

پیوستگی و ارتباط کمپلکس ژنهای HLA با بیماری دیابت قندی نوع ۱ در ۸۱ خانواده: پیوستگی شدید ژن DRB1^{Lys71+} با دیابت نوع ۱

مهدی زمانی* : استادیار، بخش ژنتیک پزشکی مرکز طبی کودکان، گروه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
جان نیروپ: پروفسور، مرکز مطالعات دیابت، دانمارک
ژانژاک کاسیمان: پروفسور، مرکز ژنتیک انسانی، دانشگاه لوون بلژیک

چکیده

مقدمه: مطالعات و تحقیقات زیادی نشان داده است که دیابت نوع ۱ با چندشکلی ژنهای ناحیه HLA روی کروموزوم ۶ (6P21) ارتباط دارد. اخیراً نتایج تحقیقات شاهددار در جمعیت بلژیک در سطح DNA نشان داد که بین دیابت نوع ۱ و بعضی ژنهای HLA کلاس II به ویژه DRB1^{Lys71+} ارتباط معنی داری از نظر آماری وجود دارد. **روشها:** هشتاد و یک خانواده دانمارکی (با حداقل دو فرد مبتلا در هر خانواده) و ۸۲ فرد سالم به عنوان شاهد برای چندشکلی ژنهای HLA-DRB و ۵۴ خانواده از ۸۱ خانواده برای چندشکلی ژنهای HLA-B,DQA1,DQB1-HLA-B و ژنهای TNFA و TNFB مطالعه شدند. پیوستگی بین دیابت نوع ۱ با ال‌های ژن DRB1 که Lys71+ را رمزدهی میکند با آنالیز خواهر برادرهای مبتلای هر خانواده (affected sib pair analysis) مطالعه شد. **یافته‌ها:** در جمعیت مورد بررسی، ژن هوموزیگوت DRB1^{Lys71+} دارای خطر نسبی (RR) ۱۰۳/۵ و پیوستگی بین دیابت نوع ۱ با ال‌های ژن DRB1^{Lys71+} فوق‌العاده قوی ($p < 1 \times 10^{-6}$) بود. مطالعه مبتنی بر خانواده (family based association study) ارتباط ژن با بیماری نشان داد که DRB1^{Lys71+} مهمترین ژن در ناحیه HLA می‌باشد که فرد را برای ابتلا به بیماری دیابت نوع ۱ مستعد می‌سازد ($\text{haplotype relative risk} = 8/38$). آنالیز هاپلوتیپ این یافته را تایید کرد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌آید که DRB1^{Lys71+} ژن اصلی مستعدکننده برای دیابت نوع ۱ باشد.

کلیدواژه‌ها: پیوستگی ژنی، دیابت نوع ۱، چندشکلی HLA، مطالعات خانواده‌ها، خطر نسبی هاپلوتیپ

مقدمه

در ایجاد آن دخیل هستند. گروهی از ژنها گزارش شده است که در بروز دیابت نوع ۱ نقش دارند. از بین آنها ژنهای HLA کلاس II واقع در روی کروموزوم ۶ (6p21) از همه مهمتر هستند و به عنوان لوکوس‌های عمده برای مستعد کردن فرد به دیابت نوع ۱ مطرح شده‌اند (۱-۱۰).

بیماری دیابت قندی نوع ۱ (وابسته به انسولین) در اثر تخریب سلولهای بتای پانکراس توسط دستگاه ایمنی خود فرد ایجاد می‌شود و باعث می‌گردد که بیمار برای زنده ماندن انسولین تزریق کند. عوامل ایجادکننده دیابت نوع ۱ پیچیده‌اند و هر دو عامل ژنتیک و محیط

* نشانی: تهران انتهای بلوار کشاورز، خیابان دکتر قریب، مرکز طبی کودکان، بخش ژنتیک پزشکی

بالاترین خطر هاپلوتیپی را ($HRR=۸/۳۸$) برای دیابت نوع ۱ از میان الل‌های مطالعه‌شده ژنهای مختلف در ناحیه *HLA* ایجاد کردند.

روشها

بیماران

هشتاد و دو خانواده (۳۸۸ نفر) مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر خانواده حداقل دو نفر مبتلا وجود داشت و همه خانواده‌ها دانمارکی بودند و نسبتی با همدیگر نداشتند. بیماران مورد مطالعه برپایه معیارهای سازمان جهانی سلامت (WHO) برای دیابت نوع ۱ تشخیص داده شده‌اند.

برای مطالعه ارتباط و پیوستگی بیماری با ژنهای *DRB* به ترتیب ۸۲ بیمار (یک بیمار از هر خانواده) و ۸۲ خانواده (همه مبتلایان و غیرمبتلایان هر خانواده) مطالعه شدند. در کل ۳۸۲ فرد که ۱۷۳ نفر آنها مبتلا به دیابت نوع ۱ و بقیه سالم بودند برای ژنهای *DRB* مورد مطالعه قرار گرفتند. برای سایر ژنها ۵۴ خانواده مطالعه شد. همچنین ۸۲ نفر از جمعیت دانمارکی به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شدند که افرادی سالم و بدون سابقه بیماری در خانواده بودند.

تعیین ژنوتیپ

ژنوتیپ ۸۱ خانواده و ۸۲ شاهد برای ژنهای *HLA-DRB1*, *-DRB3*, *-DRB4*, *-DRB5* با روش *PCR-SSOs* مشخص شد. به‌طور خلاصه در این روش ابتدا آگزون دوم ژنهای *DRB* که به‌شدت چندشکلی است و همه الل‌ها از روی آن قابل‌شناسایی می‌باشند، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد و محصولات *PCR* در طول عمل تکثیر با بیوتین فلورسانت نشاندار شدند. محصولات *PCR* در دمای مشخصی با نوکلئوتیدهای اختصاصی برای توالی‌های

مطالعات نشان داده است که لوکوس‌های *DQ* و *DR* در مستعد کردن و محافظت فرد در مقابل دیابت نوع ۱ سهم دارند به‌ویژه الل‌های *DRB1*0401*، *DQB1*0302*، *DQAI^{Arg52+}* و *DQB1^{Asp57-}* به‌عنوان ژنهای مستعدکننده و الل‌های *DRB1*1500*، *DRB1*0701*، *DQAI^{Arg52-}* و *DQB1^{Asp57+}* به‌عنوان ژنهای مقاوم به بیماری شناخته شده‌اند (۱۱-۱۸، ۲۲، ۲۳). در مطالعه قبلی، ما ژن *DRB1^{Lys71+}* را به‌عنوان اصلی‌ترین ژن مستعدکننده دیابت نوع ۱ در جمعیت بلژیک پیدا نمودیم (۱۹) در حالی که *DQB1^{Asp57}* فقط یک اثر افزایشی خطر بر روی *DRB1^{Lys71+}* داشت و خطری که ژنوتیپ *DQAI^{Arg52++}* برای دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند قابل‌توجه با حضور ژن *DRB1^{Lys71+}* در این بیماران می‌باشد زیرا از میان ۲۰۰ بیمار دیابت نوع ۱ مطالعه شده بلژیکی، آن بیمارانی که دارای ژنوتیپ *DQAI^{Arg52++}* بودند، لیزین را در موقعیت ۷۱ مولکول زنجیره *DRB1* حمل می‌کردند یا به عبارت دیگر دارای الل *DRB1^{Lys71+}* بودند. براساس ساختمان سه‌بعدی مولکول هترودایمر *HLA-DR1αβ*، اسید آمینه لیزین در موقعیت ۷۱ (محل پیوستن آنتی‌ژن به مولکول *HLA*) قرار گرفته است (۲۰) و بنابراین می‌تواند نقش مهمی در پیوستن آنتی‌ژن به *HLA* بازی کند. برای (۱) تأیید نتایج حاصل از مطالعه جمعیت بلژیک در یک جمعیت دیگر، (۲) تعیین اینکه کدام لوکوس در ناحیه *HLA* در مطالعه خانوادگی پیوستگی قوی با دیابت نوع ۱ دارد و (۳) در لوکوس‌های پیوسته کدام الل بالاترین خطر را ایجاد می‌کند، ۸۱ خانواده دیابت نوع ۱ و ۸۲ شاهد سالم برای ژنهای *HLA* کلاس *II* *DQB1*، *DQAI* و *DRB1* و کلاس *I* *HLA-B* و کلاس *III* *HLA-TNFA* و *TNFB* در سطح *DNA* مطالعه شدند. نتایج حاصل پیوستگی شدید دیابت نوع ۱ با لوکوس *DRB1* را نشان داد به‌گونه‌ای که الل‌های رمزدهنده *Lys71+*

آنالیز جفت فرزندان مبتلا

آنالیز پیوستگی در جفت فرزندان مبتلا با برنامه رایانه‌ای ESPA انجام گرفت (۲۹-۳۰). در این روش پیوستگی بین بیماری و ژن در جفت فرزندان مبتلا که در صفر، یک یا دو الل شریک هستند، به ترتیب با فراوانی‌های مورد انتظار ۲۵، ۵۰، ۲۵ درصد مقایسه می‌شوند و این مقادیر مقایسه‌شده باید در حالت معمولی تقریباً مطابقت کنند. اگر از لحاظ آماری این مقدار به‌طور معنی‌دار به نفع الل‌های مشترک بالا رود، بدین معنی است که پیوستگی بین ژن و بیماری وجود دارد.

آنالیز خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR)^۱

برای تعیین میزان این خطر، ژنوتیپ فرزندان و والدین هر خانواده برای ژن مورد نظر مشخص می‌گردد و الل‌های بیماری، الل‌هایی هستند که از والدین به فرزندان مبتلا منتقل شده‌اند و الل‌های شاهد الل‌هایی هستند که به فرزندان بیمار منتقل نشده‌اند (۳۱، ۳۲، ۳۳). اندازه‌گیری HRR با سنجش خطر نسبی (RR) متفاوت است. اساس HRR مبتنی بر تعداد الل‌های منتقل‌شده و منتقل‌نشده به فرزند (اولین فرزند مبتلا) است، در حالی که RR مبتنی بر تعداد الل‌های بیمار و شاهد می‌باشد. در آنالیز هاپلوتیپ‌ها به جای الل‌ها، هاپلوتیپ‌های منتقل‌شده و منتقل‌نشده به فرزندان مبتلا بررسی می‌شود.

تأیید پیوستگی DRB1

در مطالعات حاضر در جمعیت دانمارکی تقریباً همان الل‌های مستعدکننده و محافظ به‌دست آمد که ما در مطالعه قبلی در جمعیت بلژیکی پیدا کرده بودیم، بجز الل DRB3*0101 که فقط در جمعیت دانمارک با بیماری دیابت نوع ۱ ارتباط داشت (جدول ۲). خطر

(sequences) چندشکلی (SSOs) هیبرید شدند و هیبریدهای مثبت با روش غیررادیواکتیو کالورومتريک مشخص و شناسایی شد. با تفسیر هیبریدهای مثبت و منفی، ژنوتیپ هر فرد برای ژن مربوط مشخص گردید. ژنوتیپ ۵۲ خانواده از ۸۱ خانواده برای ژنهای TNFA, TNFB, DQA1, DQB1, HLA-B تعیین شد. برای تعیین ژنوتیپ TNFA از چندشکلی‌های میکروساتلیت استفاده شد و روش کار طبق آنچه که Jongeneel توضیح داده است (۲۱) و به‌صورت غیررادیواکتیو مشخص گردید. ژن TNFB با برش آنزیمی NCOI در اولین انترون ژن با روش PCR-RFLP آنالیز گردید (۶). HLA-B به روش فلورسانت آن طوری که پوسیت و همکارانشان (۶) توضیح داده‌اند مشخص گردید. در نهایت ژنهای HLA-DQA1, DQB1 مانند ژنهای HLA-DRB و HLA-DRB تعیین ژنوتیپ شدند.

آنالیز اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه که از نظر ساختمان سه‌بعدی براون (۲۰) در ناحیه پیوستن آنتی ژن قرار دارند از روی توالی نوکلئوتیدهای هر الل مربوطه (۲۴) تعیین گردیدند.

تحلیل آماری

تعیین خطر نسبی

خطر نسبی (RR) با روش Wolf حساب شد (۲۵) و میزان معنی‌دار بودن فراوانی هر الل یا ژنوتیپ با روش فیشر معین شد (۲۶) و ارزش p برای آزمونهای چندگانه اصلاح گردید (ارزش p حاصل به تعداد الل‌های هر ژن ضرب می‌شود) (۲۷-۲۸) (جدول ۱).

¹ Haplotype relative risk

نسبی (RR) برای DRB1*0101 در جمعیت دانمارکی داشت ولی این خطر نسبی برای DRB1*0301 (RR=۱۲/۸) نسبت به بلژیکی‌ها (RR=۵) افزایش

جدول ۱- توزیع آلل‌های DRB در بیماران دیابت نوع ۱ دانمارکی و شاهد‌های سالم

خطر نسبی † (حدود اطمینان ۹۵٪)	P*	شاهد‌ها (تعداد=۱۶۴)		دیابت نوع ۱ (تعداد=۱۶۴)		اللها
		فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	
						DRB1
	ns	۰/۰۹۸	۱۶	۰/۰۴۹	۸	۰/۱۰۱
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۰۰	۰	۰/۱۰۳
۴/۸۸(۲/۶-۸/۷)	۱/۴×۱۰ ^{-۶}	۰/۰۹۲	۱۵	۰/۳۳۰	۵۴	۰/۳۰۱
		۰/۰۹۲	۱۵	۰/۰۲۵	۴	۰/۴۰۰
۱۲/۸۳(۶/۱-۲۴/۸)	< ۱۰ ^{-۸}	۰/۰۵۵	۹	۰/۴۲۷	۷۰	۰/۴۰۱
۰/۱(۰/۰۴-۰/۳۳)	۶×۱۰ ^{-۵}	۰/۱۵۹	۲۶	۰/۰۱۸	۳	۰/۷۰۱
		۰/۰۱۲	۲	۰/۰۱۸	۳	۰/۸۰۱
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۰۰	۰	۰/۸۰۲
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۰۰	۰	۰/۸۰۴
		۰/۰۰	۰	۰/۰۰۶	۱	۰/۹۰۱
	ns	۰/۰۷۳	۱۲	۰/۰۱۲	۲	۱/۱۰۱
		۰/۰۱۲	۲	۰/۰۰۶	۱	۱/۱۰۳
		۰/۰۲۴	۴	۰/۰۱۲	۲	۱/۲۰۱
۰/۰۸(۰/۰۲-۰/۵)	۰/۰۲	۰/۰۷۳	۱۲	۰/۰۰۶	۱	۱/۳۰۱
		۰/۰۸۵	۱۴	۰/۰۷۳	۱۲	۱/۳۰۲
		۰/۰۱۲	۲	۰/۰۰۰	۰	۱/۳۰۳
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۰۰	۰	۱/۴۰۱
۰/۰۳(۰/۰۱-۰/۱۷)	< ۱۰ ^{-۸}	۰/۱۸۳	۳۰	۰/۰۰۶	۱	۱/۵۰۰
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۱۲	۲	۱/۶۰۰
						DRB3
۲/۲۷(۱/۳-۲/۹)	۰/۰۱۰	۰/۱۴۰	۲۳	۰/۲۶۸	۴۴	۰/۱۰۱
	ns	۰/۱۵۹	۲۶	۰/۰۹۸	۱۶	۰/۲۰۱
		۰/۰۹۱	۱۵	۰/۰۸۵	۱۴	۰/۳۰۱
		۰/۶۱۰	۱۰۰	۰/۵۴۹	۹۰	-
						DRB4
۲/۱۳(۱/۳۵-۳/۳)	۰/۰۰۱۴	۰/۲۹۹	۴۹	۰/۴۷۶	۷۸	۰/۱۰۱
۰/۴۷(۰/۳۰-۰/۷۴)	۰/۰۰۱۷	۰/۷۰۱	۱۱۵	۰/۵۲۴	۸۶	-
						DRB5
۰/۰۳(۰/۰۱-۰/۱۹)	۸×۱۰ ^{-۸}	۰/۱۷۱	۲۸	۰/۰۰۶	۱	۰/۱۰۱
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۰۰	۰	۰/۱۰۲
		۰/۰۰۶	۱	۰/۰۱۲	۲	۰/۲۰۱
۱۲(۳/۶-۳۰/۴)	۸×۱۰ ^{-۸}	۰/۸۱۷	۱۳۴	۰/۹۸۲	۱۶۱	-

این الل‌ها در هیچیک از دو گروه دیابتی‌های غیروابسته به انسولین یا شاهد دیده نشد: ۰۱۰۲، ۰۳۰۲، ۰۴۰۶، ۰۴۰۹، ۰۴۱۰، ۰۴۱۱، ۰۴۱۲، ۰۸۰۳، ۰۸۰۵، ۰۸۰۱، ۰۱۰۴، ۰۱۱۰۵، ۰۱۱۰۶، ۰۱۲۰۲، ۰۱۳۰۵، ۰۱۴۰۲، ۰۱۴۰۳، ۰۱۴۰۴، ۰۱۴۰۵، ۰۱۴۰۶، ۰۱۴۰۷، ۰۱۴۰۸، ۰۴۰۰ شامل تمام الل‌های DRB1* ۰۴ DRB1* بجز ۰۴۰۱ DRB1* می‌شود.

گروه‌های ۱۱۰۱* DRB1 و ۱۳۰۱* DRB1 به ترتیب شامل الل‌های ۱۱۰۲، ۱۱۰۱* DRB1 و ۱۳۰۱، ۱۳۰۵* DRB1 می‌باشند.

* p value بر اساس آزمون دقیق فیشر

Relative risk†

ns: non significant

جدول ۲- نقش DRB1^{Lys71+} در افزایش خطر نسبی در بیماران دیابت نوع ۱ دانمارکی

خطر نسبی † (حدود اطمینان ۹۵٪)	p*	شاهدها (تعداد=۱۶۴)		دیابت نوع ۱ (تعداد=۱۶۴)		اللها
		تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی	
۱۷/۳(۹/۸-۲۹)	<۱۰ ^{-۸}	۲۶	۰/۱۵۹	۱۲۴	۰/۷۵۶	DRB1 ^{Lys71+}
۰/۰۶(۰/۰۴-۰/۱۱)	<۱۰ ^{-۸}	۱۳۸	۰/۸۴۱	۴۰	۰/۲۴۴	DRB1 ^{Lys71-}
		(تعداد = ۸۲)		(تعداد = ۸۲)		ژنوتیپ‌ها
		تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی	
۱۰۳/۵(۱۶-۳۰۰)	<۱۰ ^{-۸}	۱	۰/۰۱۲	۴۶	۰/۵۶۱	DRB1 ^{Lys71+/+}
۰/۰۲(۰/۰۱-۰/۰۷)	<۱۰ ^{-۸}	۵۷	۰/۶۹۵	۴	۰/۰۴۹	DRB1 ^{Lys71-/-}
-	ns	۲۴	۰/۲۹۳	۳۲	۰/۳۹۰	DRB1 ^{Lys71+/-}

* p value بر اساس آزمون دقیق فیشر با تصحیح برای مقایسه‌های چندتایی

Relative risk †

مورد از ترکیب والدین و جفت فرزندان مبتلا گویا بود و ۳۳ مورد بخاطر هوموزیگوت بودن والدین گویا نبود. در ۷۰/۶٪ از موارد گویا، وجود الل مشترک مشاهده شد که به‌طور واضح از درصد مورد انتظار (یعنی ۵۰٪) منحرف شده بود و این تغییر از لحاظ آماری خیلی معنی‌دار بود ($p < 1 \times 10^{-6}$). خلاصه نتایج حاصل از مطالعه ژنهای HLA-B, TNFB, TNFA, DQB1, DQA1 در جدول ۳ آورده شده است و نتایج پیوستگی ژنهای HLA را با دیابت نوع ۱ نشان می‌دهد.

الل‌هایی که برای دیابت نوع ۱ پرخطر به‌شمار

می‌آیند

خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) برای الل‌های ژنهای HLA-B, TNFA, TNFB, DQB1, DQA1 DRB1 محاسبه شد که به‌طور معنی‌دار با دیابت نوع ۱ ارتباط داشتند (جدول‌های ۴، ۵، ۶). برخلاف پیوستگی ژنی

در هر دو جمعیت تقریباً یکسان بود. توان حفاظتی الل DRB1*0701 نیز در جمعیت دانمارکی بالاتر بود. وقتی که وجود یا نبود الل‌های خاصی را بررسی نمودیم، دریافتیم که ژن DRB1^{Lys71+} بالاترین خطر را برای بیماری دیابت نوع ۱ پدید می‌آورد ($p < 10^{-8}$ ، RR=۱۷/۳). این خطر در جمعیت دانمارکی حتی بیشتر از جمعیت بلژیکی بود. میزان خطر برای پیدایش دیابت نوع ۱ در افراد هوموزیگوت DRB1^{Lys71++} خیلی بیشتر از افراد هتروزیگوت بود (RR=۱۰۳/۵). به‌طور کلی ۵۶/۱٪ بیماران دیابت نوع ۱ دارای ژنوتیپ DRB1^{Lys71++} بودند درحالی‌که ۱/۲٪ افراد گروه شاهد، این ژنوتیپ را داشتند.

بررسی جفت فرزندان مبتلا

نتایج بررسی با روش ESPA در ۸۱ خانواده برای ژن DRB در جدول ۳ خلاصه شده است. در کل ۹۱ جفت فرزند مبتلا (۱۸۲مبتلا) مطالعه شدند که ۱۴۹

بین TNFA و دیابت نوع ۱، محاسبه HRR نشان داد که فقط ال ۲ ارتباط معنی‌دار ضعیفی با دیابت نوع ۱ دارد ($HRR=2/18$, $p=0/032$) و برای TNFB ال ۵/۵ با دیابت نوع ۱ ارتباط داشت ($HRR=1/91$, $p=0/027$).

جدول ۳- پردازش Sib-paris برای جایگاه‌های مختلف در خانواده‌های دیابت نوع ۱

مجموع p	نامشخص	مشترک (%)	غیرمشترک (%)	
				در ۸۱ خانواده IDDM
$<1 \times 10^{-6}$	۳۲/۲	۱۰۵/۸(۷۰/۶)	۴۴(۲۹/۴)	
				در ۵۴ خانواده IDDM
				DRB1
$<0/00011$	۲۳	۶۹(۶۸/۳)	۳۲(۳۱/۷)	
$<0/00011$	۳۱	۶۷(۷۲)	۲۶(۲۸)	TNFA
$<0/00039$	۷۳	۳۵(۶۸/۶)	۱۶(۳۱/۴)	TNFB
$<0/000032$	۱۸	۶۴(۷۱/۱)	۲۶(۲۸/۹)	HLA-B
$<0/000032$	۲۴	۷۰(۷۰)	۳۰(۳۰)	DQA1
$<0/00040$	۲۷	۶۵(۶۷)	۳۲(۳۳)	DQB1
$<0/000032$	۱۴	۷۶(۶۹/۱)	۳۴(۳۰/۹)	Haplo

جدول ۴- خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) برای ال‌های TNFA, TNFB, HLA-DQA1, HLA-DQB1 و $DRB1^*0401$ با ارتباط معنی‌دار در خانواده‌های دیابت نوع ۱ دانمارکی

خطر نسبی هاپلوتیپ (حدود اطمینان)	p	ال‌های منتقل نشده شاهدها		ال‌های منتقل شده دیابت نوع ۱		اللها
		تعداد کروموزومها فراوانی	تعداد کروموزومها فراوانی	تعداد کروموزومها فراوانی	تعداد کروموزومها فراوانی	
		(تعداد = ۱۰۶)		(تعداد = ۱۰۶)		TNFA
۲/۱۸(۱/۲۵-۳/۷۴)	۰/۰۳۲	۰/۳۲۱	۳۴	۰/۵۰۹	۵۴	۲
		(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)		TNFB
۰/۲۵(۰/۳-۰/۹)	۰/۰۲۷	۰/۶۴۸	۷۰	۰/۴۹۱	۵۳	۱۰/۵
۱/۹۱(۱/۱۱-۳/۲۶)	۰/۰۲۷	۰/۳۵۲	۳۸	۰/۵۰۹	۵۵	۵/۵
		(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)		DQA1
۰/۰۷(۰/۰۲-۰/۴۵)	۰/۰۰۴۶	۰/۱۲۰	۱۳	۰/۰۰۹	۱	۰/۲۰۱
۳/۱۰(۱/۶۵-۵/۶۵)	۰/۰۰۱۶	۰/۱۷۶	۱۹	۰/۳۹۸	۴۳	۰/۳۰۱
		(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)		DQB1
۳/۳۱(۱/۷۴-۶/۱)	۰/۰۰۰۹	۰/۱۶۷	۱۸	۰/۳۹۸	۴۳	۰/۳۰۲
		(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)		DRB1
۵/۴۸(۲/۷۶-۱۰/۳۳)	2×10^{-5}	۰/۱۳۹	۱۵	۰/۴۲۶	۴۶	۰/۴۰۱

مطالعات در خانواده‌ها نشان داد که ال‌های DRB1*0401 *1500 شدیدتر از ال‌های واقع در لوکوس‌های TNF، HLA-B و DQ به دیابت نوع ۱ پیوسته‌اند.

در ناحیه HLA ژن DRB1^{Lys71+} بیشترین خطر را برای دیابت نوع ۱ دارد. آنالیز چندشکلی اسیدهای آمینه در لوکوس‌های DQ (ژنهای DQA1 و DQB1) نشان داد که ال‌های DQB1^{Asp57-} و DQB1^{Asp57+}

لوکوس DQ ال‌های DQA1*0301 و DQB1*0302 به ترتیب با HRR برابر ۳/۱ و ۳/۳ به عنوان مستعدکننده دیابت نوع ۱ شناسایی شدند (جدول ۴) و این نتایج نشان داد لوکوس DQ بیشتر از TNF با دیابت نوع ۱ ارتباط و پیوستگی دارد. نهایتاً، ال‌های DRB1*0401 و DRB1*0301 بیشتر از لوکوس DQ با دیابت نوع ۱ پیوستگی نشان داد (جدول ۵). مقاومترین ال در برابر دیابت DRB1*1500 بود (HRR=۰/۰۵، p=۰/۰۰۰۲). این

جدول ۵- فراوانی آل‌های DRB1 منتقل شده (بیماران) و منتقل نشده (شاهدها) به کودکان مورد مطالعه و خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) در خانواده‌های IDDM دانمارکی

خطر نسبی هاپلوتیپ (حدود اطمینان)	p*	ال‌های منتقل نشده شاهدها (تعداد = ۱۵۰)		ال‌های منتقل شده دیابت نوع ۱ (تعداد = ۱۵۰)		DRB1
		تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی	
	ns	۰/۱۲۷	۱۹	۰/۰۵۳	۸	۰۱۰۱
	-	۰/۰۰۷	۱	۰/۰۰۰	۰	۰۱۰۳
۲/۶۵(۱/۵-۴/۶)	۰/۰۰۴۰	۰/۱۴۷	۲۲	۰/۳۱۳	۴۷	۰۳۰۱
		۰/۰۵۳	۸	۰/۰۲۷	۴	۰۴۰۰
۵/۱۳(۲/۸-۸/۹)	<۱۰-۸	۰/۱۲۷	۱۹	۰/۴۲۷	۶۴	۰۴۰۱
۰/۱۵(۰/۰۶-۰/۵۱)	۰/۰۰۴۵	۰/۱۲۰	۱۸	۰/۰۲۰	۳	۰۷۰۱
		۰/۰۲۰	۳	۰/۰۲۰	۳	۰۸۰۱
		۰/۰۰۷	۱	۰/۰۰۷	۱	۰۹۰۱
	ns	۰/۰۸۰	۱۲	۰/۰۱۳	۲	۱۱۰۱
		۰/۰۰۰	۰	۰/۰۰۷	۱	۱۱۰۳
		۰/۰۳۳	۵	۰/۰۱۳	۲	۱۲۰۱
	ns	۰/۰۴۰	۶	۰/۰۰۷	۱	۱۳۰۱
		۰/۰۸۰	۱۲	۰/۰۷۳	۱۱	۱۳۰۲
		۰/۰۰۷	۱	۰/۰۰۰	۰	۱۳۰۳
		۰/۰۲۷	۴	۰/۰۰۰	۰	۱۴۰۱
۰/۰۵(۰/۰۲-۰/۳۱)	۲×۱۰-۴	۰/۱۲۰	۱۸	۰/۰۰۷	۱	۱۵۰۰
		۰/۰۰۷	۱	۰/۰۱۳	۲	۱۶۰۰

این ال‌ها در خانواده‌های دیابت نوع ۱ مشاهده نشدند: ۰۱۰۲، ۰۳۰۲، ۰۴۰۶، ۰۴۰۹، ۰۴۱۰، ۰۴۱۱، ۰۴۱۲، ۰۸۰۳، ۰۸۰۵، ۰۸۰۱، ۰۱۰۴، ۰۱۰۵، ۰۱۱۰۶، ۰۱۲۰۲، ۰۱۳۰۴، ۰۱۳۰۵، ۰۱۴۰۲، ۰۱۴۰۳، ۰۱۴۰۴، ۰۱۴۰۵، ۰۱۴۰۶، ۰۱۴۰۷، ۰۱۴۰۸.

* p value براساس آزمون دقیق فیشر با تصحیح برای مقایسه چندتایی
ns: non significant

جدول ۶- اثر آمینواسیدهای HLA کلاس ۲ در افزایش و کاهش خطر نسبی هاپلوتیپ (HRR) برای دیابت نوع ۱ در خانواده‌های دانمارکی

خطر نسبی (حدود اطمینان)	P	الل‌های منتقل نشده شاهدها		الل‌های منتقل شده دیابت نوع		اللها
		تعداد کروموزومها	فراوانی	تعداد کروموزومها	فراوانی	
		(تعداد = ۱۰۸)		(تعداد = ۱۰۸)		
۶/۵۳(۳/۵-۱۱/۵)	<۱-۸	۳۴	۳/۴	۸۱	۰/۷۵۰	DRB1 ^{Lys71+}
۰/۱۵(۰/۰۹-۰/۲۸)	<۱-۸	۸۱	۰/۷۵۰	۳۴	۰/۳۱۴	DRB1 ^{Lys71-}
۲/۹۷(۱/۵-۵/۷)	۰/۰۰۱۹	۷۳	۰/۶۷۶	۹۳	۰/۸۶۱	DQB1 ^{Asp57-}
۰/۳۴(۰/۱۸-۰/۶۷)	۰/۰۰۱۹	۳۵	۰/۳۲۴	۱۵	۰/۱۲۹	DQB1 ^{Asp57+}
۴/۶۴(۲/۵-۸/۵)	۱×۱۰-۶	۵۶	۰/۵۱۹	۹۰	۰/۸۳۳	DQA1 ^{Arg52+}
۰/۲۲(۰/۱۲-۰/۴۱)	۱×۱۰-۶	۵۲	۰/۴۸۱	۱۸	۰/۶۱۷	DQA1 ^{Arg52-}
		(تعداد = ۱۵۰)		(تعداد = ۱۵۰)		
۸/۳۸(۴/۹-۱۳/۸)	<۱-۸	۳۹	۰/۲۶۰	۱۱۱	۰/۷۴۰	DRB1 ^{Lys71+}
۰/۱۲(۰/۰۷-۰/۲۰)	<۱-۸	۱۱۱	۰/۷۴۰	۳۹	۰/۲۶۰	DRB1 ^{Lys71-}

دیگر با وجود الل مستعدکننده DQB1^{Asp57-} در هاپلوتیپ DRB1^{Lys71-}-DQB1^{Asp57-}، این هاپلوتیپ نسبت به دیابت نوع ۱ مقاوم است. این مسأله نشان‌دهنده نقش محافظتی DRB1^{Lys71-} در برابر دیابت نوع ۱ می‌باشد. نقش محافظتی DRB1^{Lys71-} در هاپلوتیپ DRB1^{Lys71-}-DQB1^{Asp57+} افزایش یافت؛ این نشانه آن است که الل DQB1^{Asp57+} یک اثر مثبت بر روی توان محافظتی DRB1^{Lys71-} در مقابله با دیابت نوع ۱ دارد (HRR=۰/۱۳, p<۱×۱۰^{-۸}).

آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین هاپلوتیپ DRB1^{Lys71-}-DQB1^{Asp57-}-DQA1^{Arg52+} و DRB1^{Lys71-}-DQB1^{Asp57-}-DQA1^{Arg52+} وجود دارد (p=۰/۰۰۴) که این، نقش اصلی DRB1^{Lys71+} را در پیدایش دیابت نوع ۱ تأیید می‌کند.

بحث

برای تأیید نتایج مطالعات قبلی‌مان (۱۹) در یک جمعیت دیگر و اینکه کدام لوکوس در ناحیه HLA بیشتر از سایر لوکوس‌ها با دیابت نوع ۱ پیوسته است و نیز برای مشخص کردن الل‌ها یا ژنوتیپ‌هایی که بیشترین خطر را برای دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کنند،

به ترتیب با HRR برابر ۲/۹۷ و ۰/۳۴ باعث بالا رفتن خطر بیماری و مقاومت در برابر بیماری دیابت نوع ۱ می‌شوند. از طرف دیگر الل‌های DQA1^{Arg52+} و DQA1^{Arg52-} به ترتیب عامل مستعدکننده و مقاوم‌کننده در برابر بیماری شناخته شدند. با وجود این، الل‌هایی که DRB1^{Lys71+} را کد می‌کنند قویترین پیوستگی را (P < 1×10⁻⁸ RR=8.38) با دیابت نوع ۱ نشان دادند (جدول ۷).

بررسی هاپلوتیپ

آنالیز هاپلوتیپ‌های چندشکلی اسیدهای آمینه که توسط ژنهای DRB1, DQA1 و DQB1 در خانواده‌های دیابت نوع ۱ رمزدهی شده‌اند، نشان داد که با اینکه هاپلوتیپ DRB1^{Lys71-}-DQB1^{Asp57-}-DQA1^{Arg52+} با خود دو الل مستعدکننده دیابت نوع ۱ یعنی DRB1^{Lys71-} و DQB1^{Asp57-} را حمل می‌کند، هیچ پیوستگی معنی‌داری با دیابت نوع ۱ ندارد. این در حالی است که وقتی در این هاپلوتیپ الل DRB1^{Lys71-} با الل DRB1^{Lys71+} جایگزین شد، مستعدکننده‌ترین هاپلوتیپ برای دیابت نوع ۱ حاصل گردید (۷/۵۳ = RR < ۱×۱۰^{-۸}). این نشان دهنده نقش عمده DRB1^{Lys71+} در پیدایش دیابت نوع ۱ است. از طرف

ترتیب نقش ژن در پیدایش بیماری بهتر و شفاف‌تر مشخص می‌گردد. در مطالعه قبلی، ما ژن $RB1^{Lys71+}$ را به‌عنوان مهمترین عامل ژنتیکی که باعث دیابت نوع ۱ می‌شود در جمعیت بلژیک پیدا نمودیم (۱۹) و در مطالعه حاضر نیز ما همین پیوستگی شدید بین $DRB1^{Lys71+}$ و دیابت نوع ۱ را پیدا کردیم ($RR=17/3$). در جمعیت دانمارکی، خطری که ژن $DRB1^{Lys71+}$ برای پیدایش دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند حتی بیشتر از جمعیت بلژیکی بود و همچنین افرادی که دو نسخه از ال $DRB1^{Lys71+}$ را حمل می‌کردند میزان خطر آنها برای دیابت نوع ۱ خیلی بیشتر بود

چهار نوع مطالعه در جمعیت دانمارک انجام دادیم: (۱) مطالعه گروه بیمار و شاهد؛ (۲) آنالیز پیوستگی جفت فرزندان مبتلا؛ (۳) مطالعه ارتباط بیماری با ژن در خانواده‌ها؛ (۴) مطالعه هاپلوتیپ‌ها. یکی از مزایای بررسی ارتباط بیماری با ژن خاص در خانواده‌ها این است که هر دو گروه بیمار و شاهد از یک جمعیت همگن هستند. از آنجایی که دیابت نوع ۱ احتمالاً نتیجه تعامل عوامل ژنتیکی با عوامل محیطی می‌باشد، یکی دیگر از مزایای مطالعه ارتباط بیماری با ژن در خانواده‌ها این است که افراد مبتلای هر خانواده که ال‌های بیماری را حمل می‌کنند یا حمل نمی‌کنند، بیشتر در عوامل محیطی با هم مشترک هستند؛ بدین

جدول ۷- پیردازش هاپلوتیپ آمینواسیدهای HLA کلاس ۲ و نقش آنها در آمادگی برای محافظت در برابر دیابت نوع ۱ در خانواده‌های دانمارکی

خطر نسبی هاپلوتیپ (حدود اطمینان)	P	هاپلوتیپ منتقل نشده شاهدها		هاپلوتیپ منتقل شده دیابت نوع ۱		هاپلوتیپ‌ها
		تعداد هاپلوتیپ‌ها (تعداد = ۱۸۰)	فراوانی	تعداد هاپلوتیپ‌ها (تعداد = ۱۸۰)	فراوانی	
	ns	۱۳	۰/۰۷۲	۱۰	۰/۰۵۵	$DRB1-DQA-DQB1$ $Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57-}$
۰/۲۰(۰/۰۹-۰/۵)	۶/۷×۱۰-۴	۲۷	۰/۱۵	۶	۰/۰۳۳	$Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57+}$
۷/۵۷(۴/۷-۱۱/۹)	<۱۰-۸	۴۷	۰/۲۶۱	۱۳۱	۰/۷۲۸	$Lys^{71+}-Arg^{52+}-Asp^{57-}$
	ns	۹	۰/۰۵۰	۷	۰/۰۳۹	$Lys^{71+}-Arg^{52+}-Asp^{57+}$
		$Lys^{71+}-Arg^{52-}-Asp^{57-}$
		$Lys^{71+}-Arg^{52-}-Asp^{57+}$
۰/۳۰(۰/۱۸-۰/۵۲)	۳/۴×۱۰-۵	۵۹	۰/۳۲۸	۲۳	۰/۱۲۸	$Lys^{71-}-Arg^{52-}-Asp^{57-}$
۰/۱۱(۰/۰۴-۰/۳۵)	۵/۴×۱۰-۵	۲۵	۰/۱۳۹	۳	۰/۰۱۷	$Lys^{71-}-Arg^{52-}-Asp^{57+}$
۰/۳۵(۰/۲۲-۰/۵۷)	۶/۵×۱۰-۵	۷۲	۰/۰۴	۳۴	۰/۱۸۹	$Lys^{71-}-Asp^{57-}$
۰/۱۲(۰/۰۷-۰/۲۸)	<۱۰-۸	۵۲	۰/۲۸۹	۹	۰/۰۵	$Lys^{71-}-Asp^{57+}$
	Ns	۹	۰/۰۵	۷	۰/۰۳۹	$Lys^{71+}-Asp^{57+}$
۷/۵۷(۴/۷-۱۱/۹)	<۱۰-۸	۴۷	۰/۲۶۱	۱۳۱	۰/۷۲۸	$Lys^{71+}-Asp^{57-}$
		۱۳	۰/۰۷۲	۱۰	۰/۰۵۵	$Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57-}$
	۰/۰۰۴*	۴۷	۰/۲۶۱	۱۳۱	۰/۷۲۸	$Lys^{71+}-Arg^{52+}-Asp^{57-}$
		۷۲	۰/۰۴	۳۴	۰/۱۸۹	$Lys^{71-}-Asp^{57-}$
	<۱۰-۸*	۴۷	۰/۲۶۱	۱۳۱	۰/۷۲۸	$Lys^{71+}-Asp^{57-}$
		۱۳	۰/۰۷۲	۱۰	۰/۰۵۵	$Lys^{71-}-Arg^{52+}-Asp^{57-}$
	ns	۵۹	۰/۳۲۸	۲۳	۰/۱۲۸	$Lys^{71-}-Arg^{52-}-Asp^{57-}$

* تفاوت معنی‌دار بین دو هاپلوتیپ

دارد. از بین ۸۲ خانواده دانمارکی، فقط بیماران ۴ خانواده ژن $DRB1^{Lys71+}$ را با خود حمل نمی‌کردند ولی این بیماران دارای $DQB1^{Asp57-}$ بودند که نشان می‌دهد، این خطر نه به‌صورت کاملاً مستقل از $DRB1^{Lys71+}$ است و نه حالت افزاینده دارد. در این ۹ بیمار که دارای ژنوتیپ $DRB1^{Lys71-/-}$ بودند، غیر از $DQB1^{Asp57-}$ هیچ ارتباطی با ژنهای مطالعه‌شده $DQA1$ و $HLA-B$ و $TNFA$ و $TNFB$ پیدا نشد. ما برای اثبات این که ال $DRB1^{Lys71+}$ عمده‌ترین عامل خطر برای دیابت نوع ۱ در ناحیه HLA است، خطرهای هاپلوتیپی (HRRs) را برای همه ال‌هایی که از نظر آماری به‌طور معنی‌دار با دیابت نوع ۱ ارتباط داشتند، حساب کردیم (جدول ۴). از میان آنها HRR ال $DRB1*0401$ بیشتر از ال‌های ژنهای DQ و TNF بود و وقتی HRR در سطح اسیدهای آمینه محاسبه شد، $DRB1^{Lys71+}$ بیشترین خطر هاپلوتیپی را داشت (جدول ۴، ۵، ۶). در نهایت، نتایج مطالعه حاضر به‌طور قطع یافته‌های قبلی ما (۱۹) را تأیید نمود و علاوه بر آن نقش محافظتی ژن $DRB1^{Lys71-}$ را در برابر دیابت نوع ۱ آشکار ساخت و پیوستگی شدید بین لوکوس $DRB1$ که اسید آمینه لیزین را در موقعیت ۷۱ زنجیره β رمزدهی می‌کند با دیابت نوع ۱ مشخص نمود. نتیجه دیگر اینکه ال $DRB1^{Lys71+}$ در میان همه ال‌های ژنهای مطالعه شده در ناحیه HLA ، بیشترین خطر را برای دیابت نوع ۱ ایجاد می‌نماید.

و این خطر در جمعیت دانمارکی خیلی بیشتر ($RR=۱۰۳/۵$) از جمعیت بلژیکی بود ($RR=۱۵/۴۶$). بنابراین نتایج حاضر به‌طور آشکار و قطعی یافته‌های قبلی ما (۱۹) را که $DRB1^{Lys71+}$ ژن اصلی در پیدایش دیابت نوع ۱ است، تأیید می‌کند. ژنوتیپ هوموزیگوت $DRB1^{Lys71-/-}$ بالاترین مقاومت را برای حاملان آن در مقابل دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند در حالی که این مقاومت نه تنها در افراد هتروزیگوت $DRB1^{Lys71-/+}$ وجود نداشت، بلکه تعداد افراد هتروزیگوت در بیماران تقریباً بیشتر بود. از سوی دیگر، در مطالعه قبلی از ۲۱۰ بیمار مطالعه‌شده، ۱۱۰ بیمار هتروزیگوت به $DRB1^{Lys71-/+}$ بودند ولی تعداد آنها در گروه شاهد ۷۰ نفر از ۲۰۵ نفر بود ($p=۰/۰۰۰۳$ و $RR=۲/۱۲$). این نتایج یک مدل وراثتی intermediate را برای ژن $DRB1^{Lys71+}$ در بیماری دیابت نوع ۱ پیشنهاد می‌کند.

بر اساس مطالعات سایر محققان (۲، ۱۱-۱۸)، ال‌هایی که $DQB1^{Asp57-}$ و $Dqa1^{Arg52+}$ را رمزدهی می‌کنند، در پیدایش خطر برای دیابت نوع ۱ مشارکت دارند. در مطالعه قبلی، ما نشان دادیم که خطر ناشی از $Dqa1^{Arg52+}$ به دلیل خطر $DRB1^{Lys71+}$ برای دیابت نوع ۱ است زیرا این دو ژن روی کروموزوم ۶ پیوستگی شدیدی با هم دارند. در مطالعه قبلی همچنین نشان دادیم که وقتی ژن $DQB1^{Asp57-}$ همراه $DRB1^{Lys71+}$ به ارث می‌رسد یک اثر افزاینده خطر

مآخذ

1. Hitman GA, Metcalfe KA. The genetics of diabetes-an update. In: Marshall SM, Home PD, Alberti KGMM, Krall LP (editors). *The Diabetes Annual/7*. Elsevier Science Publishers; 1993. p 1-17.
2. Buyse I, Sandkuyl LA, Zamani Ghabanbasani M, Gu XX, Bouillon R, Bex M, et al. Association of particular HLA class II alleles, haplotypes, and genotypes with susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus in the Belgian population. *Diabetologia* 1994; 37: 808-17.

3. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371: 130-6.
4. Field LL, Tobias R, Magnus T. A locus on chromosome 15q26 (IDDM3) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature Genetics* 1994; 8: 189-94.
5. Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, et al. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 1994; 371: 161-3.
6. Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin dependent) diabetes evidence for polygenecity in man. *Autoimmunity* 1994; 19: 169-78.
7. Cudworth AG, Woodrow JC. Evidence for HLA-linked genes in "juvenile" diabetes mellitus. *BMJ* 1975; 3: 133-5.
8. Nerup J, Cathelineau C, Seignalet J, Thomsen M. HLA and endocrine diseases. In: Dausset J, Svejgaard A (editors). *HLA and Disease*. Munksgaard; 1977. p 149-67.
9. Walker A, Cudworth AG. Type I (insulin dependent) diabetic multiplex families: mode of genetic transmission. *Diabetes* 1980; 29: 1036-9.
10. Platz P, Jakobsen BK, Morling N, Ryder LP, Svejgaard A, Thomson M, et al. HLA-D and -DR antigen in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1981; 21: 108-15.
11. Morel PA, Dorman JS, Todd JA, McDevitt HO. Aspartic acid at position 57 HLA-DQ chain protects against type 1 diabetes: a family study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85: 8111-5.
12. Awata T, Kuzuya T, Matsuda A, Iwamoto Y, Kanazawa Y, Okuyama M, et al. High frequency of aspartic acid at position 57 of HLA-DQ beta-chain in Japanese IDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1990; 39: 266-9.
13. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA-DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 1990; 85: 1315-9.
14. Baisch JM, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes. *The New England Journal of Medicine* 1990; 322: 1836-41.
15. Dorman JS, LaPorte RE, Stone RA, Trucco M. Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 7370-4.
16. Thorsby E, Gjertsen HA, Lundin KA, Ronningen KS. Insulin dependent diabetes mellitus susceptibility or protection may be determined by certain HLA-DQ molecules. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 5: 365-73.
17. Giphart MJ, Roep BO, Drabbels J, D'Amaro J, Bruining J, Abdulkadir J, et al. Relative contribution of HLA-DQA and DQB alleles to predisposition to insulin-dependent diabetes mellitus. *Human Immunology* 1992; 34: 142-6.
18. Ronningen KS, Spurkland A, Tait BD, Drummond B, Lopez-Larrea C, Baranda FS, et al. HLA class II association in insulin-dependent diabetes mellitus among Black, Caucasoids, and Japanese. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (editors). *HLA*. London: Oxford University Press; 1991. p 713-22.
19. Zamani M, Spaepen M, Buyse I, Marynen P, Bex M, Bouillon R, et al. Improved risk assessment for IDDM by analysis of amino acids in HLA-DQ and DR1 loci. *European Journal of Human Genetics* 1994; 2: 177-84.
20. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-9.
21. Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, Cambon-Thomsen A. Extensive genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extended HLA haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 9717-21.
22. Ronningen KS, Iwe T, Halstensen TS, Spurkland A, Thorsby E. The amino acid at position 57 of the HLA-DQ chain and susceptibility to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Human Immunology* 1989; 26: 215-25.
23. Ronningen KS, Spurkland A, Markussen G, Iwe T, Vartdal F, Thorsby E. Distribution of HLA class II alleles among Norwegian Caucasians. *Human Immunology* 1990; 29: 275-81.
24. Marsh SGE, Bodmer MG. HLA class II nucleotide sequences. *Human Immunology* 1992; 35: 1-17.
25. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Annals of human genetics* 1955; 19: 251-3.
26. Fisher RA. *The Design of Experiments*. Edinburgh: Oliver & Boyd; 1960. p 258
27. Dunn OJ. Estimation of the means of dependent variables. *Annals of Mathematical Statistics* 1958; 29: 1095-111.

28. Dunn OJ. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association* 1961; 56: 52-64.
29. Sandkuyl LA. Analysis of affected sib pairs using information from extended families. In: Elston RC, Spence MA, Hodge SE, MacCluer JW (editors). *Multipoint Mapping and Linkage Based upon Affected Pedigree Members: Genetic Analysis Workshop 6*. New York: Alan R. Liss; 1989.
30. Risch N. Assessing the role of HLA linked and unlinked determinants of disease. *American Journal of Human Genetics* 1987; 40: 1-14.
31. Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risk: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculation. *Annals of Human Genetics* 1987; 51: 227-33.
32. Schaid DJ, Sommer SS. Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *American Journal of Human Genetics* 1994; 55: 402-9.
33. Knapp M, Seuchter SA, Baur MP. The haplotype-relative risk (HRR) method for analysis of association in nuclear families. *American Journal of Human Genetics* 1993; 52: 1085-93.

