 Polümorfismide genotüpeerimine

SNP-de genotüpeerimiseks kasutati kahte meetodit – ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system polymerase chain reaction*) ja selle edasiarendust tetra-praimer ARMS-PCR (Newton *et al.*, 1989; Ye *et al.*, 2001). Antud meetod võimaldab eristada polümorfisme kindlas lookuses ja põhineb avastusel, et 3' viimase nukleotiidi mittepaardumine takistab oligonukleotiidide toimimist praimerina (Newton *et al.*, 1989). ARMS-PCR puhul kasutati kahes eraldi reaktsioonis kahte erinevat alleel-spetsiifilist praimerit ja ühte ühist mitte-spetsiifilist praimerit. Kontrollprodukti saamiseks lisati mõlemasse reaktsiooni kaks kontrollpraimerit. Tetra-praimer ARMS-PCR korral olid kasutusel kaks praimerite paari, mis võimaldasid eristada korraka kahte alleeli ühes reaktsioonis. Mõlemad paarid koosnesid ühest alleel-spetsiifilisest sisemisest praimerist ja ühest mitte-spetsiifilisest välimisest praimerist ning sünteesitud produktid olid erineva suuruse tõttu eristatavad geelelektroforeesi meetodil. Kontrollprodukt sünteesiti kahelt välimiselt praimerilt (Joonis 3). Spetsiifilisuse tõstmiseks oli mõlema meetodi puhul lisatud alleel-spetsiifilistele praimeritele täiendav *mismatch* nukleotiid 3' otsast -2 positsioonis.



Joonis 3. Tetra-praimer ARMS-PCR-i põhimõte (Ye *et al.*, 2001). Antud näites on kasutatud G→A ühenukleotiidset polümorfismi, kuid meetod on rakendatav ka kõigi teiste ühenukleotiidsete asenduste genotüpeerimiseks. Kahe praimerite paari abil sünteesitakse kaks alleel-spetsiifilist amplikoni. Ühe paariga (joonisel esitatud punase ja lilla noolega) sünteesitakse G alleeli esindav amplikon ja teise paariga (joonisel esitatud sinise ja indigo värvi nooltega) A alleeli esindav amplikon. Alleel-spetsiifilisus on tagatud sisemiste praimerite 3' viimaste nukleotiidide ja matriits-DNA vahelise komplementaarsusega. Kuna kaks välimist praimerit asuvad uuritavast polümorfismist erinevatel kaugustel, on kummagi praimerite paariga amplifitseeritud produktid erineva pikkusega ja seetõttu lahutatavad geelelektroforeesi meetodil.

3.5 ARMS-PCR ja tetra-praimer ARMS-PCR reaktsioonid

Iga ARMS-PCR ja tetra-praimer ARMS-PCR reaktsioonisegu (lõppmaht 10µl) sisaldas 1 × reaktsioonipuhvrit (75 mM Tris-HCl (pH8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 0,1 mg/ml tartasiin, 1% sahharoos; Naxo, Tartu, Eesti), 0,2 mM dNTP, praimerid vastavalt kasutatud meetodile, 0,5 U rekombinantset Smart-Taq DNA polümeraasi (Naxo), ligikaudu 100 ng uuritavat DNA-d ja ddH₂O-d lõppmahuni. ARMS-PCR-i puhul sisaldas reaktsioonisegu 10 pmol alleel-spetsiifilist praimerit, 10 pmol mitte-spetsiifilist praimerit ja 5 pmol mõlemat kontrollpraimerit. Tetra-praimer ARMS-PCR puhul sisaldas reaktsioonisegu 10 pmol mõlemat sisemist praimerit ja 1 pmol mõlemat välimist praimerit. Kõik kasutatud praimerid olid disainitud varem TÜ Füsioloogia Instituudis. Praimerite järjestused, sulamistemperatuurid, seondumistemperatuurid ja Mg₂Cl kontsentratsioonid on toodud Tabelis 3.

Amplifitseerimisreaktsioonid viidi läbi GeneAmp® PCR System 2700 ja GeneAmp® PCR System 9700 termotsükleritega (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaktsioonide spetsiifilisuse tõstmiseks kasutati *touchdown* meetodit. Esialgsele denaturatsioonile (2 minutit 95 °C juures), järgnesid 10 kolmeefaasilist tsüklit (denaturatsioon, praimerite seondumine, ekstensioon), kus praimerite seondumisaasi temperatuur oli algselt 10 °C kõrgem optimaalsest ja langetati iga tsükliga 1 °C. Järgnesid 25 tsüklit optimaalse praimerite seondumisaasi temperatuuriga ning lõplik ekstensioon 10 minutit 72 °C juures. Denaturatsioonifaasid ja ekstensioonifaasid toimusid konstantsel temperatuuril (vastavalt 95 °C ja 72 °C juures) (Tabel 2).

Tabel 2. ARMS-PCR ja tetra-praimer ARMS-PCR reaktsioonitsükliid.

ARMS-PCR ja tetra-praimer ARMS-PCR									
Tsükli arvu	1		10				25		1
Denaturatsioon	95 °C		95 °C				95 °C		
Ekstensioon			72 °C				72 °C		72 °C
Praimerite seondumine		t_{opt}^* °C				t_{opt} °C			
Aeg	2 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	10 min

t_{opt} - optimaalne praimerite seondumistemperatuur.

t_{opt}^* - optimaalsest 10 °C kõrgem temperatuur, mida langetati iga tsükliga 1 °C.

PCR-i produktide visualiseerimiseks lahutati need geelelektroforeesil 2% agarosgeelis $0,5 \times$ TBE puhvril (45 mM Tris-Boraat, 1 mM EDTA- Na_2 (dinaatriumetüleen-diamiintetraatsetaat)) ja visualiseeriti etiidumbromiidi abil UV-valguses.

3.6 Statistiline analüüs

Genotüpeerimisel saadud andmete statistiliseks analüüsiks kasutati arvutiprogrammi Haploview (versioon 3.32) (Barrett *et al.*, 2005). Antud programmiga hinnati kõigepealt genotüpeerimise õnnestumise määra iga SNP korral ning genotüüpide jaotuvuse vastavust Hardy-Weinberg'i tasakaalule.

Alleelisageduse arvutustele patsientide ja kontrollide rühmas üksikute SNP-de lõikes järgnes saadud erinevuste hindamine assotsiatsioonianalüüsis. Selleks kasutati χ^2 testi ja statistiliselt oluliseks tulemuseks loeti $p \leq 0,05$.

SNP-de omavahelise aheldatuse LD (*linkage disequilibrium*) hindamiseks paaride kaupa kasutati log-lineaarset mudelit ning selle väljendamiseks D' väärtust. Viimane on vastavalt alleelisagedustele standardiseeritud LD koefitsient D , ning määrab kahe lookuse vahelise juhusliku assotsiatsiooni hälvet (Lewontin, 1964). Täielikult aheldunuks peeti polümorfisme, kui $D' \geq 0,9$ (maksimaalne $D'=1$).

Haplotüübianalüüs viidi läbi vaid haplotüüpidega, mille esinemissagedus oli $>1\%$. Haplotüüpide ja fenotüüpide vahelise assotsiatsiooni hindamiseks kasutati maksimeeritud eelduse algoritmi jagatud/liidetud meetodit (*partition-ligation-expectation-maximization algorithm*) (Qin *et al.*, 2002). Haplotüübi efekti haigusfenotüübile hinnati riskifaktoriga OR (*odds ratio*). OR kirjeldab teatud sündmuste (antud juhul haplotüüpide) esinemissageduste erinevusi patsientide ja kontrollindiviidide vahel ning arvutatakse, jagades sündmuse esinemise patsientidel sündmuse esinemisega kontrollindiviidide rühmas. Juhul, kui $OR < 1$, omab haplotüüp protektiivset efekti haigusfenotüübile, ja juhul, kui $OR > 1$, omab haplotüüp soodustavat efekti haigusfenotüübi väljakujunemisele. Saadud riskifaktori väärtust tõlgendatakse sõltuvalt 95% usaldusväärsuse intervallist (*confidence interval*, CI – riskifaktori väärtuste vahemik, kuhu jäävad 95% saadud riskifaktori väärtustest) ja konkreetsest haigusfenotüübist. Haplotüübiefekt on usaldusväärne vaid juhul, kui usaldusväärsuse intervalli ei jää väärtust $OR=1,0$. Haplotüübiefekti statistilist olulisust hinnati χ^2 p-väärtusega ja loeti oluliseks, kui $p \leq 0,05$. Korduvalanalüüside vea vähendamiseks kasutati permutatsioonitesti.

Tabel 3. Praimerite järjestused ja sulamistemperatuurid. PCR-i reaktsioonitingimused ja amplikoni suurused iga polümorfismi genotüpeerimiseks.

Polümorfism	Praimerid (5' – 3')	T _m	Praimerite seondumistemperatuur	Mg ²⁺	Amplikoni suurus
rs1800872 C/A	Alleel-spetsiifiline praimer (A alleel): ACA TCC TGT GAC CCC GCC TGT A	60 °C	65 °C	2,75 mM	151 bp - A/C alleel
	Alleel-spetsiifiline praimer (C alleel): ACA TCC TGT GAC CCC GCC TGT C	62 °C			
	Mitte-spetsiifiline praimer: TAA CTT AGG CAG TCA CCT TAG G	48 °C			
	Kontrollpraimer 63: TGC CAA GTG GAG CAC CCA A	57 °C			796 bp - kontroll
	Kontrollpraimer 64: GCA TCT TGC TCT GTG CAG AT	50 °C			
rs2243193 G/A	<i>Forward inner primer</i> (A alleel): AAG GGC TGC CTT CCC ATC TAA TTT ATT TTA	67 °C	60 °C	2,5 mM	414 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (G alleel): TCA CAT CAC AGA CAT GGA CTA TAT GAC GTC	67 °C			281 bp - G alleel
	<i>Forward outer primer</i> : GGA ACC TGT ATA GTG ATC CAG GGA TGA A	67 °C			193 bp - A alleel
	<i>Reverse outer primer</i> : CTG TCA GAA ACA CCC TGT CCT CAG TCT T	67 °C			
rs 2981572 T/G	<i>Forward inner primer</i> (T alleel): TTG TCA TAA GCT TTT TAA TTC ATT CTT	58 °C	55 °C	4,5 mM	320 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (G alleel): CAA GAT AAA AAT ATT TTA GTG CAA TGT C	58 °C			219 bp - G alleel
	<i>Forward outer primer</i> : ACT CAT CAA TAA TAT TTT CAT CAT ATG CT	58 °C			156 bp - T alleel
	<i>Reverse outer primer</i> : AGT TTT AAG ATA AAA TAA TAA TGG GCT G	58 °C			
rs1518108 T/C	<i>Forward inner primer</i> (T alleel): CTT CTT CCC CCA CCT CAC TCT GAC GT	70 °C	60 °C	2,5 mM	364 bp - kontroll
	<i>Reverse inner primer</i> (C alleel): AGA AAA CTA AGC AAC TAA ATT GGG GGT TCG	68 °C			249 bp - C alleel
	<i>Forward outer primer</i> : AGA CAG GTG TAT GAG CCC CCT TTT GAG	69 °C			171 bp - T alleel
	<i>Reverse outer primer</i> : GTC ATT GAA ACT ATA TCA GGG CCC AGG C	69 °C			
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 mM	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			
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 mM	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			

4. Tulemused

Käesoleva uurimustöö käigus genotüpeeriti ARMS-PCR ja tetra-praimer ARMS-PCR meetodil 663 indiviidi, kellest 372 olid psühhiaatrilise diagnoosiga patsiendid ja 291 terved kontrollindiviidid. Kõigis genotüpeerimiseks valitud kuues lookuses vastasid genotüüpide sagedused Hardy-Weinberg'i tasakaalule ($p > 0,01$).

Võrdlemaks alleelide jaotuvust kontrollrühmas ja erinevates patsientide rühmades, viidi läbi viis assotsiatsioonitesti (viie testi aluseks olid diagnooside põhjal moodustatud viis patsientide rühma ja kontrollrühm). Patsientide üldrühma ja kontrollrühma võrdluses ühegi SNP korral alleelide sageduses statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud. Vaadeldes nelja spetsiifilist patsientide rühma, saadi tulemuseks, et SNP rs2981572 IL-20 geenist oli statistiliselt oluliselt assotsieerunud paanikahäire ja sellega kaasuvate ärevushäiretega ($p = 0,03$). Antud patsientide rühmas oli alanenud vastava SNP minoorse alleeli G esinemissagedus (kontrollidel 29,7%, patsientidel 19,0%), mis omas seega protektiivset efekti haiguse väljakujunemisele. Permutatsioonitesti kadus antud tulemuse statistiline olulisus. Lisaks oli samas rühmas alanenud IL-19 geenis paikneva rs2243193 minoorse alleeli A esinemissagedus, kuid antud erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($p = 0,14$). Ülejäänud SNP-de puhul langesid alleelide sagedused patsientide rühmades kokku kontrollrühmaga (Tabel 4).

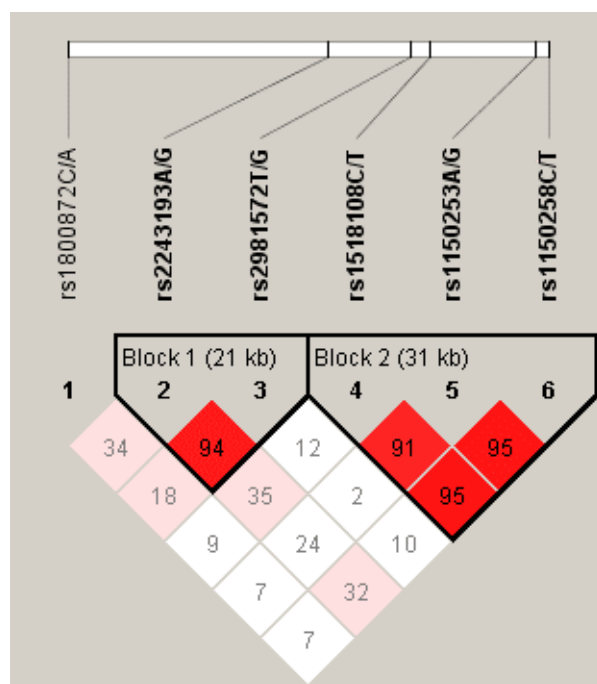
Tuvastamaks uuritavate SNP-de ühendatud efekti uuritavatele psüühikahäiretele, viidi kõigepealt läbi LD analüüs määramaks aheldusastet erinevate lookuste vahel ning seejärel haplotüübianalüüs.

LD analüüsi tulemusel tuvastati patsientide ja kontrollindiviidide ühendgrupis peaaegu täieliku aheldatuse esinemine esiteks SNP-de rs2243193 ja rs2981572 vahel ($D' = 0,94$) ning teiseks rs1518108, rs1150253 ja rs 1150258 vahel (D' vahemikus 0,91 kuni 0,95) (Joonis 4). Seega grupeerusid uuritavad SNP-d (v.a rs1800872) kahte haplotüübiblokki. Esimene neist hõlmas IL-19 ja IL-20 geene ning teine IL-20 ja IL-24 geene.

Tabel 4. IL-10 klatri SNP-de assotsiatsioonitestide tulemused.

	rs1800872			rs2243193			rs 2981572			rs1518108			rs1150253			rs1150258		
	Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)			Alleelid (%)		
	C	A	p-väärtus	G	A	p-väärtus	T	G	p-väärtus	C	T	p-väärtus	G	A	p-väärtus	T	C	p-väärtus
Kontroll (n=291)	73,1	26,9	–	80,4	19,6	–	70,3	29,7	–	52,2	47,8	–	51,8	48,2	–	52,2	47,8	–
Patsiendid (n=372)	73,0	27,0	0,97	77,9	22,1	0,30	69,4	30,6	0,76	53,4	46,6	0,70	54,8	45,2	0,35	55,6	44,4	0,26
MDA (n=236)	73,9	26,1	0,80	77,4	22,6	0,26	68,0	32,0	0,46	52,7	47,3	0,90	53,7	46,3	0,60	55,5	44,5	0,33
MD0 (n=93)	75,9	24,1	0,49	77,8	22,2	0,46	68,0	32,0	0,57	56,2	43,8	0,38	54,8	45,2	0,52	58,4	41,6	0,16
PDE (n=151)	72,6	27,4	0,88	79,8	20,2	0,84	71,2	18,8	0,78	51,1	48,9	0,77	53,4	46,6	0,69	53,5	46,5	0,74
PDA (n=51)	76,5	23,5	0,49	87,0	13,0	0,14	81,0	19,0	0,03	53,3	46,7	0,86	54,2	45,8	0,68	53,1	46,9	0,88

Kuue uuritud polümorfismi alleelide sagedusi võrreldi viie patsientide rühma ja kontrollrühma vahel. MDA – unipolaarne häire ja kaasuvad ärevushäired; MD0 – unipolaarne häire; PDE – paanikahäire ja kaasuvad meeleoluhäired või muud ärevushäired; PDA – paanikahäire ja kaasuvad ärevushäired. P<0,05 on poolpaksus kirjas.



Joonis 4. Uuritud SNP-de vaheline aheldatus. LD mustri leidmiseks ja haplotüübiblokkide visualiseerimiseks kasutati arvutiprogrammi Haploview. Näidatud D' väärtused on korrutatud sajaga. Musta joonega on ümbritsetud haplotüübiblokkid. Sulgudes on toodud äärmiste SNP-de vahelised kaugused blokkis.

Lähtudes LD analüüsi tulemustest, viidi järgnevalt läbi haplotüübianalüüs ning tuvastati patsientide ja kontrollindiviidide ühendrühmas kolme enamlevinud haplotüübi (sagedused $\geq 1\%$) esinemine esimeses blokkis – GT, AG ja GG, mis kokku moodustasid 99,3% kõigist vaadeldud haplotüüpidest. Teises blokkis tuvastati viie enamlevinud haplotüübi esinemine – CGT, TAC, CAT, TGT ja CAC, mis kokku moodustasid 99,0% kõigist vaadeldud haplotüüpidest (Tabel 5).

Tabel 5. Haplotüübiblokkid IL-19, IL-20 ja IL-24 geenides ja enamlevinud haplotüüptide esinemissagedused.

Haplotüübi nimetus	Blokk 1		Haplotüübi sagedus (%)	Blokk 2			Haplotüübi sagedus (%)
	rs 2243194	rs2981572		rs1518108	rs1150253	rs1150258	
HT1	G	T	69,3	C	G	T	51,8
HT2	A	G	20,6	T	A	C	43,4
HT3	G	G	9,4	C	A	T	1,3
HT4				T	G	T	1,3
HT5				C	A	C	1,2

Võrreldes haplotüüpide esinemissagedusi patsientide üldrühmas ja kontrollrühmas, tuvastati blokk 2 haplotüübi TGT sageduse statistiliselt oluline tõus patsientidel võrreldes kontrollidega ($p=0,014$; $OR=6,617$; $CI 1,159-37,767$). Siiski kadus peale permutatsiooni antud tulemuse statistiline olulisus. Ükski ülejäänud haplotüüpidest mõlemas blokkis haigusfenotüüpidega ei seostunud (Tabel 6).

Tabel 6. Haplotüübianalüüsi tulemused patsientide üldgrupis.

Blokk 1	Kontrollid (n=291)	Patsiendid (n=372)	OR (95% CI)	p-väärtus
GT	69,9	69,0	0,960 (0,747–1,233)	0,74
AG	18,8	21,7	1,195 (0,895–1,596)	0,23
GG	10,4	8,8	0,832 (0,564–1,230)	0,37
Blokk 2				
CGT	51,7	51,9	1,010 (0,802–1,272)	0,94
TAC	45,0	42,3	0,898 (0,712–1,132)	0,35
CAT	1,0	1,5	1,476 (0,511–4,262)	0,46
TGT	0,3	1,9	6,617 (1,159–37,767)	0,014
CAC	1,6	1,0	0,644 (0,230–1,801)	0,39

Kontrollide ja patsientide veergudes on haplotüüpide sagedused (%). $P<0,05$ on poolpaksus kirjas.

Võrreldes blokk 1 haplotüüpide esinemissagedusi neljas spetsiifilises patsientide rühmas ja kontrollrühmas, tuvastati statistiliselt oluline GT haplotüübi sageduse tõus paanikahäire ja kaasuvate ärevushäiretega patsientide rühmas ($p=0,03$; $OR=1,826$; $CI 1,069-3,120$). Taaskord kadus tulemuse statistiline olulisus peale permutatsiooni. Ülejäänud blokk 1 haplotüüpide esinemissagedustes kõrvalekaldeid ei tuvastatud (Tabel 7).

Tabel 7. Blokk 1 haplotüüpide analüüs paanikahäire ja kaasuvate ärevushäirete rühmas.

Haplotüübid	Kontrollid (n=291)	PDA (n=51)	OR (95% CI)	p-väärtus
GT	69,9	80,9	1,826 (1,069–3,120)	0,03
AG	18,8	13,9	0,698 (0,379–1,286)	0,25
GG	10,4	5,1	0,464 (0,181–1,185)	0,10

Kontrollide ja PDA veergudes on haplotüüpide sagedused (%). $P<0,05$ on poolpaksus kirjas.

Võrreldes blokk 2 haplotüüpide esinemissagedusi neljas spetsiifilises patsientide rühmas ja kontrollrühmas, saadi, samuti nagu varem patsientide üldrühma puhul, tulemuseks haplotüübi TGT statistiliselt oluline sageduse tõus unipolaarse häire ja kaasuvate ärevushäirete rühmas ($p=0,007$; OR=7,727; CI 1,316–45,370) (Tabel 8). Antud tulemus jäi statistiliselt oluliseks ka peale permutatsiooni ($p=0,04$). Lisaks tuvastati ainult unipolaarse häire diagnoosiga patsientide rühmas haplotüübi CAT statistiliselt oluline sageduse tõus, mida usaldusväarsuse kriteerium siiski napilt ei kinnitanud ($p=0,04$; OR=3,151; CI 0,986–10,077) (Tabel 9). Ülejäänud blokk 2 haplotüüpide esinemissagedustes kõrvalekaldeid ei tuvastatud (Tabel 8, 9).

Tabel 8. Blokk 2 haplotüüpide analüüs unipolaarse häire ja kaasuvate ärevushäirete rühmas.

Haplotüübid	Kontrollid (n=291)	MDA (n=236)	OR (95% CI)	p-väärtus
CGT	51,7	50,5	0,957 (0,742–1,235)	0,74
TAC	45,0	42,1	0,890 (0,688–1,151)	0,38
CAT	1,0	2,2	1,947 (0,679–5,579)	0,20
TGT	0,3	2,2	7,727 (1,316–45,370)	0,007
CAC	1,6	0,9	0,567 (0,168–1,908)	0,36

Kontrollide ja MDA veergudes on haplotüüpide sagedused (%). $P<0,05$ on poolpaksus kirjas.

Tabel 9. Blokk 2 haplotüüpide analüüs unipolaarse häire rühmas.

Haplotüübid	Kontrollid (n=291)	MD0 (n=93)	OR (95% CI)	p-väärtus
CGT	51,7	51,4	0,991 (0,705–1,395)	0,96
TAC	45,0	38,4	0,756 (0,533–1,071)	0,11
CAT	1,0	3,5	3,151 (0,986–10,077)	0,04
TGT	0,3	–	–	–
CAC	1,6	1,7	1,243 (0,319–4,845)	0,77

Kontrollide ja MD0 veergudes on haplotüüpide sagedused (%). $P<0,05$ on poolpaksus kirjas.

5. Arutelu

Meeleolu- ja ärevushäirete väljakujunemises on oma roll loomulikult immuunsüsteemil, eriti põletikuvastusel. Korduvalt on tõestatud mitmete põletikuliste mediaatorite, sealhulgas tsütokiinide IL-1, IL-6 ja TNF- α , ekspressiooni tõusu unipolaarse häire korral ja efekti kesknärvisüsteemi funktsioneerimisele (Raison *et al.*, 2006). Andmeid immuunsüsteemi ja ärevuse sümptomite seostest on märgatavalt vähem, kuid ka siin on mõõdetud IL-6 ja TNF- α ekspressiooni tõusu (Pitsavos *et al.*, 2006). Kuna kõigi IL-10 klasteri tsütokiinide puhul on omakorda tuvastatud osalus põletikuvastuse regulatsioonis, on ühtlasi alust oletada ka nende rolli psüühikahäirete väljakujunemises. Seoses mõjuga põletikuliste tsütokiinide produktsioonile võib rääkida IL-10-st kui põletikuvastasest tsütokiinist, IL-19 puhul on mõjud ambivalentseid ning IL-20 ja IL-24 võib pidada põletikku soodustavateks tsütokiinideks (Moore *et al.*, 1990; Liao *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2005; Hsing *et al.*, 2006a; Mumm *et al.*, 2006). Vaatamata eelpool mainitule, pole peale IL-10 antud klasteri tsütokiine seni seoses psüühikahäiretega uuritud ei geneetilisel ega funktsionaalsel tasemel.

Ainsad uurimused meeleolu- ja ärevushäirete seostest polümorfismidega tsütokiinide geenides on keskendunud üksikutele SNP-dele IL-1, IL-6 ja TNF- α ja IL-10 promootorite piirkonnas (Yu *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005; Jun *et al.*, 2003; Jun *et al.*, 2002; Zai *et al.*, 2006). IL-10 geeni puhul oli vaatluse all SNP positsioonis -819, kuid selle assotsiatsiooni unipolaarse häirega Korea populatsioonis ei tuvastatud (Jun *et al.*, 2002). Samas on IL-19 alamperekonna tsütokiinide geenide polümorfisme uuritud seoses põletikuliste haigustega nagu psoriaas ja palmoplantaarne pustuloos, mille korral on kõrgeks tõusnud põletikuliste tsütokiinide IL-6, TNF- α ja IFN- γ tase organismis (Köks *et al.*, 2005; Kingo *et al.*, 2007). Mainitud uurimustes tuvastati kahe haplotüübiploki olemasolu IL-19 alamperekonna tsütokiinide geenides ning esinenud haplotüüpide nii protektiivseid kui ka soodustavaid efekte vaadeldud haiguste väljakujunemisele. Saadud tulemused viitavad võimalusele, et erinevad haplotüüpid omavad efekti vastavate geenide ekspressioonile, kuid antud hüpotees on seni eksperimentaalselt tõestamata. Samuti on seoses põletikuliste haigustega uuritud polümorfisme IL-10 geenis, täpsemalt reumatoidartriidi, põletikulise soolehaiguse, süsteemse erütematoosse luupuse, raskekujulise astma ja psoriaasi korral (Crawley *et al.*, 1999; Tagore *et al.*,

1999; Gibson *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2000; Kingo *et al.*, 2003). Ühtlasi on tõestatud ka IL-10 SNP-de (sealhulgas ka rs1800872) seotust ekspressioonitasemega ning kokku hinnatakse geneetiliste faktorite osatähtsust selles 50–75% (Crawley *et al.*, 1999; Westendorp *et al.*, 1997).

Toetudes varasemale informatsioonile IL-10 klatri tsütokiinide geenide polümorfismide seostest põletikuliste haigustega ja omakorda põletikuvastuse rollist psüühikahäirete etioloogias, oli antud uurimuse eesmärgiks tuvastada võimalikke seoseid antud regioonist valitud polümorfismide ning meeleolu- ja ärevushäirete vahel. Lisaks väärrib siinkohal meeleolu- ja ärevushäirete kõrge komorbiidsuse tõttu mainimist ka fakt, et üle-genoomses aheldusuuringus määrati üheks bipolaarse häire vastuvõtlikkuse lookuseks 1q31-32 (Detera-Wadleigh *et al.*, 1999).

Psühhiaatrilised haigused kuuluvad komplekshaiguste hulka, mille kujunemisel osalevad lisaks keskkonnafaktoritele mitmed geneetilised faktorid. Kuna komplekshaiguste põhjustajateks peetakse populatsioonis levinud polümorfisme, millest igal üksikuna on suhteliselt väike efekt haiguse kujunemisele (levinud variatsioon/levinud haigus hüpotees) (Zondervan & Cardon, 2004), siis valiti antud uurimuses IL-10 tsütokiinide geenide klattrist 6 SNP-d, millede minoorsete alleelide esinemissagedused olid >10% (tulemuste põhjal oli kõige madalam 21.1%).

Assotsiatsioonianalüüsiga tuvastati IL-20 geenis paikneva SNP rs2981572 minoorse alleeli protektiivne efekt paanikahäire ja kaasuvate ärevushäirete väljakujunemisele ($p=0,03$). Saadud tulemus vastandub assotsiatsiooniuringuga psoriaasi korral, kus antud SNP minoorne alleel omas haigust soodustavat efekti (Kingo *et al.*, 2004). Kuna rs2981572 asub IL-20 geeni promotori regioonis ning on lähim SNP oletatavale Cdc5 seondumissaidile, siis on võimalik selle efekt IL-20 ekspressioonile. Siiski on antud mõju seni eksperimentaalselt tõestamata ning tulemuste tõlgendamise teeb ettevaatlikuks ka patsientide suhteliselt väike arv käesolevas katses.

Kuna mitmed uurimused on viidanud, et SNP-de kombineeritud efekt haplotüüpides on efektiivsem meetod üksikute SNP-de assotsiatsioonide määramisest (Carlson *et al.*, 2004), siis viidi järgnevalt läbi ka LD analüüs ja haplotüübianalüüs. LD analüüsi tulemusena ilmnes peaaegu täielik aheldatus esiteks SNP-de rs2243193 ja rs2981572 ($D'=0,94$) ning teiseks rs1518108, rs1150253 ja rs1150258 vahel ($D' 0,91$ kuni $0,95$). Moodustunud haplotüübiblokid oli heas kooskõlas varasemate tulemustega antud genoomsest piirkonnast (Köks *et al.*, 2005; Kingo *et al.*, 2007).

Edasine haplotüübianalüüs määras kahe psühhiaatriliste haiguste vastuvõtlikkusega seotud haplotüübi olemasolu. Esiteks oli blokk 1 haplotüüp GT seotud suurenenud vastuvõtlikkusega paanikahäire ja kaasuvate ärevushäirete väljakujunemisele ($P=0,03$; $OR=1,826$; $CI\ 1,069-3,120$). Saadud assotsiatsioon peegeldas põhiliselt varem ilmnenu G alleeli individuaalset efekti positsioonis rs2981572. Teiseks oli blokk 2 haplotüüp TGT seotud suurenenud vastuvõtlikkusega kõigile uuritud psüühikahäiretele ühendatult ($p=0,014$; $OR=6,617$; $CI\ 1,159-37,767$) ning spetsiifiliselt unipolaarsele häirele ja kaasuvatele ärevushäiretele ($p=0,007$; $OR=7,727$; $CI\ 1,316-45,370$). Sealjuures jäi viimane assotsiatsioon statistiliselt oluliseks ka peale permutatsioonitesti. Taaskord vastandub tulemus assotsiatsiooniuuringuga psoriaasi korral, kus antud haplotüüp omas protektiivset efekti (Köks *et al.*, 2005). Vaatamata tugevale statistilisele efektile on käesolevas uurimuses antud haplotüübil väga madal esinemissagedus. Nagu eelnevalt näha, saadi ühe alleelse ja ühe haplotüübiefekti puhul psoriaasi uuringus vastupidine tulemus. Palmoplantaarse pustuloosi korral ei esinenud siin protektiivseid ega ka soodustavaid efekte (Kingo *et al.*, 2007). Lisaks ei detekteeritud antud juhul ühte blokk 1 haplotüübi soodustavat (Köks *et al.*, 2005; Kingo *et al.*, 2007) ning ühte blokk 2 haplotüübi soodustavat (Kingo *et al.*, 2007) ja protektiivset efekti (Köks *et al.*, 2005; Kingo *et al.*, 2007).

Seega juhul, kui pidada käesolevaid statistilisi tulemusi funktsionaalselt relevantseteks, siis võib oletada vastavatesse blokkidesse kuuluvate geenide erinevat rolli meeleolu- ja ärevushäirete ning psoriaasi ja palmoplantaarse pustuloosi etioloogias.

Selleks, et täpsemalt määratleda IL-10 klasteri tsütokiinide osalust meeleolu- ja ärevushäirete korral, oleks edaspidi vajalik täiendavalt uurida polümorfisme antud geenides ja läbi viia nende funktsioone defineerivaid eksperimente.

Kokkuvõte

Nii meeleolu- kui ärevushäirete puhul on põhjust oletada immuunsüsteemi osalust nende väljakujunemises. Kuna IL-10 perekonna tsütokiinid IL-10, IL-19, IL-20 ja IL-24 osalevad kõik põletikuliste protsesside regulatsioonis, siis oli antud uurimustöö eesmärgiks tuvastada seosed nende geenide polümorfismide ja mainitud psüühikahäirete vahel. Selleks valiti 6 SNP-d IL-10 geenide klastrist ning genotüpeeriti nende suhtes 372 patsienti ja 291 kontrollisikut Eesti populatsioonist. Saadud andmete põhjal teostati kõigepealt assotsiatsioonianalüüs üksikute polümorfismide lõikes, mille tulemusena tehti kindlaks SNP rs2981572 minoorse alleeli protektiivne efekt paanikahäire ja kaasuvate ärevushäirete suhtes. Määramaks uuritavate SNP-de omavahelist aheldatust, viidi järgnevalt läbi LD analüüs. Tuvastati peaaegu täieliku aheldatuse esinemine esiteks SNP-de rs2243193 ja rs2981572 vahel ja teiseks rs1518108, rs1150243 ja rs1150258 vahel ning kinnitati varasemaid andmeid LD muustrist IL-10 geenide klastris. Mainitud kaks haplotüübiblokki võimaldasid järevalt teostada haplotüübianalüüsi, mille käigus määrati kindlaks kahe psüühikahäiretega assotsieerunud haplotüübi olemasolu. Blokk 1 haplotüüp GT oli seotud suurenenud vastuvõtlikkusega paanikahäire ja kaasuvate ärevushäirete väljakujunemisele. Blokk 2 haplotüüp TGT oli seotud suurenenud vastuvõtlikkusega kõigile uuritud psüühikahäiretele ühendatult ning spetsiifiliselt unipolaarsele häirele ja kaasuvatele ärevushäiretele. Viimane tulemus jäi statistiliselt oluliseks ka peale permutatsioonitesti. Käesoleva töö tulemused vajavad edasist uurimist täiendavate assotsiatsiooniuringute ja funktsionaalsete eksperimentide näol.

Summary

Mood and anxiety disorders are complex diseases that not only affect the lives of the patients but also their family members and are one of the major causes of disability worldwide. In spite of intensive research, the definite causes of these disorders are still largely unknown. To date, the most popular explanation of the cause has been the monoamine hypothesis. Although it has led to many advancements in pharmacotherapy, it only encompasses a part of the disturbances producing the disease. Meanwhile, increasing amounts of data suggest that inflammatory responses have an important role in the pathophysiology of depression. Considerably less evidence exists for anxiety disorders but seeing the high comorbidity with mood disorders one can expect shared mechanisms in this domain also.

Interleukin-10 (IL-10) and its recently discovered paralogs interleukin-19 (IL-19), interleukin-20 (IL-20) and interleukin-24 (IL-24) are all implicated in inflammatory processes. They have also been established as important mediators in various inflammatory diseases. Therefore the aim of the present study was to investigate the associations between polymorphisms in the genes of aforementioned cytokines and mood and anxiety disorders.

Case-control association study was performed with 6 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at the IL-10 gene cluster, using ARMS-PCR and tetra-primer ARMS-PCR method for genotyping. 372 unrelated patients with mood or anxiety disorders and 291 unrelated control subjects enrolled in this study were Caucasians living in Estonia.

Comparing patients with controls SNP rs2981572 showed statistically significant association with panic disorder and comorbid anxiety disorders ($p=0,03$). Subsequent LD analysis indicated the existence of two haplotype blocks, one containing rs2243193 and rs2982572 (from IL-19 and IL-20 genes, respectively, $D'=0,94$) and the other containing rs1518108, rs1150253 and rs1150258 (the first SNP from IL-20 and the rest from IL-24 gene, D' between 0,91 and 0,95) confirming the formerly established LD pattern in the IL-10 gene cluster. Additionally, the haplotype analysis provided two haplotypes associated with increased disease susceptibility. Block 1 haplotype GT was associated with panic disorder and comorbid anxiety disorders ($p=0,03$; OR=1,826; CI 1,069–3,120). Block 2 haplotype TGT was associated with all disorders combined

($P=0,014$; $OR=6,617$; $CI\ 1,159-37,767$) and more specifically with unipolar disorder and comorbid anxiety disorders ($p=0,007$; $OR=7,727$; $CI\ 1,316-45,370$). The latter result still remained statistically significant after permutation testing.

Although statistical associations were established in this study, further investigations of additional polymorphisms from this region and their effect on gene expression are required to define the roles of IL-10 family cytokines in mood and anxiety disorders.

Tänuavaldused

Magistritöö valmimise eest olen eelkõige tänu võlgu mind juhendanud Sulev Kõks'ile ja Kati Koido'le. Veel tänan Külli Kingo't kasulike nõuannete eest, Eerik Aunin'it konsultatsioonide eest ning lõppkokkuvõttes kogu Füsioloogia Instituudi kollektiivi, kellest kõik on selle töö teoks saamisel mingil moel abiks olnud.

Kirjandus

- Allen, M., Pratscher, B., Roka, F., Krepler, C., Wacheck, V., Schofer, C., Pehamberger, H., Muller, M. & Lucas, T. (2004) Loss of novel mda-7 splice variant (mda-7s) expression is associated with metastatic melanoma. *J Invest Dermatol*, 123, 583-588.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 263-265.
- Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W.F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B.A., Hammond, A., Haugen, H., Jelinek, L., Kelly, J.D., Madden, K., Maurer, M.F., Parrish-Novak, J., Prunkard, D., Sexson, S., Sprecher, C., Waggle, K., West, J., Whitmore, T.E., Yao, L., Kuechle, M.K., Dale, B.A. & Chandrasekhar, Y.A. (2001) Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*, 104, 9-19.
- Capuron, L. & Dantzer, R. (2003) Cytokines and depression: the need for a new paradigm. *Brain Behav Immun*, 17 Suppl 1, S119-124.
- Carlson, C.S., Eberle, M.A., Kruglyak, L. & Nickerson, D.A. (2004) Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*, 429, 446-452.
- Caudell, E.G., Mumm, J.B., Poindexter, N., Ekmekcioglu, S., Mhashilkar, A.M., Yang, X.H., Retter, M.W., Hill, P., Chada, S. & Grimm, E.A. (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., Sutton, R.B., Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J., Mumm, J.B., Leitner, W.W., Yang, H.Y., Sahin, A.A., Hunt, K.K., Fuson, K.L., Poindexter, N., Roth, J.A., Ramesh, R., Grimm, E.A. & Mhashilkar, A.M. (2004) MDA-7/IL-24 is a unique cytokine--tumor suppressor in the IL-10 family. *Int Immunopharmacol*, 4, 649-667.
- Chang, C., Magracheva, E., Kozlov, S., Fong, S., Tobin, G., Kotenko, S., Wlodawer, A. & Zdanov, A. (2003) Crystal structure of interleukin-19 defines a new subfamily of helical cytokines. *J Biol Chem*, 278, 3308-3313.
- Chen, W.Y., Cheng, B.C., Jiang, M.J., Hsieh, M.Y. & Chang, M.S. (2006) IL-20 is expressed in atherosclerosis plaques and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 2090-2095.
- Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I. & Woo, P. (1999) 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*, 42, 1101-1108.
- Dantzer, R. (2001) Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci*, 933, 222-234.
- Dantzer, R. (2004) Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol*, 500, 399-411.
- Dantzer, R. (2005) Somatization: a psychoneuroimmune perspective. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 947-952.
- Detera-Wadleigh, S.D., Badner, J.A., Berrettini, W.H., Yoshikawa, T., Goldin, L.R., Turner, G., Rollins, D.Y., Moses, T., Sanders, A.R., Karkera, J.D., Esterling, L.E., Zeng, J., Ferraro, T.N., Guroff, J.J., Kazuba, D., Maxwell, M.E., Nurnberger, J.I., Jr. & Gershon, E.S. (1999) A high-density genome scan detects

- evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5604-5609.
- Donnelly, R.P., Dickensheets, H. & Finbloom, D.S. (1999)** The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*, 19, 563-573.
- Drevets, W.C. (2001)** Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 11, 240-249.
- Duman, R.S. (2004)** Depression: a case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, 56, 140-145.
- Dumoutier, L., Leemans, C., Lejeune, D., Kotenko, S.V. & Renauld, J.C. (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.
- Evans, D.L., Charney, D.S., Lewis, L., Golden, R.N., Gorman, J.M., Krishnan, K.R., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., Carney, R.M., Coyne, J.C., DeLong, M.R., Frasurre-Smith, N., Glassman, A.H., Gold, P.W., Grant, I., Gwyther, L., Ironson, G., Johnson, R.L., Kanner, A.M., Katon, W.J., Kaufmann, P.G., Keefe, F.J., Ketter, T., Laughren, T.P., Leserman, J., Lyketsos, C.G., McDonald, W.M., McEwen, B.S., Miller, A.H., Musselman, D., O'Connor, C., Petitto, J.M., Pollock, B.G., Robinson, R.G., Roose, S.P., Rowland, J., Sheline, Y., Sheps, D.S., Simon, G., Spiegel, D., Stunkard, A., Sunderland, T., Tibbits, P., Jr. & Valvo, W.J. (2005)** Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry*, 58, 175-189.
- Fickenscher, H., Hor, S., Kupers, H., Knappe, A., Wittmann, S. & Sticht, H. (2002)** The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol*, 23, 89-96.
- Gallagher, G., Dickensheets, H., Eskdale, J., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Peat, J.D., Vazquez, N., Pestka, S., Donnelly, R.P. & Kotenko, S.V. (2000)** Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun*, 1, 442-450.
- Gallagher, G., Eskdale, J., Jordan, W., Peat, J., Campbell, J., Boniotto, M., Lennon, G.P., Dickensheets, H. & Donnelly, R.P. (2004)** Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol*, 4, 615-626.
- Gibson, A.W., Edberg, J.C., Wu, J., Westendorp, R.G., Huizinga, T.W. & Kimberly, R.P. (2001)** Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 166, 3915-3922.
- Gupta, P., Su, Z.Z., Lebedeva, I.V., Sarkar, D., Sauane, M., Emdad, L., Bachelor, M.A., Grant, S., Curiel, D.T., Dent, P. & Fisher, P.B. (2006)** mda-7/IL-24: multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine. *Pharmacol Ther*, 111, 596-628.
- Harre, E.M., Roth, J., Pehl, U., Kueth, M., Gerstberger, R. & Hubschle, T. (2002)** Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol*, 92, 2657-2666.
- Herbert, T.B. & Cohen, S. (1993)** Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull*, 113, 472-486.
- Hettema, J.M., Neale, M.C. & Kendler, K.S. (2001)** A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry*, 158, 1568-1578.

- Hong, C.J., Yu, Y.W., Chen, T.J. & Tsai, S.J. (2005)** Interleukin-6 genetic polymorphism and Chinese major depression. *Neuropsychobiology*, 52, 202-205.
- Hosoi, T., Wada, S., Suzuki, S., Okuma, Y., Akira, S., Matsuda, T. & Nomura, Y. (2004)** Bacterial endotoxin induces IL-20 expression in the glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 130, 23-29.
- Howland, R.H. & Thase, M.E. (2005)** Comorbid Depression and Anxiety: When and How to Treat. *Journal of Psychiatry*, 11, 891-1047.
- Hsieh, M.Y., Chen, W.Y., Jiang, M.J., Cheng, B.C., Huang, T.Y. & Chang, M.S. (2006)** Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes Immun*, 7, 234-242.
- Hsing, C.H., Ho, C.L., Chang, L.Y., Lee, Y.L., Chuang, S.S. & Chang, M.S. (2006a)** Tissue microarray analysis of interleukin-20 expression. *Cytokine*, 35, 44-52.
- Hsing, C.H., Hsieh, M.Y., Chen, W.Y., Cheung So, E., Cheng, B.C. & Chang, M.S. (2006b)** Induction of interleukin-19 and interleukin-22 after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 81, 2196-2201.
- Hsu, Y.H., Li, H.H., Hsieh, M.Y., Liu, M.F., Huang, K.Y., Chin, L.S., Chen, P.C., Cheng, H.H. & Chang, M.S. (2006)** Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis Rheum*, 54, 2722-2733.
- Huang, E.Y., Madireddi, M.T., Gopalkrishnan, R.V., Leszczyniecka, M., Su, Z., Lebedeva, I.V., Kang, D., Jiang, H., Lin, J.J., Alexandre, D., Chen, Y., Vozhilla, N., Mei, M.X., Christiansen, K.A., Sivo, F., Goldstein, N.I., Mhashilkar, A.B., Chada, S., Huberman, E., Pestka, S. & Fisher, P.B. (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.
- Inoue, S., Shanker, M., Miyahara, R., Gopalan, B., Patel, S., Oida, Y., Branch, C.D., Munshi, A., Meyn, R.E., Andreeff, M., Tanaka, F., Mhashilkar, A.M., Chada, S. & Ramesh, R. (2006)** MDA-7/IL-24-based cancer gene therapy: translation from the laboratory to the clinic. *Curr Gene Ther*, 6, 73-91.
- Irwin, M.R. & Miller, A.H. (2007)** Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*, 21, 374-383.
- Jiang, H., Lin, J.J., Su, Z.Z., Goldstein, N.I. & Fisher, P.B. (1995)** Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 11, 2477-2486.
- Johnson, R.W. (2002)** The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet Immunol Immunopathol*, 87, 443-450.
- Jordan, W.J., Eskdale, J., Boniotto, M., Lennon, G.P., Peat, J., Campbell, J.D. & Gallagher, G. (2005)** Human IL-19 regulates immunity through auto-induction of IL-19 and production of IL-10. *Eur J Immunol*, 35, 1576-1582.
- Jun, T.Y., Pae, C.U., Chae, J.H., Bahk, W.M., Kim, K.S. & Han, H. (2002)** Report on IL-10 gene polymorphism at position -819 for major depression and schizophrenia in Korean population. *Psychiatry Clin Neurosci*, 56, 177-180.
- Jun, T.Y., Pae, C.U., Hoon, H., Chae, J.H., Bahk, W.M., Kim, K.S. & Serretti, A. (2003)** Possible association between -G308A tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatr Genet*, 13, 179-181.
- Kenis, G. & Maes, M. (2002)** Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int J Neuropsychopharmacol*, 5, 401-412.

- Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Zhao, S., Nelson, C.B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H.U. & Kendler, K.S. (1994)** Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*, 51, 8-19.
- Kim, J.M., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Khan, T.A. & Moore, K.W. (1992)** Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol*, 148, 3618-3623.
- Kingo, K., Kõks, S., Nikopensius, T., Silm, H. & Vasar, E. (2004)** Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes Immun*, 5, 117-121.
- Kingo, K., Kõks, S., Silm, H. & Vasar, E. (2003)** IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun*, 4, 455-457.
- Kingo, K., Mossner, R., Kõks, S., Rätsep, R., Kruger, U., Vasar, E., Reich, K. & Silm, H. (2007)** Association analysis of IL19, IL20 and IL24 genes in palmoplantar pustulosis. *Br J Dermatol*.
- Konsman, J.P., Luheshi, G.N., Bluthe, R.M. & Dantzer, R. (2000)** The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci*, 12, 4434-4446.
- Kotenko, S.V., Krause, C.D., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Wu, W. & Pestka, S. (1997)** Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *Embo J*, 16, 5894-5903.
- Kube, D., Platzer, C., von Knethen, A., Straub, H., Bohlen, H., Hafner, M. & Tesch, H. (1995)** Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine*, 7, 1-7.
- Kõks, S., Kingo, K., Vabrit, K., Rätsep, R., Karelson, M., Silm, H. & Vasar, E. (2005)** Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun*, 6, 407-415.
- Laye, S., Gheusi, G., Cremona, S., Combe, C., Kelley, K., Dantzer, R. & Parnet, P. (2000)** Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279, R93-98.
- Lesch, K.P. (2004)** Gene-environment interaction and the genetics of depression. *J Psychiatry Neurosci*, 29, 174-184.
- Levinson, D.F., Zubenko, G.S., Crowe, R.R., DePaulo, R.J., Scheftner, W.S., Weissman, M.M., Holmans, P., Zubenko, W.N., Boutelle, S., Murphy-Eberenz, K., MacKinnon, D., McInnis, M.G., Marta, D.H., Adams, P., Sassoon, S., Knowles, J.A., Thomas, J. & Chellis, J. (2003)** Genetics of recurrent early-onset depression (GenRED): design and preliminary clinical characteristics of a repository sample for genetic linkage studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 119, 118-130.
- Lewontin, R.C. (1964)** The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*, 49, 49-67.
- Li, Q., Withoff, S. & Verma, I.M. (2005)** Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol*, 26, 318-325.
- Liao, S.C., Cheng, Y.C., Wang, Y.C., Wang, C.W., Yang, S.M., Yu, C.K., Shieh, C.C., Cheng, K.C., Lee, M.F., Chiang, S.R., Shieh, J.M. & Chang, M.S. (2004)** IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. *J Immunol*, 173, 6712-6718.
- Liao, Y.C., Liang, W.G., Chen, F.W., Hsu, J.H., Yang, J.J. & Chang, M.S. (2002)** IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol*, 169, 4288-4297.

- Liu, Y., Wei, S.H., Ho, A.S., de Waal Malefyt, R. & Moore, K.W. (1994)** Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol*, 152, 1821-1829.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J. & Yankner, B.A. (2004)** Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429, 883-891.
- Madrigal, J.L., Hurtado, O., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bosca, L. & Leza, J.C. (2002)** The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology*, 26, 155-163.
- Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpe, S. & Smith, R.S. (1998)** The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*, 10, 313-318.
- Marietta, E.V., Chen, Y. & Weis, J.H. (1996)** Modulation of expression of the anti-inflammatory cytokines interleukin-13 and interleukin-10 by interleukin-3. *Eur J Immunol*, 26, 49-56.
- Marques-Deak, A., Cizza, G. & Sternberg, E. (2005)** Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry*, 10, 239-250.
- Marques-Deak, A. & Sternberg, E. (2004)** [Psychoneuroimmunology--the relation between the central nervous system and the immune system]. *Rev Bras Psiquiatr*, 26, 143-144.
- Martinot, M., Bragulat, V., Artiges, E., Dolle, F., Hinnen, F., Jouvent, R. & Martinot, J. (2001)** Decreased presynaptic dopamine function in the left caudate of depressed patients with affective flattening and psychomotor retardation. *Am J Psychiatry*, 158, 314-316.
- McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S. & Albrecht, J.K. (1998)** Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*, 339, 1485-1492.
- Merikangas, K.R., Angst, J., Eaton, W., Canino, G., Rubio-Stipec, M., Wacker, H., Wittchen, H.U., Andrade, L., Essau, C., Whitaker, A., Kraemer, H., Robins, L.N. & Kupfer, D.J. (1996)** Comorbidity and boundaries of affective disorders with anxiety disorders and substance misuse: results of an international task force. *Br J Psychiatry Suppl*, 58-67.
- Mhashilkar, A.M., Schrock, R.D., Hindi, M., Liao, J., Sieger, K., Kourouma, F., Zou-Yang, X.H., Onishi, E., Takh, O., Vedvick, T.S., Fanger, G., Stewart, L., Watson, G.J., Snary, D., Fisher, P.B., Saeki, T., Roth, J.A., Ramesh, R. & Chada, S. (2001)** Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel anti-tumor gene for cancer gene therapy. *Mol Med*, 7, 271-282.
- Moldin, S.O., Reich, T. & Rice, J.P. (1991)** Current perspectives on the genetics of unipolar depression. *Behav Genet*, 21, 211-242.
- Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstein, M.L., Khan, T.A. & Mosmann, T.R. (1990)** Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248, 1230-1234.
- Moraska, A., Campisi, J., Nguyen, K.T., Maier, S.F., Watkins, L.R. & Fleshner, M. (2002)** Elevated IL-1beta contributes to antibody suppression produced by stress. *J Appl Physiol*, 93, 207-215.

- Mumm, J.B., Ekmekcioglu, S., Poindexter, N.J., Chada, S. & Grimm, E.A. (2006)** Soluble human MDA-7/IL-24: characterization of the molecular form(s) inhibiting tumor growth and stimulating monocytes. *J Interferon Cytokine Res*, 26, 877-886.
- Nadjar, A., Bluthe, R.M., May, M.J., Dantzer, R. & Parnet, P. (2005)** Inactivation of the cerebral NFkappaB pathway inhibits interleukin-1beta-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei. *Neuropsychopharmacology*, 30, 1492-1499.
- Nagalakshmi, M.L., Murphy, E., McClanahan, T. & de Waal Malefyt, R. (2004)** Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol*, 4, 577-592.
- Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C. & Markham, A.F. (1989)** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, 17, 2503-2516.
- Otkjaer, K., Kragballe, K., Funding, A.T., Clausen, J.T., Noerby, P.L., Steiniche, T. & Iversen, L. (2005)** The dynamics of gene expression of interleukin-19 and interleukin-20 and their receptors in psoriasis. *Br J Dermatol*, 153, 911-918.
- Owens, M.J. & Nemeroff, C.B. (1991)** Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev*, 43, 425-473.
- Pace, T.W., Hu, F. & Miller, A.H. (2007)** Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun*, 21, 9-19.
- Pariante, C.M. & Miller, A.H. (2001)** Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 49, 391-404.
- Pitsavos, C., Panagiotakos, D.B., Papageorgiou, C., Tsetsekou, E., Soldatos, C. & Stefanadis, C. (2006)** Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: the ATTICA study. *Atherosclerosis*, 185, 320-326.
- Poindexter, N.J., Walch, E.T., Chada, S. & Grimm, E.A. (2005)** Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*, 78, 745-752.
- Qin, Z.S., Niu, T. & Liu, J.S. (2002)** Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 71, 1242-1247.
- Raison, C.L., Capuron, L. & Miller, A.H. (2006)** Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27, 24-31.
- Raison, C.L. & Miller, A.H. (2003)** When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*, 160, 1554-1565.
- Romer, J., Hasselager, E., Norby, P.L., Steiniche, T., Thorn Clausen, J. & Kragballe, K. (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.
- Sauane, M., Gopalkrishnan, R.V., Lebedeva, I., Mei, M.X., Sarkar, D., Su, Z.Z., Kang, D.C., Dent, P., Pestka, S. & Fisher, P.B. (2003)** Mda-7/IL-24 induces apoptosis of diverse cancer cell lines through JAK/STAT-independent pathways. *J Cell Physiol*, 196, 334-345.
- Shin, H.D., Winkler, C., Stephens, J.C., Bream, J., Young, H., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Vlahov, D., Buchbinder, S., Giorgi, J., Rinaldo, C., Donfield, S., Willoughby, A., O'Brien, S.J. & Smith, M.W. (2000)** Genetic restriction of HIV-1

- pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14467-14472.
- Smoller, J.W. & Finn, C.T. (2003)** Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 123, 48-58.
- Soo, C., Shaw, W.W., Freymiller, E., Longaker, M.T., Bertolami, C.N., Chiu, R., Tieu, A. & Ting, K. (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.
- Sullivan, P.F., Neale, M.C. & Kendler, K.S. (2000)** Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 157, 1552-1562.
- Zai, G., Arnold, P.D., Burroughs, E., Richter, M.A. & Kennedy, J.L. (2006)** Tumor necrosis factor-alpha gene is not associated with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Genet*, 16, 43-45.
- Zdanov, A. (2004)** Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Curr Pharm Des*, 10, 3873-3884.
- Zdanov, A. (2006)** Structural studies of the interleukin-19 subfamily of cytokines. *Vitam Horm*, 74, 61-76.
- Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Gustchina, A., Tsang, M., Weatherbee, J. & Wlodawer, A. (1995)** Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure*, 3, 591-601.
- Zhong, H., Wu, Y., Belardinelli, L. & Zeng, D. (2006)** A2B adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35, 587-592.
- Zhu, C.B., Blakely, R.D. & Hewlett, W.A. (2006)** The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2121-2131.
- Zondervan, K.T. & Cardon, L.R. (2004)** The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet*, 5, 89-100.
- Tagore, A., Gonsalkorale, W.M., Pravica, V., Hajeer, A.H., McMahan, R., Whorwell, P.J., Sinnott, P.J. & Hutchinson, I.V. (1999)** Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*, 54, 386-390.
- Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P.J. & Hutchinson, I.V. (1997)** An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24, 1-8.
- Wang, M. & Liang, P. (2005)** Interleukin-24 and its receptors. *Immunology*, 114, 166-170.
- Wang, M., Tan, Z., Zhang, R., Kotenko, S.V. & Liang, P. (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.
- Webster, J.I., Tonelli, L. & Sternberg, E.M. (2002)** Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, 20, 125-163.
- Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R. & Weber-Nordt, R.M. (1996)** IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett*, 394, 365-370.
- Wei, C.C., Hsu, Y.H., Li, H.H., Wang, Y.C., Hsieh, M.Y., Chen, W.Y., Hsing, C.H. & Chang, M.S. (2006)** IL-20: biological functions and clinical implications. *J Biomed Sci*, 13, 601-612.
- Weissman, M.M., Bland, R.C., Canino, G.J., Faravelli, C., Greenwald, S., Hwu, H.G., Joyce, P.R., Karam, E.G., Lee, C.K., Lellouch, J., Lepine, J.P., Newman, S.C., Oakley-Browne, M.A., Rubio-Stipec, M., Wells, J.E., Wickramaratne, P.J.,**

- Wittchen, H.U. & Yeh, E.K. (1997)** The cross-national epidemiology of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 54, 305-309.
- Wellen, K.E. & Hotamisligil, G.S. (2005)** Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115, 1111-1119.
- Westendorp, R.G., Langermans, J.A., Huizinga, T.W., Verweij, C.L. & Sturk, A. (1997)** Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet*, 349, 1912-1913.
- Willerson, J.T. & Ridker, P.M. (2004)** Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*, 109, II2-10.
- Vincenti, M.P. & Brinckerhoff, C.E. (2001)** Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res*, 3, 381-388.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K. & Sabat, R. (2002)** Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol*, 168, 5397-5402.
- Wu, S., Gessner, R., Taube, T., von Stackelberg, A., Henze, G. & Seeger, K. (2005)** Expression of interleukin-10 splicing variants is a positive prognostic feature in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 23, 3038-3042.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R. & Day, I.N. (2001)** An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 29, E88-88.
- Yu, Y.W., Chen, T.J., Hong, C.J., Chen, H.M. & Tsai, S.J. (2003)** Association study of the interleukin-1 beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1182-1185.