

Interferon-Gamma Gene Polymorphism in Patients with Tuberculosis

biranvand E (BSc)

Student of MSc, Immunology & microbiology Department, Mazandaran University of Medical Sciences

Abadian Kenary S (PhD)

Immunologist, Immunology & microbiology Department, Molecular Biological Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences

Ghaheeri A (MD)

General Practitioner of Health Center, Mazandaran University of Medical Sciences

Rezaee M S (MD)

Specialist of Children Infectious Disorders, Pediatrics Department of Mazandaran University of Medical Sciences

Hasannia H (BSc)

Student of MSc, Immunology & microbiology Department, Mazandaran University of Medical Sciences

Nasrolahi M (PhD)

Microbiologist, Immunology & microbiology Department, Mazandaran University of Medical Sciences

Parsaei MR (MD)

General Practitioner of Health Center, Mazandaran University of Medical Sciences

Ahanjan M (PhD)

Microbiologist, Immunology & microbiology Department, Mazandaran University of Medical Sciences

biranvand B (BSc)

Medical Student, Ahvaz University of Medical Sciences

Ahmadi Basiri E

Student of MSc of Biostatistics, Mazandaran University of Medical Sciences

Jivad F (BSc)

Student of MSc, Immunology & microbiology Department, Mazandaran University of Medical Sciences

Corresponding Author: Abadian Kenary S
E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

Abstract

Background and objectives: Interferon-Gamma and interferon Gamma receptor (IFN γ / IFN γ R1) are the main genes associated with susceptibility to tuberculosis. We aimed at studying on interferon-Gamma Gene polymorphism(- 56 C/T) in people suffered from tuberculosis (TB).

Material and Methods: In this case-control study, the subjects were 62 individuals with TB and 74 healthy ones. Genomic DNA was extracted by DNA isolation kit(Roche Corporation), and genotype identification was performed by polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Chi square and logistic regression, using SPSS soft ware (version 18), was used to compare genotype and alleles between case and control groups.

Results: The results show that the frequency of TT genotype in tuberculosis patients and healthy person are 43.5% and 17.5%, respectively. Based on Logistic regression (odd ratio 0.148, p=0.0006), there is significant difference between Case and Control. In addition, the frequency of T allele is, in case group, 62.09 %. The difference between case and control is significant, based on Logistic regression (odd ratio: 0.418, P=0.028).

Conclusion: It is implied that -56C/T is associated with IFN γ R1 promoter in tuberculosis patient. It is found to be associated with increased susceptibility to tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, IFN γ R, PCR

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

پلی مورفسم ژن گیرنده اینترفرون گاما در بیماران مسلول

الهام بیرانوند

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

سعید عابدیان کناری

دکترای علوم آزمایشگاهی و متخصص ایمنی شناسی (PhD)، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

عباس قاهری

پزشک عمومی، مرکز بهداشت استان مازندران

محمد صادق رضایی

فوق تخصص عفونی اطفال، گروه کودکان، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

هادی حسن نیا

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

محترم نصرالهی

استاد میکروب شناسی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

محمد رضا پارسایی

پزشک عمومی، مرکز بهداشت استان مازندران

محمد آهنگان

دکترای میکروب شناسی، گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

بهوش بیرانوند

دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپوراهواز

الهام احمدی باصیری

دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

فرشته جیواد

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی شناسی و میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

نویسنده مسئول: سعید عابدیان کناری

تلفن: 09121985667

پست الکترونیک:

abedianlab@yahoo.co.uk

آدرس: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیشناسی و ایمنولوژی

وصول مقاله: 90/6/13

اصلاح نهایی: 90/10/4

آدرس مقاله:

بیرانوند ا، عابدیان کناری س، قاهری ع، رضایی م ص، حسن نیا ه، نصرالهی م، پارسایی م ر، آهنگان م، بیرانوند ب، احمدی باصیری ا، جیواد ف. پلی مورفسم ژن گیرنده اینترفرون گاما در بیماران مسلول. مجله علوم آزمایشگاهی، 1390 دوره پنجم (شماره 1)

18-23

ارتباط $IFN\gamma / IFN\gamma R$ با بعضی از عفونت ها مانند ایدز، هپاتیت وسل است (14). علاوه بر این، موتاسیون در ژن SNP (+874T/A) $IFN-\gamma$ با بیماری سل ریوی در اسپانیا (15)، افریقای جنوبی (16)، جزایر سیسیل (17) و چین (18) به اثبات رسیده است. با توجه به این که اطلاعات کاملی از موتاسیون ژن $IFN\gamma R1$ با بیماری سل در کشور ما و هم چنین دیگر کشورها وجود ندارد، لذا در این پژوهش سعی شده طی یک مطالعه مورد شاهدی ارتباط جهش در ژن گیرنده اینترفرون گاما و بیماری سل بررسی شود.

روش بررسی

جمعیت مورد مطالعه: در این مطالعه مورد -شاهدی، 62 بیمار مبتلا به سل (33 مرد و 29 زن که 45 مورد دارای سل ریوی و 17 نفر مبتلا به فرم خارج ریوی بودند) مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران و 74 فرد سالم (51 مرد و 23 زن) با همسان سازی سن و جنس و نژاد پس از کسب رضایت آگاهانه انتخاب شدند. افرادی که به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند فاقد هر گونه علائم کلینیکی ابتلا به سل یا سابقه عفونت حاد یا مزمن ریوی بودند. انتخاب بیماران این مطالعه بر طبق معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) صورت گرفته بود که شامل: مشاهده آدنوپاتی ناف ریه، مثبت شدن نتیجه کشت یا اسمیر مستقیم و داشتن علائم کلینیکی بوده است (1). تمامی شرکت کنندگان در این مطالعه ایرانی و فاقد نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) بودند.

جمع آوری نمونه و استخراج DNA:

از همه افراد تحت مطالعه مقدار 2 میلی لیتر خون محیطی، در لوله های استریل حاوی EDTA جهت استخراج DNA جمع آوری شد. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (Roche, Germany) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. تعیین ژنوتیپ با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز به روش هضم آنزیمی PCR-RFLP انجام شد. برای انجام PCR، 100 نانوگرم از DNA ژنومی، 0/5 میکرومول از هر کدام از پرایمرهای مربوطه (جدول 2)، 200 میکرومول dNTP، 2 میلی مول $MgCl_2$ ، 25/1 واحد از آنزیم Taq پلی مرز (فرمنتاز، ایتالیا) در حجم نهایی 25 میکرولیتر باهم مخلوط شدند، سپس تکثیر به

سل یکی از مهم ترین بیماری های عفونی در جهان است که سالیانه موجب مرگ و میر حدود دو میلیون نفر در جهان می شود. (1). ماکروفاژهای آلوئولار پس از ورود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به دستگاه تنفس، میکروب سل را شناسایی و فاگوسیت می کنند و سپس با ارائه آنتی ژن ها به لنفوسیت های T موجب تولید سایتوکاین های التهابی توسط این سلولها می شود. (2). هنگامی که بیماری سل با عواملی مثل نقص ایمنی اکتسابی (ایدز)، سوء تغذیه، دیابت و مقاومت دارویی سویه های مایکوباکتریوم همراه شود برای درمان و پیشگیری این بیماری به استراتژی های جدیدی نیاز است. سیستم ایمنی بدن نقش مهمی در پاتوژنز و پیشرفت این بیماری دارد. در نتیجه با پی بردن به نحوه برخورد پاسخهای سیستم ایمنی در مقابل عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بررسی فاکتورهای ژنتیکی می توان به مکانیسم بیماری زایی سل پی برد. هر چند که اطلاعات مربوط به مکانیسم های دفاعی بدن در مقابل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ممانعت از بروز این بیماری پس از ترزیق واکسن محدود می باشد (3)، با این وجود نقش فاکتورهای ژنتیکی در بروز و پیشرفت این بیماری به اثبات رسیده است (4). ژنهای مختلفی از جمله MHC کلاس یک (5)، NRAMP1 (6)، رسپتور ویتامین D (7)، Toll-like receptor2 (8)، $IFN\gamma$ و دیگر رسپتورهای این ژن با تولید سایتوکاین های اختصاصی و ایجاد شبکه ی سایتوکاینی در کنترل این بیماری نقش مهمی دارند (9). $IFN\gamma R$ اولین و مهم ترین ژن مرتبط با سل می باشد که واریانتهای این ژن در استعداد ابتلا به این بیماری نقش مهم و شناخته شده ای دارند (10 و 11). $IFN\gamma R$ هترودایمی از $IFN\gamma R1$ و $IFN\gamma R2$ است که بر روی کروموزوم شماره 6 قرار گرفته است و دارای هفت اگزون و شش اینترون است (12). $IFN\gamma / IFN\gamma R$ دارای نقشهای متعددی شامل فعالیت های ضد میکروبی، ضد ویروسی و تنظیم پاسخهای سیستم ایمنی می باشد. $IFN\gamma$ به عنوان محرک اصلی سلولهای عرضه کننده آنتی ژن مانند سلولهای دندریتیک و ماکروفاژها است که دارای فعالیت ضد سلولهای سرطانی نیز می باشد (13). در مطالعاتی که بر روی حیوانات آزمایشی صورت گرفته نشان دهنده

یافته ها

در مجموع 136 فرد (52 زن و 84 مرد) در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشخصات دموگرافیک و یافته های آزمایشگاهی افراد مورد مطالعه در جدول شماره 1 خلاصه شده است. همانطور که مشاهده می شود سن و جنس در این افراد همسان سازی شده و برای جلوگیری از تاثیر فاکتور های محیطی همه افراد از یک منطقه جغرافیایی بودند. نتایج حاصل از بررسی فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی مورفیسم ژن IFN γ R در این مطالعه در دو گروه بیماران سلی و کنترل در جدول شماره 3 آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود فراوانی ژنوتیپ TT در بیماران مبتلا به سل 43/5 درصد بوده است که با استفاده از آماره ی رگرسیون لجستیک $0/148 =$ نسبت شانس و $0/006 = P$ به دست آمد که بیانگر اختلاف معنی داری بین گروه مورد و شاهد می باشد. هم چنین فراوانی آلل T در بیماران مبتلا به سل 62/09 درصد بوده است که با استفاده از آماره ی رگرسیون لجستیک $0/418 =$ نسبت شانس و $0/028 = P$ ، به دست آمد که این نتایج نیز بیانگر ارتباط معنی داری بین گروه مورد و شاهد می باشد.

روش واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) بر اساس پروفایل دمایی، دناتوراسیون اولیه 4 دقیقه در 94 درجه سانتیگراد، 35 سیکل در 94 درجه سانتیگراد (30 ثانیه) و 61 درجه سانتیگراد (30 ثانیه) و 72 درجه سانتیگراد (40 ثانیه) و در نهایت به مدت 5 دقیقه در 72 درجه سانتیگراد انجام شد. جهت هضم آنزیمی محصول PCR جایگاه -56، با 2 واحد آنزیم AfeI (فرمتاز، ایتالیا) به مدت 12 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس محصول هضم را برای مشاهده بر روی ژل آگارز 1/5% برده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس ایلومیناتور آشکارسازی باندهای CC (bp) 304، 115، ، CT (304، 115، 419 bp)، TT (419 bp) صورت گرفت (شکل شماره 1).

انواع ژنوتیپ های بدست آمده در حاصل جهت تعیین ژنوتیپ با استفاده از ژل آگارز مقابل DNA Ladder 100bp نشان داده شده است.

آنالیز آماری: داده های بدست آمده با استفاده از تست های آماری مربع کای و یا آزمون دقیق فیشر بررسی شدند، علاوه بر این ارتباط بین پلی مرفیسم ژن $IFN\gamma R$ با بیماری سل (نسبت شانس) با استفاده از آزمون رگرسیون لجستیک با سطح اطمینان 95 درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. P value کمتر از 0/05 از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

جدول شماره 1: مشخصات دموگرافیک و برخی از یافته‌های آزمایشگاهی بیماران مبتلا به سل و افراد شاهد

P-value	بیمار سلی (تعداد=62)	کنترل (تعداد=74)	
0/17	45/9±17/6	42/2±14/1	سن(mean ± SD)
0/06	29	23	جنس (زن)

جدول شماره 2: توالی پرایم‌ها و آنزیم‌های محدودالاتر برای تعیین ژنوتیپ

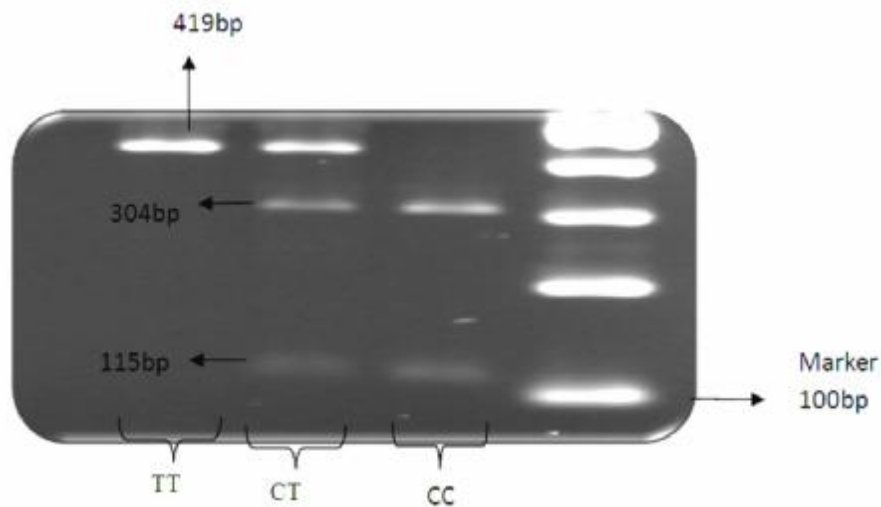
موقعیت	روش	توالی پرایمرها	آنزیم های محدودالانثر	شکل های آلی
-56C/T (rs2234711)	RFLP-PCR	Forward: 5' - GCCCATCTCAGCCCTGCTCA3 '- Reverse: 5'- ATTGTGGCTCGGCTGTGGCC -3'	AfeI	C: 115+304 bp T: 419 bp

جدول شماره 3: فراوانی ژنوتیپی و آلی پروموتور ژن IFN γ R1 در بیماران مبتلا به سل و افراد شاهد

موقعیت	ژنوتیپ/آل	شاهد تعداد (%)	سل تعداد (%)	نسبت شانس ^a (ضریب اطمینان 95%)	P - value
-56	CC	39 (52/7)	12 (19/3)	1 (مراجع)	0/006
	CT	22 (29/7)	23 (37/09)	0/148	
	TT	13 (17/5)	27 (43/5)		
	C	100 (67/5)	47 (37/9)	0/418	0/028
	T	48 (32/4)	77 (62/09)		

^a با استفاده از آزمون لجستیک رگرسیون محاسبه شد

^b با استفاده از آزمون مربع کای محاسبه شد



شکل شماره 1: بررسی پلی مورفیسم های -56C/T در پروموتور ژن IFN γ R1

بحث

امروزه سل به عنوان یکی از مهم ترین بیماری ها در جهان است که سالیانه موجب مرگ و میر میلیون ها نفر می شود. فاکتورهای ژنتیکی متعددی در بروز و پیشرفت این بیماری دخالت دارد (5). سیستم ایمنی اختصاصی باتولید سایتوکاین هایی نظیر $IFN-\gamma$ ، IL-12 و IL-18 می تواند به حذف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمک کند (19). اولین ژن مرتبط با بیماری سل $IFN\gamma R$ می باشد که علاوه بر فعالیت ضد ویروسی و ضد میکروبی، نقش مهمی در تنظیم پاسخهای سیستم ایمنی دارد (10 و 11). در طی یک مطالعه تجربی انجام شده بر روی موشهای فاقد ژن $(-/- IFN\gamma R1)$ و آلوده شده با باسیل کالمت گرین نشان داده شد که این موشها فاقد توانایی تولید مناسب متابولیت های نیتروژن و اکسیژن هستند (20). در پژوهشی دیگر، ارتباط بین پلی مورفیسم ژن اینترفرون گاما و حساسیت به سل نشان داده که آلل A موتاسیون $AT +874$ در اولین جایگاه اینترون کاندیدی برای ابتلا به سل بوده است. علاوه بر این، مطالعات تجربی دیگر نشان داده که موتاسیون های نقطه ای می توانند از طریق تنظیم سطح فاکتورهای رونویسی مانند nuclear factor-KB، بیان ژن اینترفرون گاما را تنظیم کنند (23-21). در بررسی که موران و همکارانش در تکزاس ایالات متحده انجام دادند مشاهده کردند که بین موتاسیون $AT +874$ و بیماری سل ارتباط معنی داری وجود نداشت (24) ولی در طی یک مطالعه مورد شاهدهی که در جنوب شرقی چین بر روی این موتاسیون انجام شده، نشان داده شد که ارتباط معنی داری بین بیماری سل و گروه کنترل بوده است (25). در این پژوهش ارتباط بین پلی مورفیسم $(rs2234711) 56C/T$ و حساسیت به توبرکلوزیس نشان داده شده است (جدول شماره 3). اما در بررسی که Kardum و همکارانش انجام دادند، نشان می دهد که ارتباط معنی داری بین موتاسیون های $(G-611A, T-56C)$ و ابتلا به سل در جمعیت مورد مطالعه وجود نداشته است (26). با مطالعه ی مورد شاهدهی که در کشور چین بر روی افراد مبتلا به هپاتیت مزمن انجام شده نشان دهنده ارتباط بین پلی مورفیسم $56C/T$ و پیشرفت این بیماری بوده است (27). با این وجود در پژوهشی

دیگر ارتباط بین موتاسیون $(G-611A, T-56C)$ و استعداد ابتلا به بیماری سل به اثبات رسیده است (28).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که گیرنده اینترفرون گاما از پروتئینهای موثر در پاتوژنز بیماری محسوب شده و لذا پیشنهاد می شود که شناخت مکانیسم های مولکولی این ژن میتواند در پیشگیری و درمان بیماران مبتلا به سل نقش موثری داشته باشد. نتیجه گیری نهایی حاصل از این مطالعه موید رل احتمالی موتاسیون $56C/T$ - ژن $IFN\gamma R$ در ابتلا به بیماری سل می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین وسیله از تمامی افراد شرکت کننده در این تحقیق نهایت تشکر را دارند. این مطالعه در معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره 89- به ثبت رسیده است که نویسندگان تشکر و قدر دانی خود را از آن معاونت محترم اعلام میدارند. علاوه بر این شایسته است که از زحمات آقای فرازمند، دکتر نیما روحانی و خانم پدرام فرو که در تمامی مراحل این پایان نامه ما را مساعدت نمودند قدردانی شود.

References

- 1-Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing.WHO report 2008; http://www.who.int/tb/report/publications/global_en/index.html.
- 2-Flynn JL, Chan J.Immunology of tuberculosis. Ann Rev Immunol . 2001; 19:93-129.
- 3-World Health Organization: WHO Report 2009: Global Tuberculosis Control-Epidemiology, Strategy, Financing Geneva: WHO; 2009.
- 4- Stein CM , Zalwango S , Chiunda AB , Millard C , Leontiev D V , Horvath A L, et al. *Linkage and association analysis of candidate genes for TB and TNFa cytokine expression: evidence for association with IFNGR1, IL-10, and TNF receptor 1 genes*. Hum Genet. 2007; 121(6):663–73.
- 5- Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, Bozon MV, Ugliero AM, Turbay D, et al. *Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis*. Jama .1998; 279(3):226–8.
- 6- Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV.Variatio s in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. N Engl J Med. 1998; 338(10):640–4.
- 7- Wilkinson R J, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, et al. *Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study*. Lancet. 2000; 355:618–21.
- 8- Ben AM, Barbouche MR, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K. *Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients*. Clin Diagn Lab Immunol .2004; 11(3):625–6.
- 9- Cooper AM, Khader SA.The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. Immunol Rev . 2008; 226:191-204.
- 10-Jouanguy E, Lammamedi CS, Altare F. *Partial interferon-c receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis*. J Clin Invest. 1997; 100(11):2658–64.
- 11- Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, et al. *A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection*. Nat Genet 1999; 21(4):370–8.
- 12- Bulat-Kardum L, Etokebe GE, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Zaputovic L, et al. *Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis*. Scand J Immunol. 2006; 63(2):142–50.
- 13- Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ.The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. J Exp Med . 2001; 193(3):271–80.
- 14- Altare F, Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Fondanèche MC, Fizame C, Ribière F, et al. *A causative relationship between mutant IFNGR1 alleles and impaired cellular response to IFN gamma in a compound heterozygous child*. Am J Hum Genet.1998; 62(3):723–6.
- 15-Lopez-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, Gonzalez A, Codoceo R, Madero R, et al. *Interferon-g and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 167(7):970–5.
- 16- Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG. *Association between tuberculosis and a polymorphic NFkB binding site in the interferon g gene*. Lancet. 2003; 9372 (361):1871–2.
- 17-Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, et al.*Genotype frequencies of the +874 T-A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-g gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis*. Eur J Immunogenet. 2002; 29(5):371–4.
- 18- He J, Wang J, Lei D , Ding S. *Analysis of Functional SNP in Ifng1fng1 in Chinese Han Population with Tuberculosis*. Scandinavian Journal of Immunology .2010; 71(6):452–458.
- 19- Casanova JL, Abel L. *Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model*. Annu Rev Immunol.2002; 20:581–620.
- 20-Kamijo R, Gerecitano J, Shapiro D, Green SJ, Aguet M, Le J, et al. *Generation of nitric oxide and clearance of interferongamma after BCG infection are impaired in mice that lack the interferon-gamma receptor*. J InXamm. 1995; 46(1):23–31.
- 21-Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, Van Helden PD, Hoal EG. *Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene*. Lancet. 2003; 361(9372):1871-2.
- 22- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. *In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene*. Eur J Immunogenet.1999; 26(1):1–3.
- 23- Bream JH, Ping A, Zhang X, Winkler C, Young HA. *A single nucleotide polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription*. Genes Immun .2002;3(3):165–9.
- 24- Moran A, Ma X, Reich RA, Graviss EA. *No association between the +874T /A single nucleotide polymorphism in the IFN-γ gene and susceptibility to TB*. Int J Tuberc Lung Dis.2007; 11(1):113–5.
- 25- Ding S, Li L, Zhu X.*Polymorphism of the interferon-γ gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population*. Hum Immunol . 2008; 69(2):129–33
- 26- Bulat-Kardum L, Etokebe GE, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Zaputovic L, et al. *Interferon-γReceptor-1 Gene Promoter Polymorphisms (G-611A; T-56C) and Susceptibility to Tuberculosis*. Scandinavian Journal of Immunology. 2006; 63(2): 142–150.
- 27- Zhou J, Chen DQ, Poon VK, Zeng Y, Ng F, Lu L, et al. *A regulatory polymorphism in interferon-γ receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection*. Immuno genetics. 2009; 61(6):423–430.
- 28-Rosenzweig SD, Schaffer AA, Ding L, Sullivan R, Enyedi B, Yim JJ, et al. *Interferon-gamma receptor 1 promoter polymorphisms: population distribution and functional implications*. Clin Immunol .2004; 112(1):113-9.