

## بررسی هم‌بستگی چند شکلی در ناحیه پروموتری ژن زیر واحد آلفا اینترلوکین ۷ (IL7Ra) با بیماری مالتیپل اسکلروزیس در استان خوزستان

مهرداد صادقی حاج<sup>۱،۲\*</sup>، الیاس کوشکی<sup>۱،۳</sup>، نسترن مجدی نسب<sup>۴</sup>، توران شاهانی<sup>۲</sup>

- ۱ - جامعه تحقیقات بهداشت، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران
- ۲ - گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران
- ۳ - گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران
- ۴ - دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خودایمن همراه با تخریب میلین است. مطالعه های هم‌بستگی ژنتیکی (GAS) تأثیر مستعدکنندگی برخی چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (اسنیپ) را در ژن زیر واحد آلفا گیرنده اینترلوکین ۷ (IL7Ra) برای ابتلا به MS مشخص نموده است که به طور کلی مربوط به کشورهای غربی می‌باشد. تاکنون گزارش‌های اندکی بین ژن IL7Ra و MS در جمعیت‌های آسیایی وجود دارد. اسنیپ rs11567685 به دلیل قرار داشتن در ناحیه پروموتری دارای نقش عملکردی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه هم‌بستگی اسنیپ rs11567685 با بیماری MS در ۱۰۰ بیمار غیر خویشاوند و ۱۰۰ فرد سالم که از نظر نژادی با بیماران مطابقت داشتند در جمعیت استان خوزستان بررسی گردیدند. فراوانی ژنوتیپی و آللی اسنیپ در دو جمعیت بیمار و سالم با روش PCR-RFLP تعیین گردید. به منظور بررسی انحراف از تعادل هاردی واینبرگ در دو گروه بیمار و سالم و برای اسنیپ مطالعه شده از آزمون مربع کای استفاده شد.

**یافته‌ها:** جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشت و در زیر گروه بیماران Secondary Progressive (SP) و هم-چنین در زیر گروه بیماران Secondary Progressive+Primary Progressive (SP+PP) در فراوانی آللی و ژنوتیپی اسنیپ rs11567685 هم‌بستگی معنی‌داری با MS یافت شد. هم‌چنین در گروه بیماران مرد و بیماران زن نیز هم‌بستگی معنی‌داری در زیر گروه‌ها به دست آمد.

**بحث:** این مطالعه نشان داد که در زیر گروه‌های بالینی در فراوانی آللی و ژنوتیپی اسنیپ rs11567685 هم‌بستگی معنی‌دار وجود دارد که تعدادی از آن‌ها در زیر گروه‌های تفکیک جنسی نیز معنی دار بودند.

**نتیجه‌گیری:** در این مطالعه مشخص شد ناحیه پروموتری ژن IL7Ra دارای تأثیر معنی‌داری در بیماری MS می‌باشد بنابراین از این ناحیه ژنی می‌توان به عنوان یک بیومارکر در تشخیص زود هنگام MS استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** MS، ژن IL7Ra، چند شکلی های تک نوکلئوتیدی، هم‌بستگی، اسنیپ rs11567685

### مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS) شایع‌ترین بیماری نورولوژیکی سیستم عصبی مرکزی (CNS) می‌باشد که با تخریب میلین و آسیب‌های شدید آکسونی به وجود می‌آید (۳) و به طور عمومی بالغین جوان بین ۲۰ تا ۵۰ ساله را مبتلا می‌سازد (۷،۳۷). شیوع جهانی این بیماری ۳۰ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است و نسبت جنسی بیماری به صورت ۳ زن : ۱ مرد است. ایران در ناحیه با شیوع متوسط (۵-۳۰ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰

### نویسنده مسئول:

جامعه تحقیقات بهداشت، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری،

دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، اهواز، ایران

پست الکترونیکی: Mehrdad.SadeghiHaj@Gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۰۱

مستقل بیمار و کنترل است و هدف آن تعیین تفاوتها در فراوانی آلل های پلی مورفیسم در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل است. علی رغم آن که هر دو نوع مطالعه های گسترده هم بستگی و ژن کاندید، پلی مورفیسم هایی را در منطقه آنتی ژنی لوکوسیت انسانی (HLA) در لوکوس HLA-DR2 شناسایی کرده اند (هاپلوتایپی از HLA class II یا به طور دقیق DRB1\*1501, DRB\*0101, DQA1\*0102, DQB1\*0602 که به نام DRB1\*15 نیز شناخته می شود، مناطقی که دارای قوی ترین جایگاه ابتلا به MS می باشند)، تحقیق های اخیر طیف گسترده ای از ژن های غیر HLA را شناسایی کردند که به طور آشکاری با MS هم بستگی دارند. درک پلی مورفیسم های غیر از HLA ممکن است به شناسایی یافته های جدید برای درمان کمک کند. ژن زیر واحد آلفا گیرنده اینترلوکین ۷ در مطالعه های گروه های مختلف به عنوان یک ژن کاندید در بیماری MS پیشنهاد گردیده است (۱۱، ۳۸، ۱۳، ۱۸، ۳۴).

در مشاهده ای به اثبات رسید که در MS پیام دهی اینترلوکین ۷ (IL7) معیوب می باشد (۶). به طور کلی، چرای این که معیوب بودن سیگنال دهی IL7 موجب افزایش خطر پیشرفت MS می شود، هنوز ناشناخته مانده است. اینترلوکین ۷ یک فاکتور مهم در تولید و پیشرفت سلول های T و B می باشد. سیگنال های انتقال یافته توسط این رسپتور برای بقاء لنفوسیت ها و همئوستازی حیاتی است و تمایز سلول های T<sup>+</sup>CD4 را در تیموس تحریک می کند و تکثیر سلول های T را افزایش می دهد (۱۹). Durum و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بیان داشتند که گیرنده اینترلوکین ۷ (که تحت عنوان CD127 شناخته می شود) بر روی سلول های لنفوسیت در طول پیشرفت و بلوغ آن ها بیان می شود (۱۹). IL7Ra به صورت انحصاری توسط سلول های رده لنفوئیدی بیان می شود و لذا در خون تنها بر سطح سلول های بالغ لنفوسیت T دیده می شود (۱۹). فرم بالغ گیرنده IL7 شامل ۴۳۹ اسید آمینه با وزن مولکولی 49.5KD است. هر گونه تغییر ژنتیکی در ژن IL7 می تواند بر روی سیگنال دهی گیرنده تأثیرگذار باشد (۱۲، ۱۳). نقص در مسیر علامت دهی IL7 موجب لنفوپنیای وخیم می شود. بروز جهش در IL7Ra موجب توقف زود رس رشد تیموسی می شود (۱۹).

ژن IL7R بر روی کروموزوم ۵ (5p13) قرار دارد و دارای ۸ اگزون می باشد و SNP های مهمی که ارتباط برجسته ای با پاتوژنز M.S دارند را در خود جایی داده است (۳۸، ۱۳، ۱۸، ۳۴، ۱، ۲، ۲۷). در مطالعه هایی که انجام شده است ۱۳

نفر) قرار دارد (۳۷). واکنش های سلول های T به آنتی ژن های میلین در این نارسایی پیچیده دخالت دارد. علائم مشخص پاتولوژیک بیماری MS در سال ۱۸۶۸ توسط J.M. Charcot ارائه و از سایر ناهنجاری های مزمن و شایع نورولوژیک افتراق داده شد. تاکنون هیچ گونه درمان قطعی برای MS یافت نگردیده است ولی از سه گروه دارو برای درمان استفاده می شود که عبارتند از:  $\beta$  اینترفرون ها که شامل IFN- $\beta$ 1a و IFN- $\beta$ 1b می شود، گلاتیرامر استات و ناتالیزوماب (۳۶). ترشح شدن سلول ها به درون CNS و فعال شدن سلول های B و T در نتیجه آنتی ژن های CNS فرضیه خودایمنی بیماری MS را تأیید می کنند (۱۵). در گذشته میلین زدایی عامل اصلی در MS تصور می شد اما به تازگی مسئله تخریب آکسونی مورد توجه قرار گرفته است (۲۵). دو مسیر برای تخریب آکسونی شده است: اول، در محل پلاک ها التهاب و تخریب آکسونی اتفاق می افتد که در اینجا میلین زدایی و تخریب آکسونی به هم مرتبط هستند. دوم، تخریب آکسونی مستقل از التهاب و میلین زدایی اتفاق می افتد (۸).

در حالی که سبب شناسی بیماری هنوز ناشناخته می باشد، مطالعه های اپیدمیولوژیکی و ژنتیکی، اجزاء موروثی مهمی را که در پاتوژنز MS دخالت دارند را نشان داده اند. مطالعه های نشان داده اند که خویشاوندان درجه ۱، ۲، ۳ بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد معمولی دارای احتمال بیش تری برای ابتلا به MS هستند (۳۵، ۹، ۲۴، ۱۴، ۳۰). مفیدترین نشانگرهایی که به وفور در مطالعه این بیماری استفاده می شوند عبارتند از میکروستلایت ها<sup>۱</sup>، پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی<sup>۲</sup> و پلی مورفیسم های تعداد نسخه (CNP).

SNP ها بیش ترین سکانس های در دسترس در ژنوم انسان می باشند (۲۹). در میان تمام SNP ها، آن هایی که به مناطق کد کننده و تنظیمی طبقه بندی شده اند می توانند نشانه های مهمی در بیان ژن و عملکرد داشته باشند. SNP های غیر مشابه، یا آمینواسیدهای رشته ها را تغییر می دهند و یا موجب متوقف شدن کدون های مسئول هم بستگی های بیش تر بیمارهای شناخته شده می شود. به تازگی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) مرتبط با MS توسط دو گروه اصلی از آنالیزهای با عملکرد بالا در تعیین ژنوتیپ ارزیابی شده اند که عبارتند از: مطالعه ژن کاندید و مطالعه های گسترده هم بستگی ژنوم (GWAS). در مطالعه های هم بستگی، ایده اصلی شناسایی تفاوت های موجود در ترکیب ژنتیکی گروه های

<sup>1</sup> Microsatellite

<sup>2</sup> Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)

اسید، نیستاتین، نوویوسین و سیکلوهاگزامید است با مقادیر ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر استفاده شد. لازم به ذکر است تمامی محیط کشت های مورد اشاره در آزمایشگاه با فرمولاسیون های موجود در منابع معتبر تهیه شد چرا که بسیاری از آن ها به صورت تجاری موجود نبوده و یا بسیار گران قیمت بودند.

بعد از جد سازی ایزوله های مختلف رشد کرده بر روی محیط های مورد اشاره ایزوله ها به طور متوالی چندین مرتبه، کشت داده شد و از خالص بودن آن ها اطمینان حاصل گردید. از تعداد ۳۰ نمونه خاک برداشت شده از مناطق مختلف در مجموع ۳۰۰ کلنی جدا شد و پس از خالص سازی در محیط TSB حاوی گلیسرول در دمای ۸۰- نگه داری گردید.

### نمونه گیری

پس از تأیید شورای اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (کد اخلاق: ajums.REC.1392.194) و تکمیل فرم رضایت نامه، از بیماران نمونه خون محیطی تهیه شد. جمع آوری نمونه ها از افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس مراجعه کننده به پزشکان متخصص در فاصله زمانی سال ۱۳۹۲-۱۳۹۴ انجام شد. تشخیص بیماری با نظر پزشک متخصص و بر اساس راهنمای تشخیص مک دونالد صورت گرفت (۲۰). نمونه های کنترل از افرادی انتخاب شد که خود یا بستگان نزدیک آن ها فاقد هرگونه سابقه بیماری MS بودند. پس از نمونه گیری، از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) به عنوان ماده ضد انعقاد خون استفاده شد. این محلول به صورت ۰/۵ مولار و با PH= ۸ تهیه شد. ۵ میلی لیتر خون محیطی بیماران به آرامی به لوله های حاوی EDTA منتقل گردید. به ازای هر ۱ ml خون، ۱۰۰ میکرولیتر محلول EDTA استفاده شد. در مجموع ۱۰۰ فرد در گروه بیمار و ۱۰۰ فرد در گروه افراد سالم قرار گرفتند.

### استخراج ژنوم

از کیت High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany) و با استفاده از دستورالعمل کارخانه ای کیت برای استخراج DNA اقدام شد. پس از تعیین کیفیت DNA استخراج شده به وسیله اسپکتوفتومتری در نهایت در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

### PCR-RFLP

روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ SNPrs11567685 مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمر رفت (F promoter) و توالی پرایمر بازگشت (R Promoter) از پرایمرهای طراحی شده توسط حیدری و همکاران (۲۲) استفاده گردید که به

اسنیپ در نواحی مختلف این ژن شناسایی شد که در میان آن ها سه اسنیپی که در ناحیه پروموتری قرار دارند به علت نقش عملکردی که دارا هستند دارای اهمیت بیشتری نسبت به بقیه بودند. SNP rs11567685 که در این مطالعه بررسی گردید جزء این ها می باشد (۳۴). گروه Stewart گزارش دادند که پروموتر SNP rs11567685 بر روی بیان CD127 در سلول های T در بیماران PP-MS دارای تأثیری باشد. علاوه بر این آن ها بیان داشتند که حضور آلل C در این جایگاه دارای نقش محافظتی از ابتلا به بیماری MS با  $p=0.041$  می باشد (۴،۲۱). در ضمن حضور آلل C بیان بالاتری از CD127 را بر روی کل سلول های CD4+ T نشان می دهد (۴). در بررسی انجام شده دیگر روی SNP rs11567685 فراوانی آللی ژنوتیپ CC، CT و TT در جمعیت بیمار برای آلل C ۲۵٪ و آلل T ۷۵٪ با  $P\text{-value} : 0.2$  و در جمعیت سالم فراوانی آلل C ۳۳٪ و برای آلل T ۶۷٪ با  $P\text{-value} : 0.1$  می باشد (۳۴). به نظر می رسد که تفاوت در پروموتر به تنظیم بیان مختلف این ژن منجر می شود (۵). از آنجایی که تاکنون هیچ مطالعه ای در استان خوزستان در مورد همبستگی بین فراوانی آللی و ژنوتیپی اسنیپ rs11567685 با بیماری MS وجود ندارد لذا در این مطالعه به ارتباط یابی این همبستگی پرداخته شده است.

### روش کار

#### جمع آوری نمونه و ایزوله های مورد بررسی

از مناطق کویری ایران من جمله کویر لوت و بیابان های استان سیستان و بلوچستان و مناطق بیابانی استان خوزستان یک گرم خاک (هنگام جمع آوری، pH و دمای خاک ثبت گردید) برداشته شد و در ۱۰۰ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی حل شد. نمونه بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. این نمونه ها سپس در یک انکوباتور شیکردار در ۲۸ درجه سانتی گراد و با دور rpm ۲۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. آن گاه به مخلوط زمانی داده شد تا رسوب ها ته نشست شود، سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت های پشت سر هم تا میزان ۵-۱۰ از آن تهیه گردید. مقداری معادل ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت (۵- ۱۰-۲-۱۰) برداشته و روی سطوح محیط های کشت های مورد اشاره در زیر کشت داده شد. لوله های کشت در دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و بعد از گذشت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی شدند.

برای کشت از محیط کشت هایی مانند ISP2 و Humic acid agar که حاوی ترکیب های ضد میکروبی مانند نالیدیکسیک

های شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ دارای ژنوتیپ TT و نمونه شماره ۷ دارای ژنوتیپ CC و نمونه های شماره ۸، ۱۰، ۳، دارای ژنوتیپ CT می باشد. نمونه شماره ۱۱ نمونه هضم نشده آنزیمی می باشد.

### یافته ها

نسبت بیماران زن به مرد ۳:۱ می باشد که همگام با استاندارد موجود نشان دهنده فراوانی بیماری در میان زنان است. با توجه به پرونده بیماران بیش تر آن ها سابقه بیماری در خانواده داشته اند. در سابقه تعداد افراد سالم مرد و زن هیچ نوع بیماری عصبی وجود نداشت.

در گروه بیمار از لحاظ نوع MS، ۴۹ نفر از نوع RR، ۲۰ نفر از نوع SP و ۱۸ نفر از نوع PP بودند. ۲۶ نفر از افراد بیمار مرد بودند که از لحاظ نوع MS، ۱۱ نفر از نوع RR، ۷ نفر از نوع SP و ۸ نفر از نوع PP بودند. ۶۱ نفر از افراد بیمار زن بودند که از لحاظ نوع MS، ۳۸ نفر از نوع RR، ۱۳ نفر از نوع SP و ۱۰ نفر از نوع PP بودند. در افراد سالم ۴۷ نفر مرد و ۵۳ نفر زن بودند. گروه بیمار و سالم هر دو از جمعیت ساکن خوزستان انتخاب شدند که از لحاظ جنس و سن با هم تطابق داشتند. نتایج این مطالعه هرگونه انحراف معنی داری  $p \geq 0.05$  از نسبت پیش بینی شده در تعادل هاردی- واینبرگ نشان نداد و لذا جمعیت مورد مطالعه در تعادل H.W دارد (جدول ۱).

بررسی های این مطالعه نشان داد که هیچ گونه تفاوت معنی داری بین فراوانی فنوتیپی بین گروه بیمار و افراد سالم در اسنیپ rs11567685 وجود ندارد ( $P \geq 0.05$ ) اما تفاوت معنی داری در زیر گروه های SP MS ( $P=0.001$ ) و SP+PP MS ( $P=0.02$ ) مشاهده گردید. همچنین در مردان و زنان نیز در حالت کلی هیچ گونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد اما در مردان تفاوت معنی داری در زیر گروه SP MS ( $P=0.001$ ) و در زنان در زیر گروه های SP MS ( $P=0.001$ ) و SP+PP MS ( $P=0.001$ ) مشاهده گردید (جدول ۲).

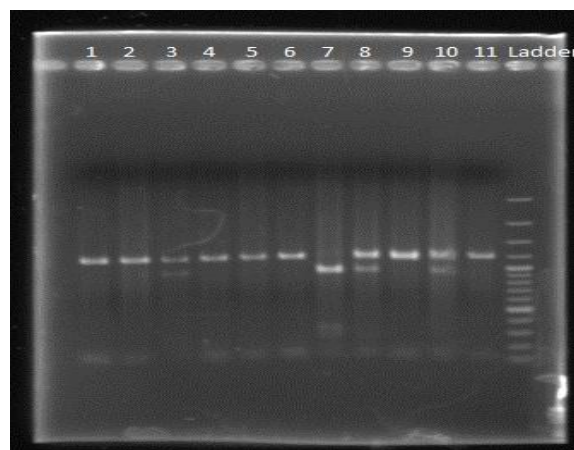
ترتیب به صورت زیر می باشد (پرایمرها در شرکت MetaBion آلمان سنتز شدند):

5'GGCATTTCAGGTTTGGGGGAGTC3'  
و 3'5'AAGGACATGAAGAGACAGAGCC

در گرادیان دمایی بین  $66-56^{\circ}\text{C}$  برای پرایمر بهترین دمایی PCR Annealing برای SNPrs11567685،  $66^{\circ}\text{C}$  می باشد. سپس بر روی کلیه نمونه های استخراجی با استفاده از کیت PCR (Roche, Germany)، PCR انجام و محصول تک باند با اندازه مورد نظر به دست آمد. در محل اسنیپ SNPrs11567685 دو آلل C و T وجود دارد که حضور آلل C موجب ایجاد جایگاه برشی برای آنزیم Pst I (Fermentase) می شود. بنابراین از این آنزیم و عملکرد اختصاصی آن برای تعیین ژنوتیپ SNP ناحیه پروموتوری استفاده شد. محصول PCR اسنیپ طبق دستورالعمل استفاده از آنزیم در دمایی  $37^{\circ}\text{C}$  و به صورت Overnight هضم شدند. در نهایت تمامی نمونه ها برای اسنیپ rs11567685 تعیین ژنوتیپ شدند (شکل ۱).

### روش های آماری تجزیه و تحلیل نتایج

به منظور بررسی انحراف از تعادل هاردی واینبرگ (-Hardy Weinberg Equilibrium) در دو گروه بیمار و سالم از آزمون کای مربع استفاده شد. به منظور مقایسه دو گروه و تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های مجذور کای و آزمون فیشر استفاده شد.  $P \leq 0.05$  به عنوان حد معنی دار در نظر گرفته شد. برای انجام آزمون های آماری از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ استفاده شد.



شکل ۱. نتایج هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم Pst I

برای اسنیپ SNPrs11567685 هضم آنزیمی محصول های PCR با آنزیم Pst I برای اسنیپ SNPrs11567685 روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم برآید. در این شکل نمونه-

جدول (۱): فراوانی ژنوتیپی و فنوتیپی در اسنیپ rs11567685 و تعادل H-W در گروه بیمار و افراد سالم

SNP Name	Subject number	Genotype Frequency %			H-W equilibrium			Allele Frequency %	
		TT	GT	GG	X <sup>2</sup>	df	P	T	G
SNP rs11567685 Risk Allele : T	Patient: 100	49.43	37.93	12.64	0.08	2	0.97	68.39	31.61
	Control : 100	60	30	10	0.40	2	0.81	75	25

جدول (۲): فراوانی فنوتیپی در گروه بیمار و افراد سالم در اسنیپ rs11567685

RR MS=Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis, SP MS=Secondary Progressive Multiple Sclerosis, PP MS=Primary Progressive Multiple Sclerosis

SNP	Type	Cohort	Maj. Allele%	Min. Allele%	P-Value	P-Value Bonferroni Corrected
Rs11567685  Maj. Allele : T Min. Allele : C	Total	Total MS	68.39	31.61	0.29	0.74
		RR MS	74.49	25.51	0.93	1
		SP MS	45	55	0.00	0.00
		PP MS	75	25	1	1
		SP+PP MS	60	40	0.02	0.07
		Control	75	25		
	Male	Total MS	65.38	34.62	0.46	0.91
		RR MS	63.64	36.36	0.32	0.78
		SP MS	42.86	57.14	0.00	0.00
		PP MS	77.78	22.22	0.22	0.62
		SP+PP MS	62.50	37.50	0.24	0.66
		Control	70.21	29.79		
	Female	Total MS	69.67	30.33	0.12	0.40
		RR MS	77.63	22.37	0.78	0.99
		SP MS	46.15	53.85	0.00	0.00
		PP MS	72.73	27.27	0.28	0.73
		SP+PP MS	58.33	41.67	0.00	0.00
		Control	79.25	20.75		

جدول (۳): ژنوتیپی در گروه بیمار و افراد سالم در اسنیپ rs11567685

SNP	Type	Cohort	Genotypes Maj./Maj. %	Genotypes Maj./Min. %	Genotypes Min./Min. %	P-Value	P-Value Bonferroni Corrected
Rs11567685  Maj. Allele : T Min. Allele : C	Total	Total MS	49.43	37.93	12.64	0.32	0.78
		RR MS	59.18	30.61	10.20	0.99	1
		SP MS	15	60	25	0.00	0.00
		PP MS	60	30	10	1	1
		SP+PP MS	37.50	45	17.50	0.00	0.00
		Control	60	30	10		
	Male	Total MS	50	30.77	19.23	0.45	0.90
		RR MS	54.55	18.18	27.27	0.00	0.00
		SP MS	14.29	57.14	28.57	0.00	0.00
		PP MS	66.67	22.22	11.11	0.12	0.40
		SP+PP MS	43.75	37.50	18.75	0.32	0.78
		Control	53.19	34.04	12.77		
		<b>Total MS</b>	<b>49.18</b>	<b>40.98</b>	<b>9.84</b>	<b>0.05</b>	<b>0.18</b>

Female	RR MS	60.53	34.21	5.26	0.43	0.89
	SP MS	15.39	61.53	23.08	0.00	0.00
	PP MS	54.55	36.36	9.09	0.24	0.66
	SP+PP MS	33.33	50	16.67	0.00	0.00
	Control	66.04	26.41	7.55		

RR MS=Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis, SP MS=Secondary Progressive Multiple Sclerosis, PP MS=Primary Progressive Multiple Sclerosis

## بحث

مالتیپل اسکلروزیس به عنوان یک بیماری التهابی مزمن با منشأ خودایمنی شناخته می شود که با تخریب میلین آسیب و تحلیل اکسونی بر سیستم عصبی مرکزی (CNS) اثر می گذارد. به عنوان شایع ترین علت ناتوانی عصبی مزمن که در جوانی یا میانسالی شروع می شود معرفی می شود. این بیماری به سه نوع تقسیم می شود: عود کننده بهبود پذیر (RR-MS)، پیش رونده اولیه (PP-MS) و پیش رونده ثانویه (SP-MS). تشخیص MS بر اساس ترکیبی از یک سری شواهد کلینیکی و پاراکلینیکی و تصویر برداری از پلاکها انجام می شود.

علی رغم آن که علت خویشاوندی MS از مدت ها شناسایی شد، خطرهای باز رخداد سیستماتیک تنظیمی سن برای خویشاوندان افرادی که مبتلا به MS بودند برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ (۳۲) منتشر شد. مطالعه های بعدی نشان دادند که خویشاوندان درجه ۱،۲،۳ بیماران مبتلا به MS دارای احتمال بیشتری برای ابتلا به MS دارند تا جمعیت های معمولی. مطالعه های در دوقلوها یک همگامی معنی داری در تک تخمی ها در مقایسه با دوقلوهای دوتخمی نشان داد (۳۵، ۹، ۲۴، ۱۴، ۳۰). برای خواهر برادرهای ناتنی خطر حداکثر نصف خطر برای خواهر برادرهای تنی می باشد، خواه اینها با یکدیگر بزرگ شده باشند خواه جدا از هم بزرگ شده باشند (۱۰، ۳۱). روی هم رفته این اطلاعات پیشنهاد می کنند که زندگی کردن با افرادی که مبتلا به MS هستند، تنها خطر ابتلای شما به MS را زیاد می کند، اگر شما خویشاوند آن شخص باشید، در این صورت خطر شما با درجه خویشاوندی افزایش می یابد. در MS و دیگر بیماری های خودایمن مسیره های مشترکی در پاتوژنز دخالت دارند. فعال شدن سلول های T می تواند به دلیل پروتئین های خودی و پاتوژن ها باشد. فعال شدن لنفوسیت ها در نتیجه همولوژی توالی یا ساختار پاتوژن ها با پروتئین های خودی CNS فرضیه (تقلید مولکولی<sup>۲</sup>) مولکولی<sup>۳</sup>) نامیده می شود (۱۷).

تجسس در میان SNPها دو نوع ضروری از مطالعه های را تحت پوشش قرار می دهد: یافته های ژن کاندید و مطالعه های هم بستگی گسترده ژنومی (GWAS). در ژن کاندید، با توجه به فرآیند و مکانیسم بیولوژی بیماری، ژن هایی خاص که محصول آنها در فرآیندهای التهاب، تحلیل عصبی و خودایمنی نقش دارند انتخاب می شدند و بررسی های لازم روی آن انجام می شد ولی اکنون امکان GWAS وجود دارد (۱۶). در مطالعه های هم بستگی، ایده اصلی شناسایی تفاوت های موجود در ترکیب ژنتیکی گروه های مستقل بیمار و کنترل است و هدف آن تعیین تفاوت ها در فراوانی آلل های پلی مورفیسم در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل است. در دو سال گذشته اکتشافات چشم گیری در جستجو برای ژن های خطر جدید به وجود آمد. از دلایل اصلی برای این روند می توان به شرح تکنیک های جدید، روش های آماری پیشرفته و آگاهی از آن که هیچ چیز نمی تواند بدون همکاری های گسترده بین المللی حل شود که متشکل از اطلاعات حاصل از تعداد بالایی از افراد بیمار می باشد اشاره کرد.

انواع متفاوت پلی مورفیسمها در ژنوم شامل: پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs)، پلی مورفیسم های تکراری، حذف و اضافه شدن می باشد. به عنوان نتیجه، اینها را می توان به عنوان دلیل اصلی تنوع های فنوتیپی بیماری دانست. SNP های غیر مشابه، آمینواسیدهای رشته ها را تغییر می دهند یا موجب متوقف شدن کدون های مسئول هم بستگی های بیش تر بیمارهای شناخته شده می شود و به صورت هدف هایی با تقدم بالا در جستجوی ژن کاندید فرض شده اند. اگرچه هیچ تغییر اسید آمینه به عنوان نتیجه پلی مورفیسمها اتفاق نمی افتد، عملکرد ژن می تواند هم چنان توسط تغییرهایی در پایداری mRNA، به هم متصل کردن mRNA یا جای گیری mRNA تغییر شکل بدهد (۳۳). پیشرفت در تکنولوژی های طیف گسترده تعیین ژنوتیپ و نقشه های SNP انبوه کننده باعث پیشرفت مسیره های جدید در تعیین ژن هایی که دارای پتانسیل بزرگ تری برای دخالت در پاتوژنز MS هستند می شود (۲۶).

### 3-Molecular Mimicry

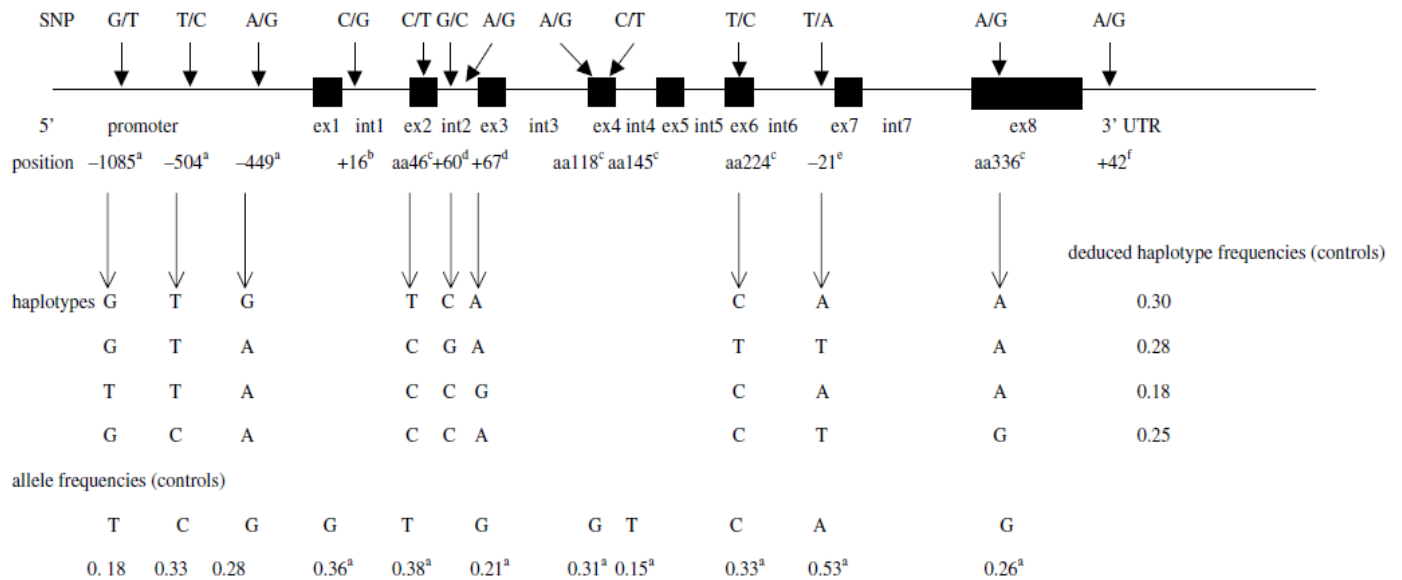
وجود دارد که تأثیرهای این واریانت روی سیگنال دهی IL7 با برخی دیگر به صورت اپی فونمون باشد که هنوز عملکرد آزمون نشده از این ژن ارتباط بیشتری با مستعد بودن دارد. بنابراین، IL7R اولین همبستگی غیر MHC را در MS به اثبات رساند.

مقدار IL7Ra که توسط لنفوسیت بیان می شود دو اثر دارد: اول، اثر درونی بر سلول تولید کننده یعنی بیان بالاتر گیرنده در سطح سلول منجر به دریافت بیش ترسیگنال IL7 شده و بقاء و تکثیر سلول افزایش می یابد. دوم، اثر خارجی که در آن مصرف بیش تر IL7 باعث بیان بالاتر گیرنده آن می شود که به تدریج به کاهش سطح IL7 در محیط و سلول های مجاور می انجامد که در پی آن بقاء و تکثیر آن را کاهش می دهد. پس از مواجهه با IL7 سلول های T به طور موقت بیان IL7Ra را کاهش می دهند تا از مصرف بی رویه IL7 جلوگیری و تعادلی در مصرف برای همه سلول ها فراهم شود (۲۸).

در مطالعه هایی که انجام شد ۱۳ اسنیپ در نواحی مختلف این ژن شناسایی شد و همبستگی آن ها با MS بررسی شد که در میان آن ها سه اسنیپی که در ناحیه پروموتری قرار دارند به علت نقش عملکردی که دارا هستند دارای اهمیت بیشتری نسبت به بقیه بودند که SNP rs11567685 جزء این ها می باشد (۳۴). ۳ تا SNP در ناحیه پروموتری می باشد، ۵ تا در اگزون ها، ۴ تا در اینترون ها و یکی در منطقه ترجمه نشده 3' می باشد که نمای شماتیکی این ها در زیر آورده شده است (شکل ۲).

اینترلوکین ۷ در سال ۱۹۸۸ توسط نامن و همکاران به عنوان یک فاکتور رشد از سلول های استرومایی جدا گردید. این سایتوکاین به عنوان عاملی که در کشت مغز استخوان قادر به القا تکثیر سلول های پیش ساز B موش است، شناخته و سپس به نام لنفوپوئین یک موسوم شد سپس مشخص شد که این ماده دارای طیفی از فعالیت های زیستی است و برای بقا و هموستاز سلول های T ضروری است و نام آن به اینترلوکین ۷ تغییر یافت (۲۳).

این گیرنده متشکل از دو بخش ساختاری است: IL7Ra (یا CD127) و  $\gamma c$  (یا CD132) که وجود هر دو بخش برای انتقال سیگنال و تأثیر IL7 ضروری است. دومین داخل سلول IL7Ra و  $\gamma c$  به ترتیب به تیروزین کیناز JAK1 و تیروزین کیناز JAK3 متصل است.  $\gamma c$  به صورت یکنواخت و در سطح همه سلول های هماتوپوئیک بیان می شود ولی IL7Ra به تنهایی توسط سلول های رده لنفوئیدی بیان می شود و لذا در خون تنها بر سطح سلول های بالغ لنفوسیت T دیده می شود (۱۹). بنابراین شناسایی IL7Ra در سطح سلول نشان دهنده اتصال IL7 و سیگنال رسانی پس از آن است. همچنین زیر واحد L7Ra همراه زیر واحد دیگری در TSLP ها نقش گیرندگی دارد. این کمپلکس گیرنده در بلوغ و فعال سازی سلول های دندریتی اهمیت داشته و سطح کاهش یافته آن با بیماری کرون که نوعی بیماری ایمنی است ارتباط دارد (۲۸). ژن IL7Ra با ۲۰ Kbp اندازه واقع در 5p13 و ۸ اگزون دارد. همانند دیگر اعضا خانواده گیرنده های هماتوپوئین IL7Ra گلیکوپروتئین غشایی نوع I است که فولدینگ ویژه و وجود موتیف Trp-Ser-X-TRP-Ser آن را مناسب اتصال به سایتوکاین های ماریپچ آلفا نموده است. دومین خارج سلولی ۲۲۰ اسید آمینه ای این گیرنده در قسمت هایی همولوژی بالایی با دیگر گیرنده های این خانواده دارد. ناحیه ۲۵ اسید آمینه ای غشایی و ناحیه ۱۹۵ اسید آمینه ای دم سیتوپلاسمی در فعال سازی مولکول های سیگنال داخل سلولی نقش مهمی دارند. فرم بالغ این گیرنده شامل ۴۳۹ اسید آمینه با وزن مولکولی 49.5KD است بر اساس وجود یا حذف این ناحیه غشایی دو ایزوفرم غشایی و محلول از گیرنده وجود دارند (۱۲). این مشاهده ها پیش بینی می کنند که سیگنال دهی IL7 در MS باید معیوب باشد، مشاهده ای که به صورت مستقل به اثبات رسید (۶). به صورت کلی، چرای این که معیوب بودن سیگنال دهی IL7R موجب افزایش خطر پیشرفت MS می شود، هنوز ناشناخته مانده است و البته این امکان همواره



شکل ۲. نمای شماتیکی ۱۳ اسنیپ یافت شده بر روی ژن اینتر لوکین ۷.۳ تا SNP در ناحیه پروموتری می باشد، ۵ تا در اگزون ها، ۴ تا در اینترون ها و یکی در منطقه ترجمه نشده ۳' می باشد (۳۴).

تجزیه تحلیل هاپلوتایپی که توسط گروه Stewart (محافظت کننده) نامیده می‌شد (Hap4) که توسط SNP rs11567685 (مشخص می‌شود) به طور اختصاصی بیان بالاتری از CD127 بر روی تمام سلول‌های T CD4+ برای Hap4 بیماران مبتلا به MS با  $p=0.041$  را نشان می‌داد (۴).

اگر تغییر آلی در محل یک اسنیپ موجب ایجاد یا از بین رفتن جایگاه شناسایی یک آنزیم برشگر خاص شوند، با انجام یک PCR ساده می‌توان جهش را شناسایی کرد. پس از PCR، نمونه‌ها توسط آنزیم مربوطه هضم شده و سپس بر روی ژل آگارز مطالعه می‌شوند. اگرچه تاکنون صدها آنزیم برشگر شناسایی شده‌اند اما کمابیش تمام آن‌ها جایگاه‌های پالیندروم متقارن را شناسایی می‌کنند و بسیاری از جهش‌های نقطه‌ای در خارج از این مناطق روی می‌دهند. در محل اسنیپ rs11567685 دو آلل C و T وجود دارد که حضور آلل C موجب ایجاد جایگاه برشی برای آنزیم Pst I می‌شود. اندازه قطعه‌های برشی مورد نظر در صورت وجود آلل‌های مختلف برای اسنیپ rs11567685 در جدول ۴ فهرست شده‌اند.

در نتایج بررسی آنان برای اسنیپ 11567685 SNPrs فراوانی ژنوتیپی TT, TC, CC به ترتیب در جمعیت بیمار به صورت ۳۷، ۵۷ درصد و در جمعیت سالم به صورت ۴۳، ۳۹ و ۳۷ درصد با  $p=0.02$  است (۳۴). در مطالعه Booth و همکاران در سال ۲۰۰۵ نتایج تأییدی حاصل شدند به این صورت که در موارد بررسی سه تایی آلل T از اسنیپ 11567685 SNPrs به صورت معنی داری  $p=0.01$  در بیماران PP و آلل C در بیماران SP انتقال داشته است. اگرچه در بررسی ترکیبی این دو زیر گروه این نتایج حاصل نمی‌شوند که می‌توان دلیل آن را به هتروژن بودن بیماری و اثر آن بر بروز فنوتیپ‌های مختلف بیماری نسبت داد. بررسی هاپلوتایپی نیز اسنیپ‌های ناحیه رمزگذار aa336 و aa64 را به عنوان اسنیپ‌های نشانه الگوهای ویژه هاپلوتایپی معرفی می‌کنند (۲۴). بررسی SNP‌های ناحیه پروموتر برای مکان‌های اتصال فاکتور رونویسی با استفاده از برنامه نرم افزاری TRANSFAC نشان داد که مکان اتصال برای فاکتور هسته ای ۱ برای رشته‌ها حامل آلل نادر T -1085\_ می‌باشد ولی برای آلل G این طور نمی‌باشد و مکان فاکتور هسته‌ای برای سلول‌های T فعال شده و فاکتور POU-Tst- 1/Oct-6 برای رشته‌های حاوی آلل نادر G -449\_ می‌باشد ولی برای آلل A این طور نمی‌باشد (۳۲).



جدول ۴. قطعات حاصل از هضم آنزیمی

Size	Size	Size	Undigested	Gel	Temperature/Time	Enzyme	SNP
TT 113 3 53	CT 1133 902 232 53	CC 902 232 53	1186 bp	Agarose 1%	37°C/Overnight	Pst I	SNPrs11567685

معنی داری در زیرگروه بیمار SP+PP با  $P$ -value:  $0/02$  در فراوانی فنوتیپی و  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی ژنوتیپی وجود دارد.

فراوانی ژنوتیپی CC، TC و TT در جمعیت بیمار مرد به ترتیب  $19/23\%$ ،  $30/77\%$  و  $50\%$  و در جمعیت سالم به ترتیب  $12/77\%$ ،  $34/04\%$  و  $53/19\%$  با  $P$ -value:  $0/45$  می باشد. فراوانی آللی ژنوتیپ در جمعیت بیمار مرد برای آلل C  $34/62\%$  و آلل T  $65/38\%$  و در جمعیت سالم فراوانی آلل C  $29/79\%$  و برای آلل T  $70/21\%$  با  $P$ -value:  $0/46$  می باشد. میان فراوانی آللی و ژنوتیپی با بیماری MS در جمعیت مردهای خوزستانی این مطالعه همبستگی معنی داری یافت نشد اما همبستگی معنی داری در زیرگروه بیمار مرد SP با  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی فنوتیپی و  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی ژنوتیپی و هم چنین همبستگی معنی داری در زیرگروه بیمار مرد RR با  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی ژنوتیپی وجود دارد اما در فراوانی فنوتیپی زیرگروه بیمار مرد RR با  $P$ -value:  $0/32$  همبستگی معنی داری یافت نشد.

فراوانی ژنوتیپی CC، TC و TT در جمعیت بیمار زن به ترتیب  $9/84\%$ ،  $40/98\%$  و  $49/18\%$  و در جمعیت سالم به ترتیب  $7/55\%$ ،  $26/41\%$  و  $66/04\%$  با  $P$ -value:  $0/05$  می باشد. فراوانی آللی ژنوتیپ در جمعیت بیمار مرد برای آلل C  $30/33\%$  و آلل T  $69/67\%$  و در جمعیت سالم فراوانی آلل C  $20/75\%$  و برای آلل T  $79/25\%$  با  $P$ -value:  $0/12$  می باشد. میان فراوانی آللی با بیماری MS در جمعیت زن های خوزستانی در این مطالعه همبستگی معنی داری یافت نشد اما همبستگی معنی داری در میان فراوانی ژنوتیپی با بیماری MS در جمعیت زن های خوزستانی این مطالعه همبستگی معنی داری یافت شد. در زیرگروه بیمار زن SP همبستگی معنی داری با  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی فنوتیپی و  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی ژنوتیپی یافت شد. هم چنین همبستگی معنی داری در زیرگروه بیمار زن SP+PP با  $P$ -value:  $0/00$

در بررسی مشابهی که حیدری و همکاران (۲۲) بر روی جمعیت ساکن تهران در سال ۲۰۱۰ بر روی اسنیپ rs11567685 انجام دادند، فراوانی ژنوتیپی CC، TC و TT در جمعیت بیمار فراوانی به ترتیب  $9\%$ ،  $38\%$  و  $53\%$  و در جمعیت سالم فراوانی به ترتیب  $8\%$ ،  $44\%$  و  $48\%$  با  $P$ -value:  $0/68$  بود. فراوانی آللی ژنوتیپ در جمعیت بیمار برای آلل C  $28\%$  و آلل T  $72\%$  و در جمعیت سالم فراوانی آلل C  $30\%$  و برای آلل T  $70\%$  با  $P$ -value:  $0/75$  بود. میان فراوانی آللی و ژنوتیپی اسنیپ rs11567685 با بیماری MS در جمعیت ساکن تهران هیچ همبستگی معنی داری یافت نشد اما این محققین همبستگی معنی داری را در زیرگروه بیمار PP با  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی فنوتیپی و  $P$ -value:  $0/001$  در فراوانی ژنوتیپی یافتند.

در این بررسی که روی SNP rs11567685 انجام شده است، فراوانی ژنوتیپی CC، TC و TT در جمعیت بیمار به ترتیب  $12/64\%$ ،  $37/93\%$  و  $49/43\%$  و در جمعیت سالم به ترتیب  $10\%$ ،  $30\%$  و  $60\%$  با  $P$ -value:  $0/32$  می باشد. فراوانی آللی ژنوتیپ در جمعیت بیمار برای آلل C  $31/61\%$  و آلل T  $68/39\%$  و در جمعیت سالم فراوانی آلل C  $25\%$  و برای آلل T  $75\%$  با  $P$ -value:  $0/29$  می باشد.

برای اسنیپ SNPrs11567685 در هر دو گروه بیمار و سالم آزمون کای مربع با سطح معنی دار  $p \geq 0/05$  و درجه آزادی ۲ با نرم افزار SPSS v.22 محاسبه شد. نتایج هیچ گونه انحراف معنی داری از نسبت های پیش بینی شده در تعادل هاردی-واینبرگ نشان ندادند. بنابراین در این جمعیت و برای اسنیپ مورد نظر تعادل هاردی-واینبرگ صادق است.

میان فراوانی آللی و ژنوتیپی SNP rs11567685 با بیماری MS در جمعیت خوزستانی این مطالعه همبستگی معنی داری یافت نشد این بدان علت است که فراوانی آللی و ژنوتیپی در این SNP مستقل از بیماری هستند اما همبستگی معنی داری در زیرگروه بیمار SP با  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی فنوتیپی و  $P$ -value:  $0/00$  در فراوانی ژنوتیپی و هم چنین همبستگی

در فراوانی ژنوتیپی و  $P$ -value: ۰/۰۰ در فراوانی فنوتیپی وجود دارد .

## نتیجه گیری

هر ژن به تنهایی در حکم یک فاکتور مستعدساز تأثیر کوچکی بر ریسک ابتلا دارد بنابراین ژن‌های متعدد و متفاوت هر یک تأثیر اندک ولی مهم بر ریسک بیماری دارند. در جمعیت‌های مختلف مجموعه‌های ژنی متفاوت در مستعدسازی ابتلا به بیماری دخیل هستند و میزان هم‌پوشانی این ژن‌ها در جمعیت‌های متفاوت متغیر است. توزیع جغرافیایی ناهمگون بیماری نیز مؤید این مطلب است. در این مطالعه مشخص شد ناحیه پروموتری ژن  $IL7R\alpha$  دارای تأثیر معنی‌داری در بیماری MS می باشد بنابراین از این ناحیه ژنی می توان به عنوان یک بیومارکر در تشخیص زود هنگام MS استفاده کرد. بررسی هم‌بستگی چند شکلی‌های مورد مطالعه در حجم بزرگ‌تری از تعداد نمونه‌ها و نژادهای دیگر ایرانی برای به دست آوردن تصویر بهتر پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری در دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز به خاطر همکاری‌هایشان جهت انجام این مطالعه کمال قدردانی را دارند. از بیماران مبتلا به MS، افراد سالم و انجمن MS خوزستان به خاطر مساعدت و هم یاری‌شان سپاسگزاریم.

## منابع

1. Akkad DA, Hoffjan S, Petrasch-Parwez E, Beygo J, Gold R, Epplen JT. Variation in the IL7RA and IL2RA genes in German multiple sclerosis patients. *Journal of autoimmunity*. 2009;32(2):110-5.
2. Alcina A, Fedetz M, Ndagire D, Fernandez O, Leyva L, Guerrero M, Arnal C, Delgado C, Matesanz F. The T244I variant of the interleukin- 7 receptor- alpha gene and multiple sclerosis. *Tissue antigens*. 2008;72(2):158-61.
3. Allen IV. The pathology of multiple sclerosis-fact, fiction and hypothesis. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1981;7(3):169-82.
4. Broux B, Hellings N, Venken K, Rummens JL, Hensen K, Van Wijmeersch B, Stinissen P. Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes and immunity*. 2010;11(4):326-33.
5. Booth DR, Arthur AT, Teutsch SM, Bye C, Rubio J, Armati PJ, Pollard JD, Heard RN, Stewart GJ, Southern MS Genetics Consortium. Gene expression and genotyping studies implicate the interleukin 7 receptor in the pathogenesis of primary progressive multiple sclerosis. *Journal of molecular medicine*. 2005;83(10):822-30.
6. Cox AL, Thompson SA, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DA, Coles AJ. Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2005;35(11):3332-42.
7. Dean G. How many people in the world have multiple sclerosis?. *Neuroepidemiology*. 1994;13(1-2):1-7.
8. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(6):1507-16.
9. Ebers G.C., Bulman D.E., Sadovnick A.D., Paty D.W., Warren S., Hader W. A 581 population-based study of multiple sclerosis in twins, *N Engl J. Med*. 1986; 315 (26): 1638–1642.
10. Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *The Lancet*. 2004 ;363(9423):1773-4.
11. Fernald GH, Yeh RF, Hauser SL, Oksenberg JR, Baranzini SE. Mapping gene activity in complex disorders: Integration of expression and genomic scans for multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2005;167(1):157-69.
12. Fry TJ, Mackall CL. Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood*. 2002 ;99(11):3892-904.
13. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R. Interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2007 ;39(9):1083-91.

14. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Multiple sclerosis*. 2005;11(5):504-10.
15. Hillert J. Human leukocyte antigen studies in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1994;36(S1):S15-7.
16. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(2):95-108.
17. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *International review of neurobiology*. 2007;(31) 79:127-47.
18. Lundmark F. Genetic analysis of IL7R and other immune-regulatory genes in multiple sclerosis. *Institutionen för klinisk neurovetenskap/Department of Clinical Neuroscience*; 2007.
19. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(2):144-54.
20. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50:121-127.
21. McKay FC, Swain LI, Schibeci SD, Rubio JP, Kilpatrick TJ, Heard RN, Stewart GJ, Booth DR. Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2008;9(1):1-6.
22. Moones Heidari, Mehrdad Behmanesh, and Mohammad-Ali Sahraian. Variation in SNPs of the IL7Ra Gene is Associated with Multiple Sclerosis in the Iranian Population. *Immunological Investigations*, 00:1-11, 2011 .
23. Morrissey PJ, Goodwin RG, Nordan RP, Anderson DI, Grabstein KH, Cosman DA, Sims JO, Lupton ST, Acres BR, Reed SG. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169(3):707-16.
24. Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*. 1994;44(1):11.
25. Neumann H. Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Current opinion in neurology*. 2003;16(3):267-73.
26. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nature Reviews Genetics*. 2008 ;9(7):516-26.
27. Ramagopalan SV, Anderson C, Sadovnick AD, Ebers GC, Matesanz F. Genomewide study of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2199-200.

28. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology*. 2005;6(5):507-14.
29. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33.
30. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Party DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murraray TJ, Seland TP. A population- based study of multiple sclerosis in twins: update. *Annals of neurology*. 1993;33(3):281-5.
31. Sadovnick AD, Dyment DA, Ebers GC, Risch NJ, Canadian Collaborative Study Group. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. *The Lancet*. 1996;347(9017):1728-30.
32. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American journal of human genetics*. 1993;52(3):506.
33. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(5):391-7.
34. Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RN, Stewart GJ. Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor- $\alpha$  gene and their associations with multiple sclerosis. *European journal of human genetics*. 2003;11(7):509-15.
35. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(22):12877-82.
36. Bowling AC, T Jock Murray MS, Noseworthy JH, Polman CH, Thompson AJ. *Multiple sclerosis: the guide to treatment and management*. Demos Medical Publishing; 2006.
37. World Health Organization, *Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008* .
38. Zhang Z, Duvefelt K, Svensson F, Masterman T, Jonasdottir G, Salter H, Emahazion T, Hellgren D, Falk G, Olsson T, Hillert J. Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. *Genes and immunity*. 2005;6(2):145-52.

