بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم PD-1 با بیماری اسکلروز متعدد

اشرف احمدی شادمهری،[۱] محمد حسین نیکنام،[۲] محمدعلی شکرگزار،[۳] مهدی محمودی،[۲] شیلا سریال،[۳] اعظم احمدی شادمهری،[۲] بتول مرادی،[۲] الهام فرهادی،[۲] علی‌اکبر امیرزرگر[۲*]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲- مرکز تحقیقات ایمونولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- انستیتو پاستور ایران

*نویسنده مسئول، تهران، مرکز تحقیقات ایمونولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۹
email: amirzara@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: اسکلروز متعدد یک بیماری التهابی مزمن دمیلینه کننده سیستم اعصاب مرکزی است که منشاء خود ایمن دارد. سلول‌های T خود واکنش‌گر به‌عنوان واسطه‌های مهم فرایندهای ایمونوپاتولوژیک پذیرفته شده‌اند. Programmed Death 1 (PD-1) یکی از اعضای ابر خانواده B-7-CD28 از مولکول‌های کمک تحریکی است که نقش مهار کنندگی سلول را بر عهده دارد. ***روش بررسی:*** در این مطالعه تعداد ۱۵۰ بیمار مبتلا به اسکلروز متعدد عودکننده- بهبود یابنده (۳۴ مرد و ۱۱۶ زن با میانگین سنی ۳۴/۹۸) و ۲۰۲ کنترل سالم (۷۳ مرد و ۱۲۹ زن با میانگین سنی ۳۰ سال) انتخاب شدند. تا به‌حال بیش از ۳۰ پلی‌مورفیسم مختلف در این ژن شناخته شده است. در این مطالعه PD-1.3 و PD-1.9 انتخاب شدند که PD-1.3 در تنظیم بیان ژن به دلیل اختلال در اتصال فاکتور نسخه‌برداری Runx1 به تقویت‌کننده (Enhancer) و PD-1.9 در سنتز پروتئین با تبدیل آمینو اسید والین به آلانین دخالت دارند. پلی‌مورفیسم‌های PD-1.3 (7146 G/A Intron 4) و PD-1.9 (7625 C/T Exon 5) با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. سپس فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در دو موقعیت فوق در دو گروه بیمار و کنترل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. ***یافته‌ها:*** نتایج این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری در هر دو موقعیت فوق از آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها بین گروه بیمار و کنترل یافت نشد. ***نتیجه‌گیری:*** با توجه به اینکه در این مطالعه حجم محدودی از بیماران عودکننده- بهبود یابنده مورد بررسی قرار گرفتند، به نظر می‌رسد جهت قضاوت دقیق به بررسی در حجم بسیار زیادی از بیماران خصوصاً از انواع مختلف بیماری ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسکلروز متعدد، پلی‌مرفیسم، PD-1، PDCD1.

مقدمه

اسکلروز متعدد (Multiple Sclerosis) یک بیماری التهابی مزمن دمیلینه کننده سیستم اعصاب مرکزی است که منشاء خود ایمن دارد. اگر چه عامل بیماری اسکلروز متعدد به‌طور قطعی شناخته نشده است ولی مطالعات متعدد نشان داده‌اند که عوامل محیطی و ژنتیکی می‌توانند زمینه مساعد بروز بیماری را به وجود آورند[۳-۱] و به‌طور طبیعی و در افراد سالم سلول‌های T خود واکنش‌گر در اندام‌های لنفوئیدی محیطی و مرکزی توسط مکانیسم‌های تنظیمی خاصی به شدت کنترل می‌شوند.[۵،۴] مولکول‌های کمک تحریکی موجود بر سطح سلول‌ها در تنظیم فعالیت لنفوسیت‌های T و بنابراین پاسخ ایمنی اولیه و ثانویه نقش تعیین کننده دارند. مسیرهای کمک تحریکی اصلی شامل واکنش میان مولکول‌های CD80(B7-1) و CD86(B7-2) موجود بر سطح سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APC) با مولکول‌های CD28/CTLA4 موجود بر سطح سلول‌های T به‌عنوان لیگاند، می‌باشند.[۸-۶] مطالعه عملکردی و ژنتیکی مولکول‌های کمک تحریکی خانواده B7-CD28 نقش مهم این خانواده را در توسعه و پیشرفت بیماری‌های خود ایمن مختلف از جمله اسکلروز متعدد و مدل‌های حیوانی آن تایید می‌کند.[۱۳-۹] ویژگی مولکول‌های کمک مهاری خانواده B7-CD28 سهم بیشتری را از کنترل پاسخ سلول T تحت شرایط مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک فراهم آورده است.[۱۶-۱۴] مولکول مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ (PD-1) عضوی از خانواده B7-CD28 است که بر سطح سلول‌های T فعال بیان می‌شود. در فرایند پاسخ‌های

ایمونولوژیک با افزایش بیان PD-1 در سطح لنفوسیت T و لیگاندهای آن PDL-1(B7-H1) و PDL-2(B7-DC)، فعالیت و همچنین تولید سایتوکاین توسط لنفوسیت‌های T مهار می‌گردد تا از ادامه پاسخ‌های ایمنی جلوگیری شود.[۱۹-۱۷] نقش مولکول PD-1 در هموستاز لنفوسیت‌ها و تولرانس ایمنی با مشاهده موش‌های دارای نقص در بیان PD-1 تایید شده است. این موش‌ها به یک بیماری خود ایمن ذاتی که مجموعه‌ای از تظاهرات بالینی لوپوس اریتماتوزوس سیستمیک و آرتریت روماتوئید انسانی را دارد، مبتلا می‌شوند.[۲۰] ژن PD-1 در انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲ قرار گرفته است. اخیرا یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی منفرد تنظیمی به نام PD-1.3 در موقعیت ۷۱۴۶ شناخته شده است که G را به A تبدیل می‌کند و در ناحیه تقویت‌کننده (Enhancer) اینترون چهارم ژن PD-1 قرار گرفته است[۲۱] و آلل A که محتوی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی PD-1.3 است اتصال فاکتور نسخه‌برداری Runx1 به تقویت کننده (Enhancer) را مختل می‌کند و بدین وسیله تنظیم بیان ژن تغییر می‌کند در مطالعات مختلف مشاهده شده است که به‌طور جالب توجهی این آلل A با پیشرفت لوپوس اریتماتوزوس سیستمیک مرتبط است.[۲۲و۲۱] تا به‌حال بیش از ۳۰ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی مختلف در ژن PD-1 شناخته شده است که در بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوزوس هفت عدد از آنها PD-1.1, PD-1.2, PD-1.3, PD-1.4, PD-1.5, PD-1.6 و PD-1.9 مطالعه شده است.[۲۳] در مطالعه حاضر دو پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی PD-1.3 در موقعیت 7146 G/A Intron 4 و PD-1.9 در موقعیت 7625 C/T Exon 5 برای بررسی انتخاب شدند. PD-1.3 در تنظیم بیان ژن به دلیل اختلال در اتصال فاکتور نسخه‌برداری Runx1 به تقویت‌کننده (Enhancer) و PD-1.9 در سنتز پروتیین با تبدیل آمینو اسید والین به آلانین دخالت دارند.

روش بررسی

مطالعه انجام شده از نوع مورد شاهد بود. برای هر بیمار و کنترل پرسش‌نامه و رضایت‌نامه‌ای تنظیم شد و مطالعه مورد تایید کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تهران قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها در آزمایشگاه ایمونوژنتیک گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. در این مطالعه ۱۵۰ بیمار مبتلا به اسکلروز متعدد عودکننده-بهبود یابنده تحت درمان (۳۴ مرد و ۱۱۶ زن) و ۲۰۲ کنترل سالم فاقد سابقه بیماری‌های خودایمن (۷۳ مرد و ۱۲۹ زن) از اقوام مختلف ایران بین سال‌های ۱۳۸۷ و ۸۸ انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به بیماران در جدول ۱ آمده است.

آنالیز DNA: از هر فرد بیمار و گروه کنترل ۵ میلی‌لیتر خون تام گرفته شد. DNA بر اساس تکنیک Salting out از نمونه‌های بیمار و کنترل استخراج شد. کیفیت و مقدار DNA ها به روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و مواردی که نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ آنها بین ۱/۵ تا ۱/۸ بود جهت انجام آزمایش انتخاب شدند. با توجه به ثبات ساختاری DNA، نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در $4^{\circ}c$ نگهداری شدند.

PD-1.3: تست PCR-RFLP بر روی موقعیت ژنتیکی 7146) PD-1.3 (G/A Intron 4 با استفاده از ۱۰۰ng DNA ژنومیک در حجم ۲۵µl واکنش PCR حاوی ۱۰ پیکومول پرایمر مستقیم در حجم ۱µl و ۱۰ پیکومول پرایمر غیرمستقیم در حجم ۱µl، ۰/۵µl مخلوط dNTP با غلظت ۲/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر، یک واحد آنزیم Taq-polymerase، یک میکرولیتر MgCl2، و یک میکرولیتر 1x PCR Buffer انجام شد. سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵µl رسانده شد. شرایط دمایی دستگاه PCR جهت انجام آزمایش بدین صورت بود: ابتدا دمای $95^{\circ}c$ به مدت ۱۵ ثانیه، سپس دناتوراسیون در ۳۲ سیکل متوالی شامل $95^{\circ}c$ به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال Annealing در $60^{\circ}c$ به مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن Extention در $72^{\circ}c$ به مدت ۴۰ ثانیه، و سرانجام Final extension در $72^{\circ}c$ به مدت سه دقیقه صورت گرفت. هضم آنزیمی محصول واکنش PCR که طول آن ۱۸۰bp بود توسط آنزیم محدودکننده Pst I (fermentase Inc) در دمای $37^{\circ}c$ به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت و سپس در ژل آگارز سه درصد الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت (جدول ۲ و ۳).

PD-1.9: تست PCR-RFLP بر روی موقعیت ژنتیکی 7625) PD-1.9 (C/T Exon 5 با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک در حجم ۲۵ میکرولیتر واکنش PCR حاوی ۱۰ پیکومول پرایمر مستقیم و ۱۰ پیکومول پرایمر غیرمستقیم در حجم یک میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP با غلظت ۲/۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر، یک واحد آنزیم Taq-polymerase، یک میکرولیتر ۱/۵ میلی‌مول MgCl2، و یک میکرولیتر 1x PCR Buffer انجام شد. سپس با آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵µl رسانده شد. شرایط دمایی دستگاه PCR جهت انجام

آزمایش بدین صورت بود: ابتدا دمای $95^{\circ}c$ به مدت سه دقیقه، سپس دناتوراسیون در ۳۲ سیکل متوالی شامل $95^{\circ}c$ به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال Annealing در $60^{\circ}c$ به مدت ۳۰ ثانیه، سپس طویل شدن Extention در $72^{\circ}c$ به مدت ۱۵ ثانیه و سر انجام Final extension در $72^{\circ}c$ به مدت پنج دقیقه هضم آنزیمی محصول واکنش PCR که طول آن ۴۰۸bp بود توسط آنزیم محدودکننده Bpu 10I (fermentase Inc) در دمای $37^{\circ}c$ به مدت یک ۱۶ ساعت گرفت و سپس در ژل آگارز سه درصد الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت (جدول ۲ و ۳). آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار Epi Info (version 6.2, World Health Organization, Geneva, Switzerland) صورت گرفت. فراوانی آلل‌ها با شمارش مستقیم ژن صورت گرفت. داده‌ها با استفاده از تست χ^2 آنالیز شد. odd ratio و p برای هر دو گروه شاهد و کنترل محاسبه شد. $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

فراوانی آلل‌ها: فراوانی آلل G در موقعیت PD-1.3 (7146 G/A Intron 4) در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل (۹۰/۶٪ در گروه بیمار در مقابل ۸۸/۳۶٪ در گروه کنترل) بود ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین فراوانی آلل C در موقعیت PD-1.9 (7625 C/T Exon 5) در بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود (۹۸/۳٪ در گروه بیمار در مقابل ۹۸/۲۶٪ در گروه کنترل) ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۴).

فراوانی ژنوتایپ‌ها: مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها در موقعیت‌های PD-1.3 (7146 G/A Intron 4) و PD-1.9 (7625 C/T Exon 5) نشان داد که ژنوتیپ G/G در بیماران بیشتر از گروه کنترل است (۸۲٪ در بیماران و ۷۸/۲٪ در کنترل) ولی این تفاوت معنی‌دار نبود. همچنین ژنوتیپ C/C در بیماران بیشتر از کنترل بود (۹۶/۶٪ در بیماران و ۹۶/۵ در گروه کنترل) ولی این تفاوت معنی‌دار نبود (جدول ۴).

بحث

مولکول‌های کمک مهاری خانواده B7-CD28 به عنوان فاکتورهای مهم کنترل پاسخ ایمنی سلول T شناخته شده‌اند.[۲۴و۲۵] سیگنال‌های مهاری ایجاد شده توسط ارتباط قوی PD-1-PDL-1 جهت حفظ و بقای مکانیسم‌های تولرانس و خاتمه پاسخ‌های ایمنی در بافت‌های محیطی به منظور محدود کردن آسیب بافتی می‌باشند.[۲۶و۲۷] دلایل آغاز

جدول- ۱: خصوصیات کلینیکی بیماری اسکلروز متعددو افراد کنترل سالم

خصوصیات	بیماران	افراد کنترل سالم
نسبت مرد به زن	۳/۴	۱/۷۷
میانگین بر حسب سال	۳۴/۹۸	۳۰
سن آغاز بیماری بر حسب سال	۲۷/۸	
طول مدت بیماری بر حسب سال	۷/۳۶	
میزان ناتوانی بر حسب EDSS	۳/۲	

EDSS: Expanded Disability Status Scale

جدول- ۲: پلی‌مورفیسم PD-1 و روش تعیین ژنوتایپ

Polymorphism	SNP	Location	Method	RE	PCR primers
PD1.3	7146(G/A)	Intron 4	PCR-RFLP	Pst I	5'–CCCCAGGCAGCAACCTCAAT-3' 5'–GACCGCAGGCAGGCACATAT-3
PD-1.9	7625(C/T)	Exon 5	PCR-RFLP	Bpu 10I	5'-GGACAGCTCAGGGTAAGCAG-3' 5'-AGGGTCTGCAGAACACTGGT-3'

SNP single-nucleotide polymorphism, PCR polymerase chain reaction, RE restriction enzyme

جدول- ۳: شرایط برش محصول PCR توسط آنزیم محدودکننده

طول قطعه تولید شده	پلی‌مرفیسم تک نوکلئوتیدی	آنزیم	غلظت آنزیم بر حسب واحد بین‌المللی IU	دما و مدت هضم آنزیمی	طول قطعه قابل مشاهده حاصل هضم آنزیمی در ژل
۱۸۰bp	۷۱۴۶G/A	Pst I	۵	$37^{\circ C}$, over night	G:۱۸۰
PD۱/۳					A:۱۳۰
۴۰۸bp	۷۶۲۵C/T	Bpu 10I	۳	$37^{\circ C}$, over night	C:۱۴۵
PD۱/۹					T:۲۳۴

جدول- ۴: پلی‌مورفیسم‌های PD-1 در بیماران و گروه کنترل

پلی‌مرفیسم تک نوکلئوتیدی	بیماران	گروه کنترل	p	OR(٪۹۵CI)
آلل				
PD-1.3A	۲۸(٪۹/۳)	۴۷(٪۱۱/۶)	۰/۳۹	۰/۷۸(۰/۴۶–۱/۳۲)
PD-1.3G	۲۷۲(٪۹۰/۶)	۳۵۷(٪۸۸/۳۶)	۰/۳۹	۱/۲۸(۰/۷۶–۲/۱۶)
PD-1.9C	۲۹۵(٪۹۸/۳)	۳۹۷(٪۹۸/۲۶)	۰/۸۲	۱/۰۴(۰/۲۹–۳/۸۱)
PD-1.9T	۵(٪۱/۷)	۷(٪۱/۷۳)	۰/۸۲	۰/۹۶(۰/۲۶–۳/۴۱)
ژنوتایپ				
PD-1.3A/A	۱(٪۰/۶۶)	۳(٪۱/۴۸)	/۸۳	۰/۴۵(۰/۰۲–۴/۸۴)
PD-1.3G/A	۲۶(٪۱۷/۳)	۴۱(٪۲۰/۳)	۰/۵۷	۰/۸۲(۰/۴۶–۱/۴۷)
PD-1.3G/G	۱۲۳(٪۸۲)	۱۵۸(٪۷۸/۲)	۰/۴۵	۱/۲۷(۰/۷۲–۲/۲۴)
PD-1.9C/C	۱۴۵(٪۹۶/۶)	۱۹۵(٪۹۶/۵)	۰/۸	۱/۰۴(۰/۲۹–۳/۸۶)
PD-1.9C/T	۵(٪۳/۳)	۷(٪۳/۴۶)	۰/۸	۰/۹۶(۰/۲۶–۳/۴۵)
PD-1.9T/T	۰(٪۰)	۰(٪۰)		

PD-1 programmed cell death 1, OR odds ratio, 95% CI 95% confidence interval

آزمون آماری χ^2 می‌باشد، p<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

و ادامه یافتن پاسخ سلول‌های T خود واکنش‌گر در بیماری اسکلروز متعدد شناخته نشده‌اند. برای داشتن استعداد ابتلا به بیماری اسکلروز متعدد و همچنین جهت تشدید بیماری باید فاکتورهای محیطی با فاکتورهای ژنتیکی همراه شوند.[۲۸و۲۹] با این وجود احتمالاً عوامل پاتوژنتیک این بیماری می‌تواند نقص در حفظ تولرانس محیطی نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی را شامل شود.[۳۰] این مطالعه اولین بررسی پلی‌مورفیسم PD-1 در جمعیت ایران و ارتباط آن با بیماری اسکلروز متعدد است. PD-1.3 در چین و بسیاری از کشورهای آسیایی غیر پلی‌مرفیک (G ثابت) شناخته شده است[۳۱-۳۳] ولی در این مطالعه که در ایران انجام شد PD-1.3 پلی‌مرفیک بود. در حالی‌که در مطالعه‌ای که در آلمان بر روی بیماران اسکلروز متعدد انجام شد PD-1.3 پلی‌مرفیک بوده و با بیماری اسکلروز متعدد در ارتباط بوده است و از نظر فراوانی آلل‌ها شباهت زیادی به مطالعه حاضر دارد.[۲۴] آلل A در جمعیت اروپایی (۵ تا ۱۲٪) محاسبه شده که بیشتر از فراوانی آلل A در جمعیت مکزیک بوده است (۲ تا ۷ درصد). همانگونه که در مطالعات گذشته ثابت شده جمعیت ایران از نظر ژنتیکی با جمعیت اروپایی همخوانی بیشتری دارد لذا فراوانی آلل A در جمعیت ایران ۹ تا ۱۲ درصد بود که شباهت بسیار زیادی به جمعیت اروپایی دارد.[۳۴] تغییر از آلل G به A که در منطقه تقویت‌کننده (Enhancer) و داخل اینترون چهار ژن PD-1 قرار دارد موجب اختلال در اتصال فاکتور رونویسی Runx 1 به منطقه تقویت‌کننده و در نهایت تغییر تنظیم بیان ژن PD-1 می‌شود.[۳۵] بر اساس مطالعات انجام شده در اروپا و مکزیک این آلل با لوپوس اریتماتوز سیستمیک مرتبط بوده و نیز ارتباط آلل A با بیماری دیابت ثابت شده است.[۳۵و۳۶] در این مطالعه PD-1.9 با بیماری اسکلروز متعدد در ارتباط نبود و مطالعه دیگری که در این موقعیت ژنی در بیماری اسکلروز متعدد صورت گرفته باشد، وجود ندارد. این Single Nucleotide Polymorphism (SNP) در چین با بیماری اسپوندیلیت آنکیلوزان در ارتباط بوده در حالی‌که در جمعیت ایران با این بیماری مرتبط نبوده (نتایج منتشر نشده) و از نظر فراوانی آلل‌ها نیز با جمعیت ایران متفاوت است.[۳۱] اگر چه این پلی‌مورفیسم غیر هم معنی Non-synonomous است و می‌تواند تاثیر زیادی بر روی پاتوژنز این بیماری داشته باشد ولی به دلیل فراوانی کم آلل موتانت آن (T) در بسیاری از جمعیت‌ها مطالعات کافی روی آن انجام نشده است.[۳۷] مطالعه انجام شده در کشور کره بر روی PD-1.9 T میزان این آلل موتانت را ۷ تا ۲۱ درصد گزارش کرده است.[۲۹] مطالعه‌ای مشابه در کشور چین شیوع این آلل را ۱۸/۵ تا ۲۵ درصد نشان داد، که به مطالعه انجام شده در کره شباهت بسیار زیادی دارد.[۳۱و۳۸] PD-1.9 T در جمعیت ایران ۱/۷ تا ۱/۷۳ درصد بود که این میزان به نتایج

مطالعه انجام شده در اسپانیا بسیار نزدیک است. Isabel Ferreiros-Vidal و همکارانش در این مطالعه میزان PD-1.9 T را صفر تا ۱/۱٪ گزارش کرده‌اند.[۳۷] همانگونه که نتایج این مطالعه نشان می‌دهد در ژن PD-1 دو پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در موقعیت‌های PD-1.3 و PD-1.9 در آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها با بیماران اسکلروز متعدد مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. با توجه به تفاوت‌های نژادی جمعیت ایران با سایر اقوام، این اختلاف در مطالعه ما و مطالعات دیگر در چین و کُره می‌تواند ناشی از اختلاف نژادی و قومی باشد. ضمناً یادآور می‌شود در این مطالعه فقط تعداد محدودی از بیماران اسکلروز متعدد عودکننده- بهبودیابنده Relapsing-remitting بررسی شدند و برای قضاوت بهتر، ضروری به نظر می‌رسد که اولاً مطالعه در تعداد بیشتری از بیماران و اقوام مختلف ایرانی بررسی گردد و ثانیاً بیماران دیگر مبتلا به اسکلروز متعدد (MS) مانند اسکلروز متعدد پیش‌رونده اولیه Primary progressive MS، نوع پیش رونده ثانویه Secondary progressive MS، نوع پیش‌رونده- عودکننده Progressive-Relapsing MS و Neuromyelitis optica نیز بررسی شوند.

References

1. Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis: principles, problems and perspectives. *Brain* 1997;120:865-916.
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343(13):938-52.
3. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(4):291-301.
4. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):351-8.
5. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23(9):445-9.
6. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2):116-26.
7. Anderson DE, Sharpe AH, Hafler DA. The B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmune disease of the central nervous system. *Curr Opin Immunol* 1999;11(6):677-83.
8. Racke MK, Ratts RB, Arredondo L, Perrin PJ, Lovett-Racke A. The role of costimulation in autoimmune demyelination. *J Neuroimmunol* 2000;107(2):205-15.
9. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001;19:225-52.
10. Anderson DE, Bieganowska KD, Bar-Or A, Oliveira EM, Carreno B, Collins M, et al. Paradoxical inhibition of T-cell function in response to CTLA-4 blockade; heterogeneity within the human T-cell population. *Nat Med* 2000;6(2):211-4.
11. Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK. Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. A marker of activated/memory T cells. *J Clin Invest* 1998;101(4):725-30.
12. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2001;108(8):1185-94.
13. Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002;54(1):1-8.
14. Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, Hafler DA. Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol* 1998;160(3):1532-8.
15. Wiendl H, Neuhaus O, Mehling M, Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, et al. The CD28 related molecule ICOS: T cell modulation in the presence and absence of B7.1/2 and regulational expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;140(1-2):177-87.
16. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(5):336-47.
17. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365-9.
18. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027-34.
19. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2(3):261-8.
20. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11(2):141-51.
21. Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;32(4):666-9.
22. Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, Seldin MF, et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. Arthritis Rheum 2004;50(1):327-8.
23. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, Wiendl H. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. Ann Neurol 2005;58(1):50-7.
24. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005;58(1):50-7.
25. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(5):336-47.
26. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365-9.
27. Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Guthann E, Korthäuer U, et al. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol* 2003;170(7):3637-44.
28. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. N Engl J Med 2000;343(13):938-52.

29. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(4):291-301.
30. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):351-8.
31. Liu X, Hu LH, Li YR, Chen FH, Ning Y, Yao QF. Programmed cell death 1 gene polymorphisms is associated with ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Rheumatol Int* 2009 Dec 12.
32. Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Alarcón-Riquelme M, et al. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 2005;52(4):1058-62.
33. Iwamoto T, Ikari K, Inoue E, Toyama Y, Hara M, Yamanaka H, et al. Failure to confirm association between PDCD1 polymorphisms and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *J Hum Genet* 2007;52(6):557-60.
34. Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;32(4):666-9.
35. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, et al. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 2004;50(6):1770-3.
36. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2003;62(6):492-7.
37. Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum* 2004;50(8):2590-7.
38. Lee SH, Lee YA, Woo DH, Song R, Park EK, Ryu MH, et al. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res Ther* 2006;8(6):R163.

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 2, May 2010: 87-93

Assessment of PD-1 gene variation in patients with multiple sclerosis

Ashraf Ahmadi Shadmehri Msc.[1]
Mohammad Hosein Nicknam M.D.-PhD[2]
Mohammad Ali Shokrgozar PhD.[3]
Mehdi Mahmoudi PhD. Student.[2]
Shila Sarial PhD. Student.[2]
Azam Ahmadi Shadmehri Msc.[2]
Batool Moradi BS.[2]
Elham Farhadi Msc student.[2]
Ali Akbar Amirzargar PhD.[2*]

1- Tehran Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran.
2- Department of Molecular Immunology Research Center, Tehran University of Medical Sciences.
3- Pasture Institute of Iran.

*Corresponding author: Immunogenetic Laboratory, Department of Immunology, Molecular Immunology Research Center, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88953009
email: amirzara@sina.tums.ac.ir

Received: January 25, 2010 Accepted: March 13, 2010

Abstract

***Background*:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system with presumed autoimmune origin. T cells are considered to play a pivotal role in orchestrating the self-reactive immune responses in multiple sclerosis (MS). This study was performed to investigate the role of polymorphisms of the programmed cell death 1 (PD-1) gene on susceptibility to ankylosing spondylitis. This gene codes an immunoreceptor named PD-1, which has a cytoplasmic domain containing two tyrosine residues located within immunoreceptor tyrosine-based inhibitory and switch motifs (ITIM and ITSM), suggesting that PD-1 is predominantly inhibitory which responsible for the negative regulation in T cell activation and peripheral tolerance. We investigated whether PD-1 gene polymorphism is a genetic modifier for risk and progression of MS.

***Methods*:** Blood samples from 150 Iranian Relapsing-Remitting MS patients (mean age, 34.98 years) and 202 healthy controls (mean age, 30 years) were enrolled in this study. The PD-1.3 (7146 G/A Intron 4) and PD-1.9 (7625 C/T Exon 5) polymorphisms were detected by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme digestion or Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).

***Results*:** No significant association of the mutated alleles with the disease were detected. Because of the ethnic group genetic variation, our data is not like some of Asian population such as Korea and China.

Conclusions: Our data suggest that PD-1 polymorphisms are not act as genetic modifiers of the progression of MS, possibly these polymorphisms don't induce a partial defect in PD-1 mediated inhibition of T-cell activation.

Keywords: Multiple sclerosis, PD-1, PDCD1, polymorphism.