



Multipl Skleroza Genetik Yatkınlık: FOXP3 Gen Polimorfizminin Rolü

Genetic Susceptibility to Multiple Sclerosis: The Role of FOXP3 Gene Polymorphism

Nihal IŞIK¹, Nüket YILDIZ MANUKYAN², İlknur AYDIN CANTÜRK¹, Fatma CANDAN¹, Ayşen ÜNSAL ÇAKMAK¹,
Güher SARUHAN DİRESENELİ³

¹Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

²S. B. Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Giriş: Multipl Skleroz (MS) patogenezinde genetik ve çevresel faktörlerin önemi iyi bilinmektedir. Hastalığın immün patolojisi, patojen CD4+T lenfositlerine odaklanmıştır. Bu hücrelerin aktivitesi, CD4+CD25+ T regülatör hücreler tarafından kontrol edilmektedir. FOXP3 (forkhead boxP3) transkripsiyon faktörünün ise regülatör hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu üzerinde kilit rolü vardır. Çeşitli otoimmün hastalıklarda, FOXP3 gen ekspresyonunda fonksiyonel değişiklikler saptanmıştır.

Yöntem: Yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 102 sağlıklı kontrol ve 148 Multipl Skleroz (118 Relapsing Remitting MS ve 30 Sekonder Progressif MS) hastasında, FOXP3 genine ait ekzon +2710 C/T (rs2232369) tek nükleotid polimorfizmi tarandı. Saptanan polimorfik alelin, hastalığa yatkınlık ve hastalık tipi ile bağlantısı araştırıldı.

Bulgular: Hasta grubunda tek nükleotid polimorfizmi saptanmadı ancak kontrol grubunda %3 oranında polimorfik alel mevcuttu. Bu bulgularla, FOXP3 gen polimorfizmi ile hastalığa yatkınlık arasında bir bağlantı saptanmadı.

Sonuç: Bu polimorfizm daha önce başka bir Multipl Skleroz hasta grubunda taranmamıştır. Sonuç olarak, hastalıkla polimorfik alel arasında bir bağlantı saptanamasa da, hastalığın patogenezinde son derece önemli bir yapı olan FOXP3 ile ilgili bundan sonraki genetik çalışmalarda, bu kodlanan bölgenin iyi bir aday olmadığı söylenebilir. (Nöropsikiyatri Arşivi 2014; 51: 69-73)

Anahtar kelimeler: Multipl Skleroz, FOXP3, polimorfizm, genotip

Çıkar çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

ABSTRACT

Introduction: It is well recognized that both genetic and environmental factors play an important role in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). Immune pathogenesis of MS focuses on pathogenic CD4+ T lymphocytes. CD4+CD25+ regulatory T cells have suppressive function in this cell group. FOXP3 (forkhead boxP3) transcription factor is a key structure in the development and function of regulatory cells. Functional alterations in FOXP3 gene expression have been observed in various autoimmune diseases.

Methods: We screened a non-synonymous coding single nucleotide polymorphism (exon +2710 C/T) (rs2232369) of human FOXP3 gene in 148 MS patients (118 with Relapsing Remitting MS, 30 with Secondary Progressive MS) and 102 age- and sex-matched healthy controls. The association of polymorphisms with susceptibility, and course of the disease was evaluated.

Results: We could not detect any single nucleotide polymorphism in MS patients, however, polymorphic allele was detected in 3% of the control group. Consequently, a genetic association between the FOXP3 gene polymorphism and MS was not revealed.

Conclusion: The distribution of this polymorphism has not been screened in any other MS populations before. Although we could not succeed to find any association between susceptibility to MS and screened FOXP3 gene polymorphisms, we suggest that this particular polymorphism is not appropriate for these kind of studies in the future. (Archives of Neuropsychiatry 2014; 51: 69-73)

Key words: Multiple Sclerosis, FOXP3, polymorphism, genotype

Conflict of interest: The authors reported no conflict of interest related to this article.

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Dr. Nihal Işık, Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Gsm: +90 532 225 79 07 E-posta: nihal-isik@hotmail.com Geliş tarihi/Received: 18.02.2013 Kabul tarihi/Accepted: 12.03.2013

© Nöropsikiyatri Arşivi Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır. / © Archives of Neuropsychiatry, published by Galenos Publishing.

Giriş

Multipl Skleroz (MS), santral sinir sisteminde (SSS) immün hücre infiltrasyonu ve inflamasyon ile karakterize kronik inflamatuvar, otoimmün bir hastalıktır (1,2).

İmmün sistem organizmayı çok sayıda potansiyel patojen mikroorganizmaya karşı korurken, kendi (self) dokusuna karşı immün reaksiyon göstermekten kaçınır. Bu cevapsızlığı (self tolerans), oto-reaktif lenfositlerin timusta gelişimleri sırasında yok edilmesi ya da inaktive olması sağlar. Bu klonal inaktivasyona rağmen periferik dolanımına kaçan patojen T hücreleri ise CD4+ düzenleyici (regulator) T hücreleri (Treg) tarafından aktif olarak süprese edilir. Treg hücrelerin çoğu yapısal olarak CD25 [interlökin (IL)-2 reseptör -alfa-zinciri] ifade eder (3,4,5,6,7).

Sakaguchi ve ark., Treg hücrelerin fonksiyonu konusunda bir dönüm noktası olan araştırmalarında; CD4+CD25+ Treg hücreleri yok edilen farelerde, çeşitli sistemik otoimmün hastalıkların ortaya çıktığını saptamıştır (8). Yine son yıllarda yapılan diğer çalışmalarda da, miyelin ya da diğer "self" doku antijenlerine yönelimi olan patojen T hücrelerinin çoğalmasını kontrol eden tolerans mekanizmalarındaki bozukluğun, MS ve diğer otoimmün hastalıkların ortaya çıkışına neden olabileceği gösterilmiştir (9,10). Yapılan az sayıda insan çalışmasından ise çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (11,12,13).

Son araştırmalar, Treg hücrelerin düzenleyici fonksiyonlarını gerçekleştirmede FoxP3 (forkhead boxP3-scurfin) transkripsiyon faktörünün önemli olduğunu göstermiştir (6,14,15,16).

Tek nükleotid polimorfizmi (TNP), bireyler arasında görülen en basit DNA farklılıklarıdır. TNP, genin kodladığı aminoasidi değiştirebilir, sessiz kalabilir ya da kodlanma yapılmayan bölgelerde olabilir. Bu nedenle gen üretimini, mRNA oluşumunu ya da protein üretimini etkileyerek otoimmün hastalıkların gelişiminde önemli rol oynayabilir (17).

Bu çalışmada, MS hastalarında ve sağlıklı kontrollerde tanımlanan FOXP3 gen polimorfizmleri araştırılarak, bu mutasyonların toplumumuzda MS hastalığına yatkınlık ve diğer fenotipik özelliklerle bir bağlantısı olup olmadığı araştırıldı.

Yöntem

Hasta ve Kontrol Grubu

Hasta grubu, hastanemiz, Multipl Skleroz Polikliniği'nde izlenmekte olan ve hepsi McDonald kriterlerine (18) göre kesin MS tanısı almış 148 hastadan oluştu. Hastaların 118'i Relapsing Remitting (RR) MS iken 30'u Sekonder Progresif (SP) MS idi. MS ile ilgili herhangi bir öykü, bulgu ve ailesinde MS hastalığı olmayan, hasta grubuna yaş ve cinsiyet olarak denk 102 sağlıklı gönüllü (68 kadın, 34 erkek) kontrol grubunu oluşturdu.

Deneklere çalışma hakkında bilgi verilerek kan örneği alımı öncesi aydınlatılmış onam formu dolduruldu.

DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrollerden EDTA'lı tüplere 10cc venöz kan alındı. DNA'nın ayrılması için gerekli (lökositlerin ayrılması, hücre patlatma, çekirdek patlatma, proteinlerin yok edilmesi)

işlemler uygulandıktan sonra etanol eklenerek görünür hale gelen DNA iplikçikleri steril DNA tüpüne alındı. Elde edilen DNA 200 µl steril distile su ile homojen hale getirildikten sonra tekrar 1:50 oranında sulandırıldı ve spektrofotometrede (260 nm'de) optik yoğunlukları ölçülerek miktar tayinleri yapıldı. Elde edilen değerlere göre 30 µg/ml olacak şekilde DNA'lar sulandırıldı ve çalışılncaya kadar +4 °C'de bekletildi.

Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR)

FOXP3 geninde kodlayan bölgede (ekzon) yer alan ve aminoasit değişikliğine neden olduğu bildirilen +2710 C/T (rs2232369, 220.aa A/V) TNP, hedeflenen genomik bölgenin PCR ile amplifikasyonu, daha sonra da restriksiyon enzimi ile kesilme paterninin saptanması [poymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)] yoluyla tarandı. Yöntemin temeli FOXP3 geninin araştırılan polimorfizm noktasındaki nükleotid farklılıklarına göre seçilen uygun enzimle kesilme özelliğini kaybetmesine dayanıyordu. Bu çalışma için Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) programı kullanıldı. Amplifikasyon 5'-CTGAGGGGCATGTGTTAAGG ve 5'-TTTGCGCACTATCCCTATCC primerleri ile yapıldı ve 360 baz çifti uzunluğundaki ürün Ecil enzimi ile kesilerek C ya da T alelinin varlığı saptandı. C aleli restriksiyon enzimi için bir kesim noktası oluşturunuyordu.

İstatistik

Hasta ve sağlıklı kontrollerde saptanan alel ve genotip frekansları χ^2 testi ile karşılaştırıldı. Olası haplotip frekansları Arlequin programı kullanılarak hesaplandı.

Bulgular

Çalışma grubunun demografik özellikleri Tablo 1'de özetlendi. Hasta ve kontrol grubu arasında yaş ve cins açısından fark yoktu. FOXP3 geni +2710 (C/T) polimorfizmi için MS hastaları ve sağlıklı kontrollerde elde edilen dağılım Tablo 2'de gösterildi.

Tanımlanmış olan ancak daha önceden herhangi bir toplumda taranmayan bu polimorfizmin dağılımına bakıldığında, sadece kontrol grubunda %3 oranında polimorfik alel gösterildi. MS hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında saptanan alel frekansları karşılaştırıldığında, iki grup arasında anlamlı bir dağılım farkı gözlenmedi (Tablo 2).

Tartışma

Otoimmün bir hastalık olan MS'in etiyoloji tam bilinmemekle birlikte, büyük olasılıkla heterojen bir yapısı olduğu, hem genlerin, hem de çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir ancak açık ve homojen bir aktarım şekli saptanamadığı için çalışmalarda, klasik genetik epidemiyolojik teknikler uygulanamamaktadır. Tüm kompleks geçişli hastalıklarda gen çalışmaları için en uygun yaklaşım, ilk olarak bağlantı analizleri ile genomik etkinin kromozomal bölgesini tespit etmektir. Daha sonraki basamak ise, hastalıkla direkt ilişkisi açısından aday bölgelerin belirlenmiş kısımlarında (ekzon, promotor bölge veya intron) çeşitliliğin derecesini ortaya koymaktır (19,20).

Tablo 1. Kontrol ve hastaların demografik verileri ve klinik özelliklerinin dağılımı

	Erkek	Kadın	Toplam
MS grubu	48	100	148
Yaş	40,9±9	37,5±8	38,3±9
Hastalık süresi (yıl)	11±9	9±5	9,5±6
EDSS (ortalama)	2,7±1	1,9±1	2,1±1
RR MS	34	84	118
SP MS	14	16	30
Kontrol grubu	34	68	102
Yaş	41,2±8	35,2±9	37,9±8

MS: Multipl Skleroz, EDSS: Expanded Disease Status Scale, RR: Relapsing Remitting, SP: Sekonder Progressif

Tablo 2. FOXP3 +2710 (C/T) polimorfizminin MS ve sağlıklı kontrol grubundaki dağılımı

+2710 (C/T)	MS		Kontrol	
	n=148	%	n=102	%
Alel frekansı				
C	296	100	198	97
T	0	0	6	3
Genotip frekansı				
CC	148	100	99	97
TT	0	0	3	3
TC	0	0	0	0

MS: Multipl Skleroz, C:cytosine, T: Thymin

Tek nükleotid polimorfizmi, insan genomunda en sık rastlanan DNA dizisi çeşitlilikleridir. TNP'lerin genomun tümünde bulunan eski ve stabil mutasyonlar olduğu düşünülmektedir. Bu özellikleri onları genetik çalışmalar için iyi birer hedef yapmaktadır. Bu mutasyonlar çoğunlukla nötral olmasına rağmen, bazıları hastalığa yatkınlıkta veya dirençte rol oynayabilir (21,22).

Otoimmün hastalıkların immün etiopatogenezinde önemli olduğu düşünülen, CD4+CD25+Treg hücreleri, timusta santral toleransı gerçekleştirirken, periferde de düzenleyici fonksiyonlarını gösterirler. İmmünolojik self toleransda bozukluk otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (7). MS hastalarında Treg hücrelerinin periferik kan ve beyin omurilik sıvısında bir farklılığı bulunmasa da bu hücrelerin otoimmüniteyi baskılamada sorunu olduğuna dair önemli kanıtlar vardır (13).

CD25+ T hücre grubunun, CD4+ patojen hücre artışını ve sitokin salınımını engelleyebildiği gösterilmiştir. Son dönemlerde, CD4+ CD25+ Treg hücrelerinin otoimmüniteyi FoxP3 üzerinden engellediği düşüncesi, yaygın olarak kabul görmektedir (6). FoxP3, IL2 reseptör α zinciri (CD25) eksprese eden Treg hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonundaki anahtar faktördür ve hem doğal hem de kazanılmış immün

sistemin regülasyonunda etkilidir. FOXP3 geni X kromozomu üzerinde yer alır. FOXP3 transkripsiyon faktörü temel olarak T hücre dizisi tarafından oluşturulur ve sitokin üretimi ve efektör T hücre aktivasyonunun inhibisyonundaki ana düzenleyici olarak rol alır (14,15,16). FOXP3'ü kodlayan gendeki delesyon, aktif T hücrelerinin artmış proliferasyonu ve hem otoimmün hem de alerjik hastalıkların gelişimi ile sonuçlanmaktadır. FOXP3 genindeki mutasyonun insanlarda nadir bir otoimmün genetik hastalık olan IPEX sendromuna neden olduğu gösterilmiştir. IPEX sendromu (immün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı geçiş) T hücrelerinin hiper reaktivitesi ile karakterize bir immün sistem hastalığıdır (23).

MS etyopatogenezinde FOXP3'ün rolünü araştıran çalışma sayısı son yıllarda artış göstermiştir. Putheti ve ark. 2003 yılında CD4+ CD25+ T hücrelerinin arttığını (11), 2004 yılında ise değişmediğini bildirmişlerdir (12). Fakat 2004 yılında Viglietta, MS hastalarında CD4+ CD25+ T hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarının azaldığını göstermiş ancak bu azalmanın FOXP3 geninin ekspresyon düzeyine bağlı olup olmadığına dair bir bilgi verememiştir (13). 2005 yılında ise Huan ve ark. MS hastalarındaki periferik CD4+ CD25+ T hücrelerinin fonksiyonel baskılayıcılıklarındaki azalmanın FOXP3 ekspresyon düzeyindeki azalma ile ilişkili olduğunu gösterdi (17). Yine benzer şekilde Venken 2008 de yayınladığı çalışmasında, RRMS hastalarında hem CD4+ CD25+ T hücrelerinin baskılayıcı fonksiyonlarında hem de FOXP3 protein miktarında azalma olduğunu bildirdi (24). Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar daha çok Treg hücrelerinin tedavi edici ajanlarla ilişkisini göstermeyi amaçlamaktadır. Multipl skleroz tedavisinde kullanılan ve 1. sıra immünomodülatör ilaçlardan olan Interferon beta (IFN B) tedavisinin Treg hücreleri üzerine olan etkisini araştıran bir kaç çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde, Namdar ve ark. 18 RRMS hastasında, IFN B'nin, Treg frekansını ve baskılayıcı fonksiyonunu anlamlı oranda arttırdığını ancak tedaviden sonraki 6. ayda FOXP3 gen ekspresyonunda bir değişiklik görülmediğini saptayarak, bu tedavinin bazı RRMS hastalarında regülatuar T hücrelerinin fonksiyonunu düzenlediğini ve böylece kontrolsüz giden immün aktiviteyi baskıladığını ifade ettiler (25). Yine bir başka çalışmada ise, IFN B tedavisi alan ve almayan hastalarda, CD4+ CD 25(high) T hücre fenotipinin, FOXP3, ITCH ve CBLB (FOXP3 transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu sağlayan moleküller) gen ekspresyonu ile bağlantısı çalışılarak; FOXP3 mRNA ile korelasyon gösteren ve CD4+ CD 25 (high) hücre yüzeyinde sunulan sitotoksik T lenfosit antijen 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4 -CTLA 4) düzeyinin, tedavi almayan hastalarda, düşük olduğu ve IFN B injeksiyonundan sonra anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Ayrıca, FOXP3 mRNA ekspresyonunun CBLB, ITCH ve T helper 2 sitokin düzeyi ile korelasyonu gösterilmiştir (26). Literatürde görüldüğü gibi FOXP3'ün fonksiyonuna ilişkin başlangıçtaki çalışmalar çelişkili sonuçlar gösterirken daha sonraki saptamalar FOXP3'ün rolünü desteklemiştir. Hatta, Treg hücrelerin tedavide etkisini gösterebilmek için yapılan önemli bir çalışmada; lentiviral vektör sistemi kullanılarak

CD4+ T hücreleri, T reg hücrelerine dönüştürülmüş ve bu hücreler, EAE oluşturulmuş farelerin tedavisi için intranazal olarak verilmiştir. Uygulamadan sonra Treg hücrelerinin beyin çeşitli bölgelerine ulaştığı ve klinik olarak da EAE semptomlarının gerilediği saptanmış, ayrıca beyin dokusunda IL-12 ve IFN-gama gibi inflamatuvar sitokinlerin mRNA düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (27).

T reg hücreleri ve fonksiyonları ile ilgili çalışmaların sayısı artmakla birlikte, FOXP3 gen polimorfizminin MS hastalığı ile birlikteliğini araştıran çalışma mevcut değildir. Bu amaçla, başka bir toplumda taranmayan bu polimorfizmin dağılımına bakıldığında polimorfik alel sadece kontrol grubunun %3'ünde bulunurken hastalarda rastlanmadı (Tablo 2).

Bassuny ve ark. 2003 yılında, Japon toplumunda, 199 tip 1 diyabet hastası ve 289 sağlıklı kontrolü hastalığa yatkınlık açısından karşılaştırıp, mikrosatelit ve FOXP3 geninin protein kodlayan bölgesinde, intron ve promotor alanlarındaki tek nükleotid polimorfizmlerini taradıklarında, FOXP3 geni ve tip 1 diyabete yatkınlık arasında anlamlı bir ilişki bulurken (28), Zavattari ve ark. ise Sardunya adasında yaşayan popülasyonda, FOXP3 geni ile tip 1 diyabet arasında herhangi bir ilişki olmadığını gösterdiler (29). Yine son dönemde yapılan bir başka çalışmada da otoimmün tiroidit ve Addison hastalığında FOXP3 gen polimorfizmi ile birliktelik bulunamadığı bildirilmiştir (30).

Fonksiyonel açıdan bakıldığında, Treg hücreleri ve FOXP3 molekülünün otoimmün hastalıklar ve dolayısıyla MS'e yatkınlık açısından önemli immün işlevleri olabileceği düşünülebilir. Ancak bu konuda yapılan ve çok da fazla sayıda olmayan genetik çalışmadan çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni, taramak amacıyla seçilen genetik bölgenin uygun olmaması, oldukça sofistike ve zahmetli olan yöntemin yaratabileceği farklılıklar olabileceği gibi, genetik çalışmalarda genellikle çok önemli bir konu olan denek sayısının yetersizliği de olabilir ki tüm bu faktörler bizim çalışmamızın da kısıtlılıklarıydı.

FOXP3 geninin ekzon +2710 (C/T) bölgesindeki TNP ve MS'e yatkınlık arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için bir kanıt bulamadık. Yine de şimdiye kadar MS'de FOXP3 gen polimorfizminin tarandığı başka bir çalışmanın olmaması ve bundan sonraki çalışmalarda bu bölge polimorfizminin taranmaması bilgisini paylaşmak amacıyla sonuçlarımızı yayınlamaya değer bulduk. Kromozomal bölgelerin ve spesifik aday genlerin tespiti MS'in patogenezinin anlaşılmasına yardım ederek, hastalığın tedavisi açısından yeni ve daha etkili yöntemlerin gelişmesine yardımcı olacağını düşünüyoruz.

Kaynaklar

- O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA. The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 2001; 21:81-92.
- Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25:491-505.
- 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; 160:1532-1538.
- Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in Immunology* 2004; 16:89-97.
- Sakaguchi S. Regulatory T Cells: Minireview Key Controllers of Immunologic Self-Tolerance. *Cell* 2000; 101:455-458.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299:1057-1061.
- Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:423-449.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164.
- 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; 101:725-730.
- Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA. GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109:895-903.
- Putheti P, Morris M, Stawiarz L, Teleshova N, Kivisakk P, Pashenkov M, Kouwenhoven M, Wiberg MK, Bronge L, Huang YM, Soderstrom M, Hillert J, Link H. Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables. *Eur J Neurol* 2003; 10:525-535.
- Putheti P, Pettersson A, Soderstrom M, Link H, Huang YM. 2004. Circulating CD4+ CD25+T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol* 2003; 24:155-161.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199:971-979.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:330-336.
- Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19:165-168.
- Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol. Rev* 2005; 203:156-164.
- Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, Bourdette D, Ziegler SF, Offner H, Vandenbark AA. Decreased FOXP3 Levels in Multiple Sclerosis Patients. *J Neurosci Res* 2005; 81:45-52.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58:840-846.
- Dyment AD, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of Multiple Sclerosis. *Lancet* 2004; 3:104-113.
- Oksenberg JR, Hauser SL. New insights into the immunogenetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 1997; 10:181-185.
- Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 1997; 17:21-24.
- Weiss KM, Terwilliger JD. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet* 2000; 26:151-157.
- Owen CJ, Jennings CE, Imrie H, Lachaux A, Bridges NA, Cheetham TD, Pearce SH. Mutational analysis of the FOXP3 gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:6034-6039.
- Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Karen Hensen K, Rummens JL, Medaer R, Hupperts R, Stinissen P. Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* 2008; 123:79-89.

25. Namdar A, Nikbin B, Ghabaee M, Bayati A, Izad M. Effect of IFN-beta therapy on the frequency and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and Foxp3 gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS): a preliminary study. *J Neuroimmunol* 2010; 218:120-124.
26. Sellebjerg F, Krakauer M, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS. FOXP3, CBLB and ITCH gene expression and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression on CD4(+) CD25(high) T cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2012;170:149-155.
27. Fransson M, Piras E, Burman J, Nilsson B, Essand M, Lu B, Harris RA, Magnusson PU, Brittebo E, Loskog AS. CAR/FoxP3-engineered T regulatory cells target the CNS and suppress EAE upon intranasal delivery. *J Neuroinflammation* 2012;9:112. doi:10.1186/1742-2094-9-112.
28. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T. A functional polymorphism in the promoter/ enhancer region of the FOXP3/ Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenet* 2003; 55:149-156.
29. Zavattari P, Deidda E, Pitzalis M, Zoa B, Moi L, Lampis R, Contu D, Motzo C, Frongia P, Angius E, Maioli M, Todd JA, Cucca F. No association between variation of the FOXP3 gene and common type 1 diabetes in the Sardinian population. *Diabetes* 2004; 53:1911-1914.
30. Owen CJ, Eden JA, Jennings CE, Wilson V, Cheetham TD, Pearce SH. Genetic association studies of the FOXP3 gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population. *J Mol Endoc* 2006; 37:97-104.