مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و پنجم - زمستان ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی بیان ژن CD95 Ligand (CD95L) در بیماران ایرانی مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (MS) در مقایسه با گروه شاهد

عاطفه فراز [*1]، آرزو صیاد [2]، رضا یاری [1]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری مولتیپل اسکلروزیس از رایج ترین بیماری های التهابی سیستم اعصاب مرکزی است. در افراد بیمار، اختلال در مسیر آپوپتوز وجود دارد که این باعث می شود سلول های T بیش فعال، آپوپتوز نشده و وارد جریان خون شوند. در میان ژن های مرتبط با بیماری مذکور، ژنی به نام CD95L وجود دارد که در مسیر آپوپتوز نقش ایفا می‌کند.

مواد و روش ها: در این مطالعه از ۳۰ نفر بیمار مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و ۳۰ فرد سالم که از لحاظ جنسیت و سن به طور کامل همسان سازی شده اند، انتخاب شده است. ابتدا از افراد با رضایت کامل خون گرفته شد. سپس RNA کل استخراج و cDNA سنتز شد. با استفاده از روش Real-Time PCR و ژن مرجع HPRT1، بیان ژن CD95L سنجیده و نتایج حاصل به کمک نرم افزار های Linreg و Rest آنالیز شد.

یافته ها: بیان ژن CD95L در افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس در مقایسه با افراد سالم کاهش معنی داری نشان نداد (P Value: ۰/۱۹۷). هم چنین در بین دو جنس زن و مرد هم کاهش معنی داری مشاهده نشد (P Value(M): ۰/۱۴۲)، (P Value(F): ۰/۱۵۶).

بحث: مطالعه بیان این ژن در بیماران ایرانی می تواند حایز اهمیت باشد چرا که نشان می دهد ، ژنتیک نقش مهمی در ایجاد و پیشرفت بیماری MS بازی می کند.

نتیجه گیری: از لحاظ آماری در این مطالعه، بیان ژن CD95L در بیماران مولتیپل اسکلروزیس نسبت به افراد سالم تفاوت معنی داری نشان نداد.

کلمات کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، بیان ژن، CD95L

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس یا MS[1] از رایج ترین بیماری-های التهابی سیستم اعصاب مرکزی (CNS[2]) می باشد. یک بیماری ناتوانی مزمن که بیش‌تر، افراد بین ۲۰-۴۰ سال را مبتلا می کند(۱۸). MS دارای چندین زیرگروه می باشد: Relapsing-remitting (RRMS) که شایع ترین فرم بوده و افراد در دوره‌های مختلف برگشت بیماری را دارند. Secondary Progressive (SPMS) بیماری ثانویه پیش رونده، زمانی است که به دنبال RR یک سیر پیش رونده اتفاق بیفتد. Primary Progressive (PPMS) بیماری اولیه پیش رونده که از ابتدای ظهور تخریب عصبی دیده می شود. ۱۵٪ افراد مبتلا این فرم را تجربه می نمایند. Progressive-relapsing (PRMS) بیماری عود کننده پیش رونده که نوع نادر می باشد (۱۴). MS با یک التهاب اتوایمیون به اجزا غلاف میلین آغاز می‌شود. بیماری اغلب با یک حمله ناگهانی که از چند روز تا چند هفته طول می‌کشد آغاز می شود سپس وارد مرحله بهبود می شود که چند ماه تا چندین سال به طول می انجامد. این فاز عود- بهبود گاهی ۵ تا ۱۰ سال طول می‌کشد، سپس وارد مرحله پیش رونده ثانویه می‌گردد و در این مرحله حمله‌های مجزا نادر هستند (۲۰).

نویسنده مسئول :
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
پست الکترونیکی:atefefaraz@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۰۱/۳۰

1 Multiple Sclerosis
2 Central nervous system

تشخیص بیماری MS اغلب کلینیکی است. به خصوص در هنگامی که عود بیماری در زمان‌های مختلف مشاهده می‌شود. با این وجود هم تست های آزمایشگاهی و هم یافته های حاصل از MRI به تشخیص قطعی کمک می کند. از ویژگی-های پاتولوژیکی این بیماری می توان به این موارد اشاره نمود: التهاب که اصلی ترین تحریک کننده آسیب CNS می باشد. تخریب غلاف سلول‌های عصبی و از بین رفتن میلین که پلاک‌هایی ایجاد می نماید که مشخصه MS می باشند. از دست رفتن اکسون ها، واکنش آستروسیت ها به آسیب های وارد شده است (۴). در همه نقاط دنیا بیماری MS وجود دارد ولی آنچه مسلم است در شمال اروپا، کانادا، آمریکا، استرالیا، خیلی بیش تر از مناطق دیگر دیده می شود. تحقیق‌ها نشان می دهد که عوامل نژادی و قومی یکی از عوامل مهم در تعیین خطر ابتلا به MS محسوب می شود (۱۱). شیوع این بیماری در خانم ها بیش‌تر و پیش آگهی آن نیز بهتر است. خانم ها بیش‌تر به نوع RRMS مبتلا می‌شوند در حالی که جنس مذکر بیش‌تر به نوع پیش رونده مبتلا می‌شود که پیش آگهی ضعیفی دارد (۱۶). یک سری از بیماری های عفونی به خصوص عفونت های ویروسی در بیماری MS مورد مطالعه قرار گرفتند. با این حال مهم ترین کاندید در این بیماری ویروس EBV یا اپشتین بار است. در مطالعه هایی که در این زمینه صورت گرفته مشخص شده است که افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد کنترل به طور معنی داری بیش‌تر به ویروس EBV آلوده شده اند (۲). یکی از عوامل مهم در بیماری MS تأثیر ویتامین D می باشد. تحقیق‌ها نشان داده-اند که میزان تابش طولانی مدت آفتاب با استعداد ابتلا به MS رابطه معکوس دارد و افزایش جذب ویتامین D احتمال بروز MS را کاهش می‌دهد (۷،۱۰،۱۵).

در میان ژن هایی که به نحوی با این بیماری مرتبط هستند، ژنی به نام CD95L وجود دارد. نام دیگر ژن CD95L، FASL می باشد که عضو دسته ششم سوپر فامیلی TNF[3] می باشد. Fas و لیگاند آن هر دو پروتئین‌های سراسری غشایی می باشند. واکنش بین Fas و لیگاند آن نقطه مهمی برای آغاز آپوپتوز در بعضی از انواع سلول ها هم چون لنفوسیت ها می‌باشد. نقص در این ژن می‌تواند با بیماری های اتوایمیون مانند لوپوس و مولتیپل اسکلروزیس ارتباط داشته باشد(۱). Fas-L به شدت بر روی سلول‌های گلیال در بسیاری از پلاک های MS مزمن وجود دارد و اینکه سلول های ماده سفید در اغلب مواقع حامل گیرنده هایی برای این سیتوتوکسین هستند که آن‌ها را برای حمله، حساس می-سازند و این موضوع با بررسی های قطعه بندی DNA و استقرار هم‌زمان Fas-L مشخص شده است. در بیماران MS یعنی افرادی که مغز آن‌ها دچار التهاب شده اند سلول های حاوی لیگاند FAS به تعداد بیش‌تری نسبت به افراد سالم وجود دارند (۵). CD95L یکی از سیستم‌های حیاتی لیگاند - رسپتور مرگ در مرگ سلولی به واسطه فعال شدن یا AICD[4] است. در سال های اخیر بسیاری از مؤلفان گزارش کرده اند که T cell بیماران ام اسی نسبت به سلول های گرفته شده از افراد سالم به آپاپتوزیس میانجی شده توسط CD95 مقاوم‌تر است. این کاهش حساسیت در ام اس تا حدی به خاطر اختلال در مسیرهای آپوپتوزیسی CD95 است (۶). از آنجایی که Fas و FasL در مسیر آپوپتوز می‌توانند نقش داشته باشند و جهش های از دست دهنده عملکرد آن‌ها باعث کاهش آپوپتوز در سلول‌های هدف می‌شود، در نتیجه در این تحقیق بر آن سعی شده است که سطح بیان ژن FasL را در بیماران MS نسبت به افراد سالم، مورد بررسی قرار شده، فرض شده ژن CD95L در مبتلایان به اسکلروزیس چندگانه دارای بیان کاهش یافته است.

مواد و روش ها

۳۰ فرد بیمار مبتلا به MS بر اساس معیار هایMcDonald توسط متخصص مغز و اعصاب تشخیص داده شدند. هم چنین ۳۰ فرد سالم از نظر بیماری MS و بدون سابقه فردی یا خانوادگی بیماری اتوایمیون و همسان سازی شده از نظر جنسیت و سن با گروه بیمار، به طور تصادفی انتخاب شدند. سن شروع بیماری به طور میانگین ۲۶/۱ سال بود و مدت بیماری به طور میانگین ۵/۲ سال بوده است. در مورد توزیع جنسیتی، از ۳۰ بیمار مبتلا به MS ۲۰ نفر زن و ۱۰ نفر مرد و ۳۰ نفر گروه کنترل شامل ۲۰ نفر زن و ۱۰ نفر مرد بودند.

3 Tumor necrosis factor

4 Activation-Induced Cell Death

دو گروه از نظر توزیع جنسیتی مطابق آزمون نسبیت در تطابق بودند. این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی دارای تائیدیه به شماره ۱۳۹۳-۱-۹۱-۱۳۳۳۴ می‌باشد. بعد از اینکه از افراد خون گیری به عمل آمد، از طریق کیت GeneAll، RNA کل از گلبول های سفید خون استخراج گردید. تبدیل RNA به cDNA برای انجام RT-PCR صورت گرفت و از کیت سنتزی شرکت Thermo Scientific استفاده شده است. طراحی پرایمر برای ژن مورد نظر و ژن های خانه دار (کنترل داخلی) با کمک نرم افزارAllele ID v.7.82 انجام شد، از آنجایی که قرار بود این پرایمر ها برای RT-PCR استفاده شوند،به صورت Exon-Exon junction طراحی شدند(جدول ۱).

جدول۱: توالی پروب ها و پرایمر های طراحی شده جهت انجام qRT-PCR ژن HPRT1 و CD95L

Gene	Sequence	Length Bp	Tm	Product bp
CD95L	F: ATGCACACAGCATCTTTGG R: ATGGGCCACTTTCCTCAGCT Probe: 5'Fam-AAGCAAATAGGCCACCCCAGTCCACC-TAMRA3'	19 20 26	60/3 60/5 71	96
HPRT1	F: AGCCTAAGATGAGAGTTC R: CACAGAACTAGAACATT Probe: 5'Fam-CATCTGGAGTCCTATTGACATCGC-TAMRA3'	18 21 24	59/1 59 69	88

برای انجام Real-time PCR در این مطالعه از کیت Applied Biosystems (ABI) استفاده شد. مرحله ازدیاد با ۴۰ سیکل انجام شده است و چون از روش TaqMan Real-time استفاده شده و دو مرحله ای می باشد، شرایط دمایی مشخص است.

برای آنالیز داده های Real-time PCR از دو نرم افزار LinReg و REST استفاده شد. ایده به کار رفته در برنامه LinReg برگرفته از شرکت کیاژن است. نسخه مورد استفاده در اینجا LinReg PCR V.2013 می‌باشد. REST یک نرم افزار استانداردی است که افزایش و کاهش بیان ژن ها را برای مطالعه بیان ژنی تخمین می‌زند.

یافته ها

در این مطالعه داده های خام واکنش پس از تعیین کارایی PCR و تعیین سطح پایه به وسیله نرم افزار LinReg وREST آنالیز شدند، که نتایج در زیر آورده شده است. ژن HPRT1 به عنوان ژن (REF) مرجع انتخاب شده و ژن CD95L یا همان ژن(TRG) هدف، کاهش بیان به میزان ۰/۸ را نشان می‌دهد که این کاهش بیان بعد از تعیین ارزش P که به میزان ۰/۷ به دست آمد، معنی دار نمی باشد. کارایی این واکنش ها برای هر یک از ژن های REF و TRG به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۶ می‌باشد(جدول۲).

جدول۲: داده های نرم افزار REST در مقایسه ۲ گروه بیماران MS و شاهد سالم

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std.Error	95%C.I	$P(H_1)$	Result
HPRT1	REF	0/8541	1/000	0	0/008-	0/197	
CD95L	TRG	0/8644	0/732	0/130-5/060	28/601		

ژن HPRT1 به عنوان ژن مرجع (REF) انتخاب شده که در نمودار تکثیر ژن HPRT1، ct نمونه ها (بیمار و کنترل)، ۱۷، ۱۶/۷، ۱۶/۵ می باشد و ژن CD95L یا همان ژن هدف (TRG) است که در نمودار تکثیر ژن CD95L، ct نمونه ها (بیمار و کنترل)، ۲۴/۷، ۲۴، ۲۳/۹ است و ژن CD95L در گروه مردان به میزان ۰/۸۱۵ و در گروه زنان به میزان ۰/۸۳۴ کاهش بیان را نسبت به ژن HPRT1 نشان می دهد. ارزش P درمردان ۰/۶ و در زنان ۰/۷ می باشد که کاهش معنی داری را نشان نمی دهد(جدول۳).

جدول۳: داده های نرم افزار REST بر اساس تفکیک جنسیت

	Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I	$P(H_1)$	Result
In male	HPRT1	REF	0/852	1/000	0/141-6/212	0/005-23/5	0/142	-
	CD95L	TRG	0/783	0/715				
In female	HPRT1	REF	0/878	1/000	0/127-5/160	0/006-25/506	0/156	-
	CD95L	TRG	0/788	0/734				

بحث

در سال های اخیر بسیاری از دانشمندان فعال در این زمینه نشان داده اند که سلول های T در بیماران MS نسبت به آپوپتوز به واسطه CD95 مقاومت بیش‌تری نشان می دهند و این مقاومت یا کاهش حساسیت نسبت به CD95 ناشی از تداخل در مسیر های آپوپتوزی CD95 می باشد (۳،۸،۹،۱۷،۱۹).

Li- Weber و همکاران در سال ۲۰۰۳ تلاش کردند تا نقش CD95/ CD95L را در سیستم ایمنی مشخص کرده و به خصوص سیگنال و عوامل رونویسی (NF-، Egr، NF-AT، ALG-4، SP-1، IRFs، Nur77، c-Myc، AP-1، κB، CIITA، RoRγt) را که بر بیان CD95L تأثیر گذارند، مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها مرور کاملی از عوامل رونویسی

ارائه دادند و نتیجه گیری کردند که مطالعه نحوه بیان ژن CD95L برای درمان بیماری های وابسته به CD95/CD95L الزامی است (۱۲).

Lopatinskaya و همکاران در سال ۲۰۰۶ سطوح mRNA ژن‌های TNF-α، IL-12p35، IL-2p40، IL-4، IL-10، TGF-β1، CCR3، CXCR3، CCR5، Fas و FasL را در سلول‌های تک هسته‌ای خونی محیطی (PBMC) ۲۵ بیمار مولتیپل اسکلروزیس (MS) با Real-Time PCR اندازه گیری کردند. نتایج آن ها نشان داد که آپوپتوز به واسطه Fas نقش مهمی را در پیشرفت بیماری MS بازی می‌کند (۱۳).

پیچیدگی های زیاد این مسیر و نتایج ضد و نقیض در گذشته، تحقیق های در این زمینه را با چالش های بسیاری مواجه می‌کند. به هرحال، یافتن ژن های مهم تأثیرگذار در ایجاد بیماری یا پیشرفت آن می‌تواند در نهایت به بحث تشخیص یا درمان بیماری کمک کند. در مطالعه حاضر، بیان ژن CD95L را در سلول های لنفوسیت T خون، در ۳۰ بیمار MS و ۳۰ فرد سالم به عنوان کنترل با تکنیک Real-Time PCR بررسی نمود. مطالعه Matched Case-control بوده است، چون افراد بر اساس سن و جنسیت همسان سازی شده اند. تکنیک Real-Time PCR به کار رفته در مطالعه، تکنیک بسیار حساسی بوده و دارای تکرارپذیری (Reproducibility) بالایی است اما نکته قابل ذکر این‌که همیشه تغییر های بیان در سطح RNA نمی تواند نشان دهنده تغییر های در سطح پروتئین باشد. به همین دلیل می‌توان به مطالعه پروتئین CD95 در بیماران و افراد سالم پرداخت. در این مطالعه ، پروب های طراحی شده برای تکنیک Real-Time PCR می‌توانند همه واریانت های ژن را در برگیرند و این نکته نیز بسیار حایز اهمیت است تا همه واریانت ها در صورتی که در پاتوژنز بیماری نقش دارند، مورد بررسی قرار گیرند. در فرضیه طرح، فرض شد که بیان ژن در بیماران MS کاهش نشان می دهد. این فرض می تواند منطقی باشد چون ژن CD95 موجب آپوپتوز می گردد و در بیماران MS، سلول های T دچار نقص در آپوپتوز هستند. در این مطالعه بیان ژن CD95L در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد نرمال تفاوت معنا داری نشان نداد (P ۰/۱۹۷ =Value).

هم‌چنین بیان این ژن در مردان و زنان نیز تفاوت معنا داری نداشت. P Value(F)= ۰/۱۵۶، P ۰/۱۴۲ =value(M) .

برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ Dowling و همکاران بیان ژن CD95L را در بیماران MS با افراد کنترل غیرالتهابی مقایسه کردند. آن‌ها با کمک تکنیک ایمونوهیستوشیمی در ماده سفید مغز بیماران بیان بالاتر این ژن را در دو بیمار با زخم های حاد و ۱۲ بیمار از ۱۶ نفر با MS مزمن نسبت به افراد کنترل نشان دادند(۵). در این تکنیک از آنتی بادی اختصاصی بر علیه ژن استفاده می‌شود. تفاوت مشاهده شده در این مطالعه می‌تواند به واسطه تفاوت های تکنیک های آزمایشگاهی باشد. Gomes و همکاران در سال ۲۰۰۳ با کمک تکنیک Real- Time PCR نشان داده اند که در سلول‌های تک هسته ای محیطی خون در بیماران RRMS بیان ژن CD95L افزایش نشان می دهد. آن‌ها ۴۲ بیمار MS را با ۳۲ فرد سالم مقایسه کردند. هم چنین بعد از گروه-بندی بیماران به دسته های(Relapsing-Remitting) RR و SP(Secondary-Progressive) نشان دادند بیان ژن CD95L هم چنان افزایش می‌یابد (۶).

نکته جالب توجه این است که آن‌ها به القای آپوپتوز در سلول‌های حساسی مانند سلول های اندوتلیال در مغز در سد مغزی- خونی اشاره می‌کنند و در این حالت ورود سلول‌های T پاتوژن از خون محیطی به CNS می تواند تسهیل شود و بیان ژن CD95L با سن هیچ گونه هم بستگی نشان نداد. آن ها بیماران و افراد کنترل را یکسان سازی (Match) نکردند در حالی که در مطالعه ما بیماران و افراد سالم از نظر سن و جنس یکسان سازی شده‌اند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه کنونی بیانگر عدم تفاوت معنی دار بیان ژن CD95L در بیماران MS نسبت به افراد سالم است و می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که شاید سطح بیان ژن CD95L تاثیر مهمی در این بیماری نداشته باشد و اگر بتوان نمونه ها را در نمونه آماری بزرگتر و در زیر گروه های دقیق تری تقسیم بندی نمود، ممکن است در برخی از این زیرگروه-

ها و در مقایسه گروهی از بیماران MS با افراد سالم تفاوت معنی داری در سطح بیان این ژن مشاهده شود.

به هر روی پیشنهادات ذیل مطرح می‌شود:

۱- نمونه های مورد بررسی افزایش داده شد تا بتوان آنالیز آماری دقیق تری انجام داد. ۲- تقسیم بندی بیماران به زیرگروه های پاسخ دهنده به درمان و غیر پاسخ دهنده به درمان. ۳- پس از افزایش چند برابری تعداد نمونه ها آن ها را براساس میزان EDSS، سن شروع بیماری و شدت بیماری تقسیم بندی شد ۴- بیان ژن CD95L را در سطح پروتئین بررسی شد.

سپاسگزاری:

در این مطالعه از زحمات بی دریغ اساتید محترم سرکار خانم دکتر صیاد و جناب آقای دکتر یاری و دانشجوی محترم آقای طاهری کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

۱. ابوالعباس، ک. ۱۳۸۰. ایمونولوژی سلولی و مولکولی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

2. Ascherio, A., Munger, K.L., 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. Ann. Neurol. 61, 288–299..

3. Comi, C., Fleetwood, T., Dianzani, U., 2012. The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity. Autoimmun.
Rev., Evidence-Based Laboratory Medicine 12, 150–156.

4. Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br. J. Pharmacol. 164, 1079–1106.

5. Dowling, P., Shang, G., Raval, S., Menonna, J., Cook, S., Husar, W., 1996. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. J. Exp. Med. 184, 1513–1518.

6. Gomes, A.C., Jönsson, G., Mjörnheim, S., Olsson, T., Hillert, J., Grandien, A., 2003. Upregulation of the apoptosis regulators cFLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing–remitting multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 135, 126–134.

7.Holick, M.F., 2007. Vitamin D deficiency. N. Engl. J. Med. 357, 266–281.

8. Huang, D.C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., Strasser, A., 1999. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 14871–14876.

9. Ichikawa, H., Ota, K., Iwata, M., 1996. Increased Fas antigen on T cells in multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 71, 125–129.

10. Kakalacheva, K., Lünemann, J.D., 2011. Environmental triggers of multiple sclerosis. FEBS Lett. 585, 3724–3729.

11. Kurtzke, J.F., 1980. Geographic distribution of multiple sclerosis: an update with special reference to Europe and the Mediterranean region. Acta Neurol. Scand. 62, 65–80.

12. Li-Weber, M., Krammer, P.H., 2003. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system, in: Seminars in Immunology. Elsevier, pp. 145–157.

13. Lopatinskaya, L., Zwemmer, J., Uitdehaag, B., Lucas, K., Polman, C., Nagelkerken, L., 2006. Mediators of apoptosis Fas and FasL predict disability progression in multiple sclerosis over a period of 10 years. Mult. Scler. 12, 704–709.

14. Lublin, F.D., Reingold, S.C., 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. Neurology 46, 907–911.

15. Munger, K.L., Zhang, S.M., O'reilly, E., Hernan, M.A., Olek, M.J., Willett, W.C., Ascherio, A., 2004. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. Neurology 62, 60–65.

16. Nicot, A.B., 2009. Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. Front. Biosci. Landmark Ed. 14, 4477.

17. Sharief, M.K., Semra, Y.K., 2001. Upregulation of the inhibitor of apoptosis proteins in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. J. Neuroimmunol. 119, 350–357.

18. Wandinger, K.-P., Lünemann, J.D., Wengert, O., Bellmann-Strobl, J., Aktas, O., Weber, A., Grundström, E., Ehrlich, S., Wernecke, K.-D., Volk, H.-D., Zipp, F., 2003. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. Lancet 361, 2036–2043.

19. Zipp, F., Otzelberger, K., Dichgans, J., Martin, R., Weller, M., 1998. Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. J. Neuroimmunol. 86, 151–154.

20. Zuvich, R.L., McCauley, J.L., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., 2009. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. Semin. Immunol., After the Gwas Rush: New Insights into the Genetic Control of Autoimmunity 21, 328–333. doi:10.1016/j.smim.2009.08.003.