مجله دیابت و لیپید ایران. تابستان ۱۳۸۶؛ دوره ۶ (شماره ۴): ۳۲۵-۳۱۹

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

جواد توکّلی بزّاز[۱] *، ورا پراویکا[۲]، آندره بولتون[۳]، یان هاچینسون[٤]

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 می شود، نقش بسیار مهمی را در برانگیختن سلول های ایمنی بیطرف(Th0) و تبدیل آنها به سلول های Th1 و به‌طور متقابل مهار تکثیر سلول‌های Th2 دارد که در نهایت سبب القا و پیشبرد پاسخ های ایمنی سلولی می گردد. 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 واکنش های خودایمن و بر هم زدن نظم عوامل سلولی و مولکولی درگیر داراست. از منظر مداخلات درمانی در بیماری دیابت نوع ۱ نیز این سایتوکین موضوع تحقیقات متنوعی در سطوح مختلف بوده است.

روش ها: در قالب یک Candidate Gene Association Study میزان تأثیر پلی‌مورفیسم ژن IFN-γ در موقعیت T/A*۸۷٤+ بر ایجاد و پیشرفت بیماری دیابت نوع ۱ مطالعه شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲٤۸ 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.

یافته ها: 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≥۰/۰۵).

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 نمی کند که می تواند 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، پلی مورفیسم، 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
٤- انستیتو ملی پیوند، لوس آنجلس، امریکا

* ***نشانی***: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن: ۸۸۰۲۶۹۰۲-۳؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: tavakkolybazzazj@ tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۵
تاریخ پذیرش: ۸۶/۴/۱۸

مقدمه

دیابت نوع ۱ یکی از بیماری‌های خود ایمن محدود به عضو[1] می‌باشد که دامنه آسیب نسجی در آن منحصر به سلول‌های بتای جزایر پانکراس است. شیوه پاسخ ایمنی در این بیماری از نوع سلولی[2] بوده که در نتیجه غلبه الگوی Th1 و فعالیت بیش از حد آن و در مقابل، مهار فعالیت محور Th2 رخ می دهد [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 سلول های Th1 ترشح می شود، بر سلول‌های مختلفی از جمله ماکروفاژها اثر می گذارد و سبب فعالیت و افزایش بیان مولکول های MHC کلاس II توسط سلول های عرضه کننده آنتی ژن (APC) می شود. این سلول ها سپس با عرضه آنتی ژن خودی به سلول های T خود واکنشگر[3] – که حتی در گنجینه[4] سلول های T مربوط به افراد عادی نیز وجود دارند–، زمینه ایجاد پاسخ خودایمن را فراهم می آورند [۷-۲].

در فرآیند ایجاد بیماری دیابت نوع ۱ مراحل مختلفی مشاهده می گردد. در یکی از این مراحل که انسولیت نامیده می شود، جزایر لانگرهانس پانکراس توسط سلول های تک هسته‌ای[5] ارتشاح می یابند. 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 ارتشاح و اسکان[6] سلول‌های التهابی در این جریان می شود، IFN-γ می باشد [۱۰]. از میان سایتوکین‌های Th1 که تمامی آنها سبب هدایت انسولیت به طرف انهدام سلول‌های بتا یا ترشح کننده انسولین می‌گردند، تنها IFN-γ در سلول‌های جزایر بتای پانکراس قابل یافت بوده است. در آزمایش‌های حذفی ژن‌ها نیز IFN-γ تنها سایتوکین از میان سایتوکین‌های رده Th1 بوده که حذف یا سرکوب آن، وقوع دیابت را تأخیر و یا کاهش داده است [۲].

گستره وسیع در کارکردهای بیولوژیک سایتوکین ها همراه با برخی دیگر از ویژگی ها که تقریبا برای کلیه آنها مطرح می باشد، موجب بروز مشکلات و یا ابهاماتی در ارزیابی و تفسیر نقش آنها در شرایط مختلف از جمله در بیماری ها می گردند. ترشح یک سایتوکین مشخص توسط سلول های مختلف و بالعکس قابلیت تاثیر یک سایتوکین بر سلول های مختلف[7] ، ارایه عملکرد و اثری مشابه توسط سایتوکین های مختلف[8] ، تولید آبشاری و زنجیروار آنها که یک سایتوکین سبب تحریک سلول‌ها و آزادسازی سایتوکین‌های دیگر و حتی خودش می گردد و در کنار این‌ها اثرات متقابل آنها بر یکدیگر در قالب هایی چون هم افزایی[9] و یا مخالف[10] از جمله این موارد هستند. از سوی دیگر داشتن نیمه عمر کوتاه و غلظت های پلاسمایی پایین سایتوکین ها سبب دشواری استخراج[11] و مشخص نمودن[12] 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 دارند، از یک نگاه کلی مورد کنکاش قرار می گیرد.

خوشبختانه در خصوص بسیاری از ژن ها از جمله ژن‌های چندین سایتوکین، طی مطالعات مختلف In Vivo و In Vitro وجود یک همراهی بین نوع تغییر ساختمانی ژن و به طور مشخص آلل خاصی از آن با سطح تولید فرآورده پروتینی آن ژن نشان داده شده است. لذا می توان ترجیحاً با گزینش این دسته خاص از تغییرات ژنی که اصطلاحاً کارکردی[13] نامیده می شوند، به ردیابی تاثیرات فنوتیپیک آنها در جهت افزایش یا کاهش بروز یک بیماری یا یک

[1] Organ– specific
[2] Cell Mediated
[3] Auto-reactive
[4] Repertoire
[5] Mononuclear Cells
[6] Homing
[7] Pleiotropy
[8] Redundancy
[9] Synergistic
[10] Antagonistic
[11] Isolation
[12] Characterization
[13] Functional

صفت[1] که از حیث بیولوژیکی و پاتوفیزیولوژی دارای رابطه معنادار با فرآورده ژن مربوطه است، پرداخت. این رویکرد در مورد صفات یا بیماری‌هایی که دارای پس زمینه ژنتیکی هستند و بالقوه می توانند با تغییرات ساختمانی ژن مفروض رابطه‌ای هر چند نسبی داشته باشند، کاربرد وسیعی پیدا نموده است.

بنابراین توضیحات، مطالعه حاضر که به بررسی آثار فنوتیپیک یک پلی مورفیسم کارکردی از ژن IFN-γ در بروز بیماری دیابت نوع ۱ –که دارای زمینه های ژنتیکی شناخته شده است [۱۲]– پرداخته، موقعیت روشنی می‌یابد.

روش‌ها

گروه شاهد (Healthy controls)

این گروه به تعداد ۱۱۹ نفر را افرادی تشکیل می دادند که از نژاد بریتانیایی – قفقازی 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[2] خود نمی‌دادند. انتخاب این افراد بطور تصادفی بود و نسبت فامیلی 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 سال‌های ۲۰۰۲ – ۱۹۹۸ به این 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 – قفقازی بودند و فاقد 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.

تعیین نوع ژنوتیپ / آلل پلی‌مورفیک

با تهیه حدود ۵ cc 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)، آماده‌سازی[3] لازم جهت تایپ کردن هر یک از پلی‌مورفیسم‌های مورد اشاره با استفاده از روش ARMS – PCR صورت گرفت. در مرحله بعد محصول PCR بدست آمده که در واقع حاوی چندین میلیون کپی 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 / الل هر فرد از نظر پلی‌مورفیسم مورد بررسی تعیین گردید (شکل ۱) .

بررسی‌های آماری

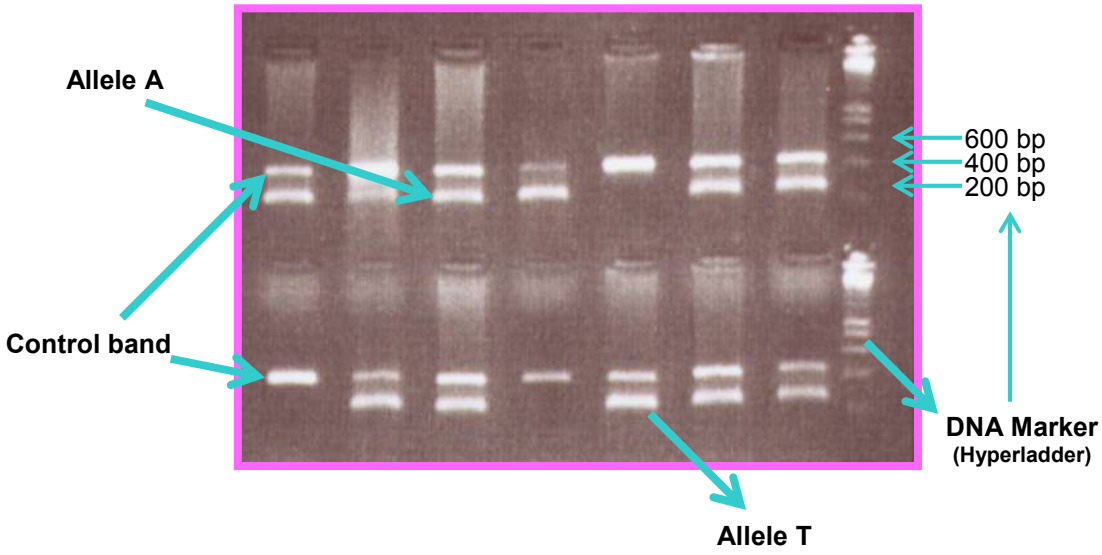
جهت بررسی نحوه توزیع آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف بین دو گروه شاهد و بیمار از نسبت‌های OR (Odds Ratio) و شاخص "درجه آزادی" (CI) ۹۵٪ استفاده گردید. آزمون‌های Chi-square و Fisher Exact جهت سنجش معنی‌دار بودن انتخاب گردیدند. عملیات آماری با برنامه Stata و نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۱/۵) انجام گرفت.

[1] Trait
[2] First degree relatives
[3] Setup

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی‌مورفیسم ژن IFN-γ +۸۷۴*T/A و پرایمر کنترل

نام	نام پرایمر	توالی	اندازه‌قطعه PCR
IFN-γ +۸۷٤*T/A	Generic primer	5’-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3’	۲٦۲ bp
	Primer T (sense)	5’-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3’	
	Primer A (sense)	5’-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3’	
Internal control primers (HGH)	Sense:	5’-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3’	٤۲۹ bp
	Antisense:	5’-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3’	

شکل ۱- تصویر محصول ARMS- PCR مربوط به پلی‌مورفیسم IFN-γ +874*T/A بر روی ژل آگاروز (ژنوتیپ افراد مختلف نیز مشخص شده است)



جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپ/الل پلی‌مورفیسم IFN-γ +874*T/A در گروه کنترل (C) و بیماران دیابت نوع ۱ (P)

IFN-γ +874*T/A	گروه شاهد	گروه بیمار
ژنوتیپ		
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 هیچ‌یک از مقایسه‌ها معنی‌دار نبود (P≥۰/۰۵)

† اعداد خارج پرانتز نشانگر تعداد و داخل پرانتز درصد فراوانی است.

تعداد گروه بیمار: ۲۴۸ بیمار دیابتی

تعداد گروه شاهد: ۱۱۹ فرد سالم

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 الل/ 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 ($P\geq ۰/۰۵$) (جدول ۲).

بحث

با توجه به گزارش‌های قبلی که همراهی پلی‌مورفیسم مورد نظر با بیماری دیابت نوع۱ را گزارش نموده‌اند [۱۳، ۱۴]، یافته‌های ما به چنین نتیجه‌ای 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[1] (LD) هستند، باشد.

در مطالعه حاضر همراهی مشخصی بین پلی مورفیسم ژن IFN-γ و بیماری دیابت نوع یک مشاهده نگردید. کارکردی بودن پلی مورفیسم انتخاب شده [۱۵]، برخورداری الل کمتر شایع[2] این پلی مورفیسم از فراوانی قابل ملاحظه و تقریبا برابر با الل شایع و بالاخره استفاده از تعداد بالای نمونه در دو جمعیت شاهد و بیمار در مجموع سبب گردیده اند که این مطالعه از قدرت[3] بالایی برخوردار باشد. این موقعیت به نوبه خود سبب می گردد که دقت و صحت تفسیر نتایج بدست آمده تا حد قابل قبولی افزایش و متقابلا زمینه مخدوش بودن یافته ها مثلا در قالب مواردی همچون منفی کاذب کاهش یابد. به هر حال، مشاهده حاضر اگر چه نشان دهنده عدم همراهی بین پلی مورفیسم IFN-γ +874*T/A و وقوع یا بروز دیابت نوع یک در نزد یک جمعیت بریتانیایی است، ولی امکان اثرگذاری این پلی‌مورفیسم در تظاهرات بالینی بیماری و احیانا تفاوت در تابلوی بالینی[4] را منتفی نمی‌داند. در چنین حالتی این پلی مورفیسم 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[5] 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 متضاد می باشد – که این اثر خود به عوامل متعددی همچون میزان و سطح کمّی این سایتوکین التهابی، مکان و زمان حضور یا اثر آن و توالی مواجهه آن با بافت\ سلول پاسخ دهنده وابسته است [۲]، شاید نقش این پلی مورفیسم را تا آن حد که به عنوان یک عامل خطر مستقل[6] نقش آفرین باشد، نتوان در نظر گرفت.

در خصوص مطالعاتی که وجود همراهی بین پلی مورفیسم 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 گزارش های اولیه ای که وجود یک همراهی را نشان داده اند، عملا با گزارش عدم همراهی در مطالعات بعدی نقض می گردند. 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 می تواند به ملاحظات متدولوژیک و عوامل مخدوش کننده[7]، از جمله انتخاب نمونه ها از افرادی غیر از نژاد اصلی جمعیت مورد نظر[8] قابل انتساب باشد، می تواند ناشی از زیرساخت سیال و هتروژن بیماری های کمپلکس از نظر ژنتیکی نیز باشد. تکرار ناپذیری[9] یافته های مربوط به این مطالعات یکی از مشکلات و موانع تحقیقات در این زمینه است. یکی از علل این تکرارناپذیری و تفاوت در نتایج بدست آمده آن است که پلی‌مورفیسم (های) اصلی و مؤثر در ایجاد دیابت نوع ۱ در

[1] Linkage Disequilibrium
[2] Less Frequent allele
[3] Power

[4] Clinical Heterogeneity
[5] Age at the onset
[6] Independent Risk Factor
[7] Confounder Issues
[8] Population Admixture
[9] Irreproducibility

گزارش‌های قبلی خود آن پلی‌مورفیسم های مورد بررسی نبوده اند و در اصل پلی‌مورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن IFN-γ یا در ساختمان ژنهای مجاور) علت این همراهی بوده اند که با پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در پیوستگی ترجیحی (LD) هستند. لذا اگر در یک جمعیت و یا نژادی بواسطه تغییرات ساختمانی ژنتیکی این الگوی LD بین نشانگر (پلی‌مورفیسم) مورد بررسی و آن پلی‌مورفیسم 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 پردازند، 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 شانس برابری را جهت انتشار در مجلات علمی ندارند، عملا در مقالات منعکس نمی شوند (Under-representation of Negative Results).

یافته های ما نشان می دهد که بین پلی مورفیسم ژن IFN-γدر موقعیت 874*T/A+ و بیماری دیابت نوع یک رابطه معناداری از نظر آماری وجود ندارد. با وجود آنکه مطالعات مشابهی 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 ژنوتیپ و فنوتایپ در بیماری های کمپلکس این تفاوت قابل توجیه می باشد. البته این شکنندگی و عدم ثبات در رابطه ژنوتیپ – 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.

مآخذ

1. 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.
2. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998;14:129-51.
3. Trucco M, Dorman JS. Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus in humans. *Crit Rev Immunol* 1989;9:201-45.
4. del Guercio P. Susceptibility to diabetes and the major histocompatibility complex: the 57th residue affair. *Diabet Med* 1992;9:330-4.
5. 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.
6. Wang B, Andre I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C, Mathis D. Interferon-γ impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:13844-13849.
7. 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.
8. Babaya N, Nakayama M, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:194-204.
9. Kolb H. Benign versus destructive insulitis. *Diabetes Metab Rev* 1997; 13:139-46.
10. Savinov AY, Wong FS, Chervonsky AV. IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells. *J Immunol* 2001;167:6637-43.
11. 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.
12. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1079:289-99.
13. 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.
14. 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.
15. 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, Johannesen 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.