

مطالعه ژن کاندیدا در دیابت نوع یک: ژن IFN-γ

جواد توکلی بزار^{۱*}، ورا پراویکا^۲، آندره بولتون^۳، یان هاچینسون^۴

چکیده

مقدمه: یکی از واسطه‌های التهابی مهم و ضروری در آغاز و بروز دیابت نوع ۱ سایتوکین IFN-γ می‌باشد. این سایتوکین که از گروه سایتوکین‌های Th1 محسوب می‌شود، نقش بسیار مهمی را در برانگیختن سلول‌های ایمنی بیطرف (Th0) و تبدیل آنها به سلول‌های Th1 و به طور متقابل مهار تکثیر سلول‌های Th2 دارد که در نهایت سبب القا و پیشبرد پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردد. با توجه به آنکه الگوی پاسخ ایمنی در بیماری خودایمن دیابت نوع ۱ از نوع سلولی است، این سایتوکین جایگاه مهمی را از نظر هدایت واکنش‌های خودایمن و بر هم زدن نظم عوامل سلولی و مولکولی درگیر دارد. از منظر مداخلات درمانی در بیماری دیابت نوع ۱ نیز این سایتوکین موضوع تحقیقات متعددی در سطوح مختلف بوده است.

روش‌ها: در قالب یک Candidate Gene Association Study میزان تأثیر پلی‌مورفیسم ژن IFN-γ در موقعیت +۸۷۴*T/A بر ایجاد و پیشرفت بیماری دیابت نوع ۱ مطالعه شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۴۸ نفر بیمار بریتانیایی- قفقازی با دیابت نوع ۱ و ۱۱۹ نفر بدون بیماری مشخص (سالم) بوده است. روش ARMS-PCR جهت تعیین آلل و ژنوتیپ مربوط به پلی‌مورفیسم مذکور انتخاب گردید.

یافته‌ها: توزیع فراوانی آلل/ ژنوتیپ حاصله از پلی‌مورفیسم ژن IFN-γ تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری در بین دو جمعیت مقایسه شده کنترل و بیمار نداشت ($P \geq 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به گزارش‌های قبلی که همراهی پلی‌مورفیسم مورد نظر با بیماری دیابت نوع ۱ را گزارش نموده‌اند، یافته‌های ما چنین نتیجه‌ای را تایید نمی‌کند که می‌تواند دلالت بر این نکته نماید که پلی‌مورفیسم (های) ژنی دخیل در ایجاد دیابت نوع ۱ در گزارش‌های قبلی، پلی‌مورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن IFN-γ یا در ساختمان ژن‌های مجاور) بوده اند که با پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در Linkage Disequilibrium می‌باشند.

واژگان کلیدی: ژنتیک، پلی‌مورفیسم، دیابت، IFN-γ

-
- ۱- مرکز تحقیقات غدد درونریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران
 - ۲- دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه منچستر، انگلستان
 - ۳- مرکز دیابت و بیمارستان رویال منچستر، انگلستان
 - ۴- انسیتو ملی پیوند، لوس آنجلس، امریکا

*نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درونریز و متابولیسم؛ تلفن: ۰۲۶۹۰۲-۸۸۰؛ نامبر: ۰۹۳۹۹-۰۹۸؛ پست الکترونیک: tavakkolybazzaj@tums.ac.ir

مقدمه

سایتوکین‌های رده Th1 بوده که حذف یا سرکوب آن،
وقوع دیابت را تأخیر و یا کاهش داده است [۲].
گستره وسیع در کارکردهای بیولوژیک سایتوکین‌ها همراه
با برخی دیگر از ویژگی‌ها که تقریباً برای کلیه آنها مطرح
می‌باشد، موجب بروز مشکلات و یا ابهاماتی در ارزیابی و
تفسیر نقش آنها در شرایط مختلف از جمله در بیماری‌ها
می‌گرددند. ترشح یک سایتوکین مشخص توسط سلول
های مختلف و بالعکس قابلیت تاثیر یک سایتوکین بر
سلول‌های مختلف^۷، ارایه عملکرد و اثری مشابه توسط
سایتوکین‌های مختلف^۸، تولید آبشاری و زنجیروار آنها که
یک سایتوکین سبب تحریک سلول‌ها و آزادسازی
سایتوکین‌های دیگر و حتی خودش می‌گردد و در کنار
این‌ها اثرات متقابل آنها بر یکدیگر در قالب‌هایی چون هم
افزایی^۹ و یا مخالف^{۱۰} از جمله این موارد هستند. از سوی
دیگر داشتن نیمه عمر کوتاه و غلظت‌های پلاسمایی پایین
سایتوکین‌ها سبب دشواری استخراج^{۱۱} و مشخص نمودن^{۱۲}
آنها می‌شود [۱۱]. از این روی یکی از رویکردهای
مطالعاتی در آنالیز سایتوکین‌ها، آن است که سطح جستجو
را به DNA و ساختمان ژنی این سایتوکین‌ها، یعنی قبل از
موضوعیت یافتن موانع مذکور برگردانیم. در این رویکرد
مثلاً وجود رابطه بین تغییرات ساختمانی ژن مربوط به
سایتوکین و یک بیماری یا یک نشانه و علامتی که اهمیت
بالینی و یا تحقیقاتی دارد، از یک نگاه کلی مورد کنکاش
قرار می‌گیرد.

خوشبختانه در خصوص بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های In و In Vivo چندین سایتوکین، طی مطالعات مختلف Vitro وجود یک همراهی بین نوع تغییر ساختمانی ژن و به طور مشخص آلل خاصی از آن با سطح تولید فرآورده پروتئینی آن ژن نشان داده شده است. لذا می‌توان ترجیحاً با گرینش این دسته خاص از تغییرات ژنی که اصطلاحاً کارکردنی^{۱۳} نامیده می‌شوند، به ردیابی تاثیرات فنوتیپیک آنها در جهت افزایش یا کاهش بروز یک بیماری یا یک

دیابت نوع ۱ یکی از بیماری‌های خود ایمن محدود به عضو^۱ می‌باشد که دامنه آسیب نسجی در آن منحصر به سلول‌های بتای جزاير پانکراس است. شیوه پاسخ ایمنی در این بیماری از نوع سلولی^۲ بوده که در نتیجه غلبه الگوی Th1 و فعالیت بیش از حد آن و در مقابل، مهار فعالیت محور Th2 رخ می‌دهد [۱]. سایتوکین IFN-γ به عنوان مهم ترین سایتوکین از رده Th1، نقش بسیار مهمی را در جهت دهی مسیر تمایز سلول‌های ایمنی بیطرف (Th0) و تمایز آنها به سمت سلول‌های Th1 بر عهده دارد. این سایتوکین که از سلول‌های NK، سلول‌های T سیستولیک و خود سلول‌های Th1 ترشح می‌شود، بر سلول‌های مختلفی از جمله ماکروفازها اثر می‌گذارد و سبب فعالیت و افزایش بیان مولکول‌های MHC کلاس II توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (APC) می‌شود. این سلول‌ها سپس با عرضه آنتی ژن خودی به سلول‌های T خود واکنشگر^۳ - که حتی در گنجینه^۴ سلول‌های T مربوط به افراد عادی نیز وجود دارند -، زمینه ایجاد پاسخ خودایمن را فراهم می‌آورند [۲-۷].

در فرآیند ایجاد بیماری دیابت نوع ۱ مراحل مختلفی مشاهده می‌گردد. در یکی از این مراحل که انسولیت نامیده می‌شود، جزاير لانگرهانس پانکراس توسط سلول‌های تک هسته‌ای^۵ ارتashاج می‌یابند. این وضعیت که در دوره قبل از بیان و بروز بالینی بیماری قابل تشخیص است، گاه تا پس از ظهور بالینی بیماری نیز حضورش ادامه می‌یابد [۸-۹]. یکی از واسطه‌هایی که سبب ارتashاج و اسکان^۶ سلول‌های التهابی در این جریان می‌شود، IFN-γ می‌باشد [۱۰]. از میان سایتوکین‌های Th1 که تمامی آنها سبب هدایت انسولیت به طرف انهدام سلول‌های بتا یا ترشح کننده انسولین می‌گرددند، تنها IFN-γ در سلول‌های جزاير بتای پانکراس قابل یافت بوده است. در آزمایش‌های حذفی ژن‌ها نیز IFN-γ تنها سایتوکین از میان

⁷ Pleiotropy

⁸ Redundancy

⁹ Synergistic

¹⁰ Antagonistic

¹¹ Isolation

¹² Characterization

¹³ Functional

¹ Organ-specific

² Cell Mediated

³ Auto-reactive

⁴ Repertoire

⁵ Mononuclear Cells

⁶ Homing

تعیین نوع ژنوتیپ / آلل پلیمورفیک

با تهیه حدود^۵ خون محیطی از افراد مورد مطالعه، DNA موجود در سلول های گلبول سفید استخراج گردید. پس از طراحی پرایمرهای اختصاصی برای پلیمورفیسم مورد بررسی و همچنین طراحی پرایمر برای توالی قطعه کنترل (بخشی از ساختمان ژن هورمون رشد انسانی که در نوع انسانی غیر پلیمورفیک می باشد) (جدول ۱)، آماده سازی^۳ لازم جهت تایپ کردن هر یک از ARMS - پلیمورفیسم های مورد اشاره با استفاده از روش PCR صورت گرفت. در مرحله بعد محصول PCR بدست آمده که در واقع حاوی چندین میلیون کبی از توالی مورد نظر DNA یا قطعه هدف (در بردارنده موقعیت پلیمورفیک مورد مطالعه) بود بر روی ژل آگاروز قرار داده شد و پس از حرکت قطعات بر مبنای طول آنها (تعداد نوکلئوتید)، ضمن تابش اشعه ماوراء بنفش و مشاهده نوارهای DNA، نوع ژنوتیپ / آلل هر فرد از نظر پلیمورفیسم مورد بررسی تعیین گردید (شکل ۱).

بررسی های آماری

جهت بررسی نحوه توزیع آلل ها و ژنوتیپ های مختلف بین دو گروه شاهد و بیمار از نسبت های Odds OR (Odds Ratio) و شاخص "درجه آزادی" (CI) ۹۵٪ استفاده گردید. آزمون های Chi-square و Fisher Exact جهت سنجش معنی دار بودن انتخاب گردیدند. عملیت آماری با برنامه SPSS (نسخه ۱۱/۵) و نرم افزار Stata انجام گرفت.

صفت^۱ که از حیث بیولوژیکی و پاتوفیزیولوژی دارای رابطه معنادار با فرآورده ژن مربوطه است، پرداخت. این رویکرد در مورد صفات یا بیماری هایی که دارای پس زمینه ژنتیکی هستند و بالقوه می توانند با تغییرات ساختمانی ژن مفروض رابطه ای هر چند نسبی داشته باشند، کاربرد وسیعی پیدا نموده است.

بنابراین توضیحات، مطالعه حاضر که به بررسی آثار فنوتیپیک یک پلیمورفیسم کارکرده از ژن IFN-7 در بروز بیماری دیابت نوع ۱ - که دارای زمینه های ژنتیکی شناخته شده است [۱۲] - پرداخته، موقعیت روشنی می باید.

روش ها

گروه شاهد (Healthy controls)

این گروه به تعداد ۱۱۹ نفر را افرادی تشکیل می دادند که از نژاد بریتانیایی - فرقاژی و دارای سلامت کامل بودند. همه افراد این جمعیت سابقه بیماری مشخص یا مزمنی (از جمله دیابت) را چه نزد خودشان و چه در بین بستگان درجه اول^۲ خود نمی دادند. انتخاب این افراد بطور تصادفی بود و نسبت فamilی نیز با یکدیگر نداشتند.

بیماران

از بین بیماران مبتلا به دیابت که در «مرکز دیابت منچستر» در انگلستان دارای پرونده و سابقه مشخص از بیماری دیابت بودند، تعداد ۲۴۸ نفر آنها که به بیماری دیابت نوع یک مبتلا بوده و در طی سال های ۱۹۹۸ - ۲۰۰۲ کلینیک سرپایی مراجعه داشته و در هنگام مراجعه حداقل ۵ سال از زمان آغاز / تشخیص بیماری دیابت آنها گذشته بود، بصورت تصادفی انتخاب شدند. تمامی افراد بیمار از نژاد بریتانیایی - فرقاژی بودند و قادر رابطه خویشاوندی با یکدیگر بودند.

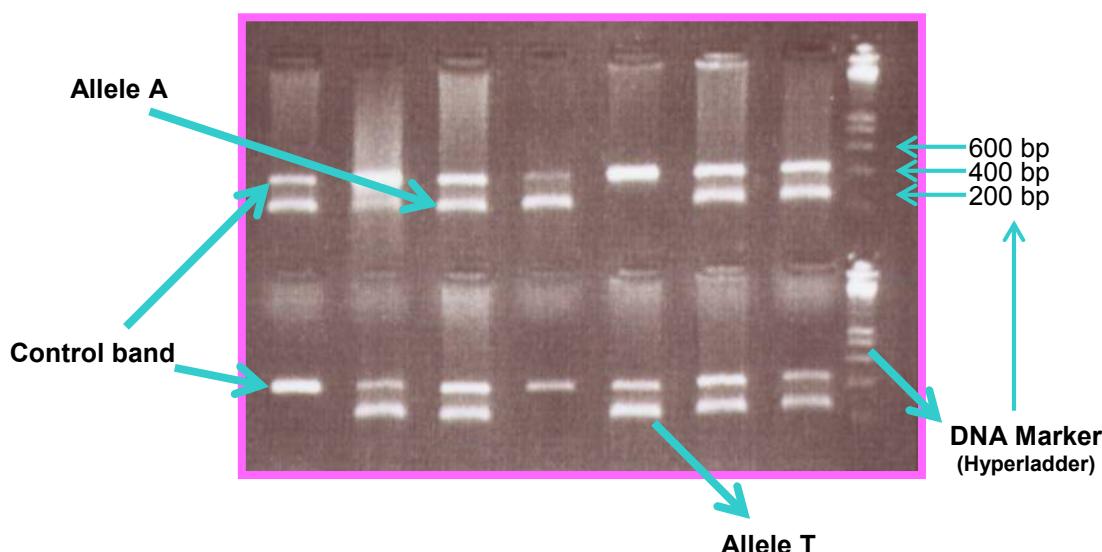
پس از تهیه و تأیید طرح تحقیقاتی حاضر توسط کمیته اخلاق پزشکی بیمارستان رویال منچستر (Royal Infirmary) و سپس اخذ رضایت از همه افراد شرکت کننده در این مطالعه، طرح وارد مرحله اجرایی گردید.

¹ Trait

² First degree relatives

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلیمورفیسم ژن $\text{IFN-}\gamma +874^*\text{T/A}$ و پرایمر کنترل

نام پرایمر	توالی	اندازه قطعه	PCR
Generic primer Primer T (sense) Primer A (sense)	5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'	۲۶۲ bp	
	5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3'		
	5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'		
Sense: Antisense:	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3' 5'-TCACGGATTCTGTGTTTC-3'	۴۲۹ bp	
Internal control primers (HG)			

شکل ۱- تصویر محصول ARMS-PCR مربوط به پلیمورفیسم $\text{IFN-}\gamma +874^*\text{T/A}$ بر روی ژل آگاروز (ژنوتیپ افراد مختلف نیز مشخص شده است)جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپ/الل پلیمورفیسم $\text{IFN-}\gamma +874^*\text{T/A}$ در گروه کنترل (C) و بیماران دیابت نوع ۱ (P)

ژنوتیپ	IFN- $\gamma +874^*\text{T/A}$	گروه شاهد	گروه بیمار
TT		۲۶(۲۲)	۵۴(۲۱/۸) †
TA		۶۲(۵۲)	۱۲۸(۵۱/۶)
AA		۳۱(۲۶)	۶۶(۲۶/۶)
آلل			
T		۱۱۴(۴۸)	۲۳۶(۴۷/۶)
A		۱۲۴(۵۲)	۲۶۰(۵۲/۴)

* مقادیر P در هیچ یک از مقایسه‌ها معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$).
† اعداد خارج پرانتز نشانگر تعداد و داخل پرانتز درصد فراوانی است.
تعداد گروه شاهد: ۱۱۹ فرد سالم
تعداد گروه بیمار: ۲۴۸ بیمار دیابتی

پلیمورفیسم در تظاهرات بالینی بیماری و احیاناً تفاوت در تابلوی بالینی^۴ را منتفی نمی‌داند. در چنین حالتی این پلیمورفیسم بیش از آنکه با خود بیماری مرتبط باشد، می‌تواند با الگو یا الگوهای خاصی از بروز بیماری به عنوان مثال تفاوت بیماران از نظر سن آنها در مقطع آغاز بیماری^۵ و یا وجود آنتی‌بادی‌های همراه با بیماری ارتباط نشان دهد.

از آنجا که تاثیر نهایی IFN- γ در ارتباط با بیماری دیابت و نیز سایر اختلالات خودایمنی متفاوت و گاه متصاد می‌باشد - که این اثر خود به عوامل متعددی همچون میزان و سطح کمی این سایتوكین التهابی، مکان و زمان حضور یا اثر آن و توالی مواجهه آن با بافت^۶ سلول پاسخ دهنده وابسته است [۲]، شاید نقش این پلیمورفیسم را تا آن حد که به عنوان یک عامل خطر مستقل^۷ نقش آفرین باشد، نتوان در نظر گرفت.

در خصوص مطالعاتی که وجود همراهی بین پلیمورفیسم این ژن در موقعیت مشابه و دیابت نوع ۱ را گزارش نموده‌اند [۱۳، ۱۴]، چند نکته قابل توجه است. در مطالعه بیماری‌های کمپلکس که دیابت نوع ۱ نیز یکی از آنهاست، در بسیاری از موارد گزارش‌های اولیه ای که وجود یک همراهی را نشان داده اند، عملاً با گزارش عدم همراهی در مطالعات بعدی نقض می‌گردند. به عنوان مثال علاوه بر مطالعه حاضر، دو مطالعه مستقل دیگر نیز وجود این همراهی را نفی نموده‌اند [۱۶، ۱۷]. این تناقض در نتایج علاوه بر آنکه می‌تواند به ملاحظات متدولوژیک و عوامل مخدوش کننده^۸، از جمله انتخاب نمونه‌ها از افرادی غیر از نژاد اصلی جمعیت مورد نظر^۹ قابل انتساب باشد، می‌تواند ناشی از زیرساخت سیال و هتروژن بیماری‌های کمپلکس از نظر ژنتیکی نیز باشد. تکرار ناپذیری^{۱۰} یافته های مربوط به این مطالعات یکی از مشکلات و موانع تحقیقات در این زمینه است. یکی از علل این تکرار ناپذیری و تفاوت در نتایج بدست آمده آن است که پلیمورفیسم (های) اصلی و مؤثر در ایجاد دیابت نوع ۱ در

یافته‌ها

میزان فراوانی دو آلل مربوط به پلیمورفیسم مورد مطالعه در جمعیت شاهد بسیار نزدیک به هم بود که ضمن افزایش قدرت مطالعه، نیاز به حجم نمونه کمتری را در دو گروه شاهد و بیمار به همراه داشت. توزیع فراوانی ال/ژنوتیپ حاصله از پلیمورفیسم ژن IFN- γ تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری در بین دو جمعیت مورد مقایسه (بیمار: ۲۴۸ نفر، سالم: ۱۱۹ نفر) نداشت ($P \geq 0.05$) (جدول ۲).

بحث

با توجه به گزارش‌های قبلی که همراهی پلیمورفیسم مورد نظر با بیماری دیابت نوع ۱ را گزارش نموده‌اند [۱۳، ۱۴]، یافته‌های ما به چنین نتیجه‌های نرسیده است که خود احتمالاً نشان می‌دهد پلیمورفیسم (های) ژنی اصلی و مؤثر در ایجاد دیابت نوع ۱ در گزارش‌های قبلی پلیمورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن IFN- γ یا در ساختمان ژن‌های مجاور) که با پلیمورفیسم مورد مطالعه در پیوستگی ترجیحی^۱ (LD) هستند، باشد.

در مطالعه حاضر همراهی مشخصی بین پلیمورفیسم ژن IFN- γ و بیماری دیابت نوع یک مشاهده نگردید. کارکرده بودن پلیمورفیسم انتخاب شده [۱۵]، برخورداری ال کمتر شایع^۲ این پلیمورفیسم از فراوانی قابل ملاحظه و تقریباً برابر با ال شایع و بالاخره استفاده از تعداد بالای نمونه در دو جمعیت شاهد و بیمار در مجموع سبب گردیده اند که این مطالعه از قدرت^۳ بالایی برخوردار باشد. این موقعیت به نوبه خود سبب می‌گردد که دقت و صحت تفسیر نتایج بدست آمده تا حد قابل قبولی افزایش و متقابلاً زمینه مخدوش بودن یافته‌ها مثلاً در قالب مواردی همچون منفی کاذب کاهش یابد. به هر حال، مشاهده حاضر اگر چه نشان دهنده عدم همراهی بین پلیمورفیسم IFN- γ +874*T/A و وقوع یا بروز دیابت نوع یک در نزد یک جمعیت بریتانیایی است، ولی امکان اثرگذاری این

^۴ Clinical Heterogeneity

^۵ Age at the onset

^۶ Independent Risk Factor

^۷ Confounder Issues

^۸ Population Admixture

^۹ Irreproducibility

^۱ Linkage Disequilibrium

^۲ Less Frequent allele

^۳ Power

یافته های ما نشان می دهد که بین پلی مورفیسم ژن-IFN- γ در موقعیت A^{+874*T/A} و بیماری دیابت نوع یک رابطه معناداری از نظر آماری وجود ندارد. با وجود آنکه مطالعات مشابه وجود همراهی بین پلی مورفیسم های این ژن چه در موقعیت مشابه و یا موقعیت های دیگر را با بیماری مذکور نشان داده اند، ولی نظر به عدم وجود یک رابطه مشخص و قابل پیش بینی بین ژنتیپ و فنوتایپ در بیماری های کمپلکس این تفاوت قابل توجیه می باشد. البته این شکنندگی و عدم ثبات در رابطه ژنتیپ-فنوتایپ در بیماری های کمپلکس از اهمیت و ضرورت انجام چنین مطالعاتی با توجه به بار این بیماری ها و هزینه های مالی و انسانی آنها نمی کاهد.

سپاسگزاری

حمایت مالی این مطالعه توسط دانشگاه منچستر انگلستان و انجمن ایمونولوژی بریتانیا (BSI) صورت گرفته است.

گزارش های قبلی خود آن پلی مورفیسم های مورد بررسی نبوده اند و در اصل پلی مورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن IFN- γ یا در ساختمان ژنهای مجاور) علت این همراهی بوده اند که با پلی مورفیسم مورد مطالعه در پیوستگی ترجیحی (LD) هستند. لذا اگر در یک جمعیت یا نژادی بواسطه تغییرات ساختمانی ژنتیکی این الگوی LD بین نشانگر (پلی مورفیسم) مورد بررسی و آن پلی مورفیسم مؤثر برقرار نباشد، نمی توان انتظار داشت که آن همراهی گزارش شده قبلی مجددا تکرار گردد. در یک نگاه کلان و در رابطه با مطالعات مشابهی که به بررسی نقش یک پلی مورفیسم مشخص در یک بیماری مشخص می پردازنند، این نکته را هم نباید از نظر دور داشت که اکثر این دسته از مطالعات منجر به یافته های منفی (عدم همراهی) می گردند ولی به علت آنکه شناسی برابری را جهت انتشار در مجلات علمی ندارند، عملا در مقالات معکس نمی شوند (Under-representation of Negative Results).

ماخذ

- Naji A, Silvers WK, Barker CF. Cell-mediated immunity in type I (insulin-dependent) diabetes of man and the BB rat. *Concepts Immunopathol* 1985;2:32-46.
- Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998;14:129-51.
- Trucco M, Dorman JS. Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus in humans. *Crit Rev Immunol* 1989;9:201-45.
- del Guercio P. Susceptibility to diabetes and the major histocompatibility complex: the 57th residue affair. *Diabet Med* 1992;9:330-4.
- Von Herrath MG, Oldstone MBA. Interferone- γ is essential for destruction of β cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997;185:531.
- Wang B, Andre I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoit C, Mathis D. Interferon- γ impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:13844-13849.
- Huang X, Yuan J, Goddard A, Foulis A, James RFL, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA. Interferon expression in the pancreas of patient with type I diabetes. *Diabetes* 1995;44:658-664.
- Babaya N, Nakayama M, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2005;1051:194-204.
- Kolb H. Benign versus destructive insulitis. *Diabetes Metab Rev* 1997; 13:139-46.
- Savinov AY, Wong FS, Chervonsky AV. IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells. *J Immunol* 2001;167:6637-43.
- de Maeyer E, de Maeyer-Guignard J: Interferon-Gamma. In: *Cytokines*. 1st ed. Mire-Sluis A, Thorpe R, Eds. Academic Press, 1998, p. 391-400.
- Jahromi MM, Eisenbarth GS. Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Ann NY Acad Sci* 2006;1079:289-99.
- Awata T, Matsumoto C, Urakami T, Hagura R, Amemiya S, Kanazawa Y. Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. *Diabetologia* 1994;37:1159-62.
- Jahromi M, Millward A, Demaine A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:187-90.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high

- IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-6.
16. Pociot F, Veijola R, Johannessen J, Hansen PM, Lorenzen T, Karlsen AE, Reijonen H, Knip M, Nerup J. Analysis of an interferon-gamma gene (IFNG) polymorphism in Danish and Finnish insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients and control subjects. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:87-93.
17. Tegoshi H, Hasegawa G, Obayashi H, Nakano K, Kitagawa Y, Fukui M, Matsuo S, Deguchi M, Ohta M, Nishimura M, Nakamura N, Yoshikawa T. Polymorphisms of interferon-gamma gene CA-repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type I diabetes. *Hum Immunol* 2002;63:121-8.