

The association of 1661AG polymorphism for *CTLA-4* gene in patients with systemic lupus erythematosus

Shojaa M^{1,2}, Amoli M³, Javid N⁴, Shakeri F⁴, Aghaie M^{5*}, Qorbani M⁶, Rokn-Sharifi Sh⁷, Mohammadi Z⁸, Haghighi H⁹

1- Osteoporosis Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

2- Researcher, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, I. R. Iran.

3- Endocrinology and Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, I. R. Iran.

5- Joint bone and Connective Tissue Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Golestan, I. R. Iran.

6- Department of Public Health, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, I. R. Iran.

8- Tehran International University of Medical Sciences, Damghan Branch, Damghan, I. R. Iran.

7-Rheumatology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

9- Department of Midwifery, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, I. R. Iran.

Received October 9, 2013; Accepted March 8, 2014

Abstract:

Background: Cytotoxic lymphocyte antigen-4 (*CTLA-4*) plays an important role in regulating T cell activation. *CTLA-4* gene polymorphism is related to genetic susceptibility to various autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE). This study aimed to evaluate the role of *CTLA-4* polymorphism at positions-1661AG in patients with SLE.

Materials and Methods: This study was performed on 180 SLE patients referred to 5th Azar educational hospital (Gorgan, Iran during 2010-2011) and 304 ethnically-and age-matched healthy controls. Polymerase chain reaction restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) was used to analyze the genotype and allele frequencies of this polymorphism.

Results: No statistically significant difference was observed between the studied genotypic and allelic frequencies between the SLE patients and healthy controls. Moreover, no significant correlation was found between the different risk factors (e.g., age, ethnicity, history of the disease and the parents' relationship) and the different genotypes.

Conclusion: Results suggest that the -1661AG polymorphism in the promoter region of the *CTLA-4* gene has no role in the genetic susceptibility to SLE.

Keywords: *CTLA-4* antigen, Lupus polymorphism *CTLA-4*, Polymorphism, Promoter, 1661AG

* Corresponding Author.

Email: mehrdad1390@gmail.com

Tel: 0098 171 442 1654

Fax: 0098 171 442 1654

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences August, 2014; Vol. 18, No 3, Pages 247-252

Please cite this article as: Shojaa M, Amoli M, Javid N, Shakeri F, Aghaie M, Qorbani M, et al. The association of 1661AG polymorphism for *CTLA-4* gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Feyz* 2014; 18(3): 247-52.

همراهی پلی مورفیسم 1661AG ژن رمز کننده آنتی ژن ۴ وابسته به لنفوسیت T سیتوتوکسیک در بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوس سیستمیک

مهدیه شجاع^۱، مهسا آملی^۲، نائمه جاوید^۳، فاطمه شاکری^۴، مهرداد آقایی^{۵*}، مصطفی قربانی^۶، شیما رکن شریفی^۷، زهرا محمدی^۸

هاجر حقیقی^۹

خلاصه:

سابقه و هدف: آنتی ژن ۴ وابسته به لنفوسیت T سیتوتوکسیک نقش مهمی در بازدارندگی فعالیت سلول های T و در نتیجه، جلوگیری از اختلالات خودایمنی نظیر بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک بر عهده دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی همراهی پلی مورفیسم 1661AG با بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک می باشد.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر بر روی کلیه بیماران مبتلا به لوپوس مراجعه کننده به درمانگاه تخصصی بیمارستان ۵ آذر شهر گرگان طی سال ۱۳۸۸ انجام شد. ۱۸۰ فرد بیمار و ۳۰۴ فرد سالم که از لحاظ سن و قومیت با افراد بیمار همسان بودند، وارد مطالعه شدند. جهت تعیین فراوانی آلل ها و ژنوتیپ ها از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد هیچ گونه ارتباط معنی داری بین بیماری، آلل ها و ژنوتیپ های مختلف وجود ندارد. هم چنین، رابطه سن، قومیت، سابقه بیماری در خانواده و رابطه خویشاوندی والدین با هیچ یک از ژنوتیپ های مورد بررسی معنی دار نبود.

نتیجه گیری: نتایج بررسی حاضر نشان داد پلی مورفیسم 1661AG ارتباطی با ابتلا به بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک ندارد.

واژگان کلیدی: CTLA-4، لوپوس اریتماتوس سیستمیک، پلی مورفیسم، پروموتور، 1661AG

دو ماه نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۳، صفحات ۲۵۲-۲۴۷

مقدمه

به طوری که در موارد التهابات خود ایمنی، ژن CTLA-4 گیرنده-های سلول های T را تضعیف می کند تا از پاسخ های واکنشی جلوگیری کند [۸،۷]. مشاهده شده است که بیان CTLA-4 در بیماران مبتلا به لوپوس فعال افزایش می یابد و این افزایش می تواند دلالت بر نقش CTLA-4 در پاتوژنز بیماری لوپوس داشته باشد [۹]. یکی از پلی مورفیسم های ژن CTLA-4 که ارتباط آن با بیماری لوپوس در جمعیت های مختلف بررسی شده است، 1661AG می باشد [۱۱،۱۰،۸]، که در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت بیماری به ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک به روش PCR-RLFP در شهرستان گرگان پرداخته شده است.

بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک (SLE) یک اختلال خود ایمنی با علت ناشناخته می باشد که با تولید اتوآنتی بادی علیه اجزای سلولی منجر به فعال شدن سلسله ای از واکنش های ایمنو-لوژیک و التهابی شده و در نهایت موجب بروز تخریب سلولی و بافتی می گردد [۲،۱]. بیش از یک میلیون نفر در آمریکا به این بیماری مبتلا می باشند و شیوع آن در اروپا ۳/۲ تا ۱۴/۱ مورد به ازای هر صد هزار نفر می باشد [۴،۳]. شیوع بیماری در ایران ۴۰ مورد به ازای هر صد هزار نفر گزارش شده است [۵]. هرچند علل و پاتوژنز بیماری ناشناخته می باشد، اما به نظر می رسد که فاکتورهای محیطی و ژنتیکی هر دو در بروز بیماری دخیل باشند [۶].

مواد و روش ها

مطالعه مورد-شاهدی حاضر بر روی تمامی بیماران مبتلا به لوپوس که طی سال ۱۳۸۸ به درمانگاه تخصصی بیمارستان آموزشی درمانی ۵ آذر شهرستان گرگان مراجعه کرده بودند، انجام شد. پس از تایید بیماری با استفاده از معیارهای ACR [۱۲] و نظر پزشک فوق تخصص، ۱۸۰ بیمار وارد مطالعه شدند. ۳۰۴ فرد سالم که از لحاظ سن و جنسیت با گروه بیمار هم خوانی داشتند و از بخش های داخلی و جراحی انتخاب شده بودند، به شرطی که سابقه هیچ گونه اختلال ایمنی نداشته باشند نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. از کلیه افراد شرکت کننده در مطالعه رضایت نامه

^۱پژوهشگر، مرکز تحقیقات استنوپورز، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲پژوهشگر، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

^۳استادیار، پژوهشکده غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۴مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

^۵استادیار، مرکز تحقیقات استخوان، مفاصل و بافت همبند، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

^۶استادیار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج

^۷پژوهشگر، مرکز تحقیقات روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۸دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه بین المللی تهران، واحد دامغان

^۹دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مامایی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

* نشانی نویسنده مسئول:

گرگان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

دولوپیس: ۰۱۷۱۴۴۲۱۶۵۴

تلفن: ۰۱۷۱۴۴۲۱۶۵۴

پست الکترونیک: mehrdad1390@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۷

ژنوتیپ به طور جداگانه محاسبه گردید. $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تعداد ۱۸۰ بیمار مبتلا به لوپوس وارد مطالعه شدند که ۹۱/۷ درصد بیماران (۱۶۵ نفر) را زنان تشکیل می دادند. میانگین سنی بیماران $32/99 \pm 10/45$ با محدوده سنی ۱۳ تا ۷۰ سال گزارش شد. به علاوه، ۳۰۴ نفر (۱۸۱ زن و ۲۳ نفر مرد) که سابقه هیچ گونه بیماری خود ایمنی نداشتند و از نظر قومیت و سن با افراد بیمار هم سان بودند به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. در جدول شماره ۱ به همراهی بیماری و برخی از ریسک فاکتورهای آن اشاره شده است؛ همان گونه که مشاهده می گردد هیچ یک از فاکتورهای مورد بررسی ارتباط معنی داری با پلی- مورفیسم 1661AG نداشتند. در جدول شماره ۲ به فراوانی آلل ها و ژنوتیپ ها و همراهی آنها با بیماری پرداخته شده است. در بررسی فراوانی ژنوتیپ ها، ژنوتیپ غالب در هر دو گروه AA بود. در مجموع، فراوانی هریک از ژنوتیپ ها در دو گروه بیمار و سالم بسیار شبیه به یکدیگر بودند. همان طور که مشاهده می گردد تفاوت معنی داری در فراوانی هیچ یک از آلل ها و ژنوتیپ ها بین بیماران و گروه شاهد مشاهده نگردید.

کتبی دریافت شد. اطلاعات فردی مورد نیاز و علائم بالینی بیماران مورد بررسی قرار گرفت و در چک لیست از پیش تعیین شده ثبت گردید. از تمامی بیماران نمونه خون محیطی جهت آزمایشات گرفته شد. DNA بیماران و گروه شاهد از گلبول های سفید خون محیطی با استفاده از پروتکل استاندارد کیت (Roche Applied Science) استخراج گردید. DNA استخراج شده با پرایمرهای اختصاصی ناحیه پروموتور ژن شامل:

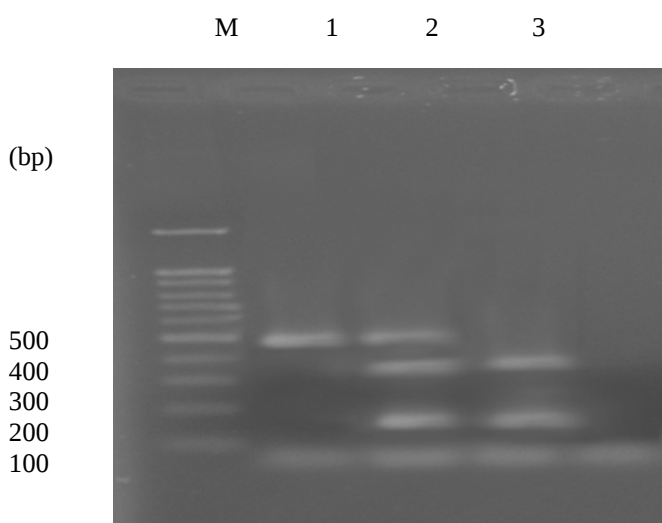
Forward 5'- CTAAGAGCATCCGCTGCACCT-3'
Reverse 5'- TTGGTGTGATGCACAGAAGCCTTT-3'
و با استفاده از تکنیک PCR تکثیر گردید. برنامه واکنش PCR شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، ۳۰ چرخه، با باز شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، چسبیدن پرایمر ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه، گسترش ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه بود. در مرحله بعد محصولات PCR با روش RFLP و با استفاده از آنزیم محدود کننده Bbv1 (New England BioLabs) مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه واکنش ها توسط ژل آگاروز ۲ درصد و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده گردید. قطعات به دست آمده برای آلل A، ۳۴۷ و ۱۳۹ جفت باز و برای آلل G، ۴۸۶ جفت باز بودند (شکل شماره ۱). اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آنالیز داده ها از آزمون مجذور کای استفاده شد و نسبت شانس ابتلا به بیماری برای هر آلل و

جدول شماره ۱- ارتباط بین ژنوتیپ های پلی مورفیسم 1661AG و ریسک فاکتورهای بیماری

ریسک فاکتور	AA (%)	AG (%)	GG (%)	کل (%)	P
کمتر از ۱۵ سال	۱ (۰/۵)	۲ (۱/۲)	۱ (۰/۵)	۴ (۲/۲)	
سن					
۱۵-۴۵ سال	۵۵ (۳۰/۵)	۵۲ (۲۸/۹)	۴۸ (۲۶/۷)	۱۵۵ (۸۶/۱)	۰/۴۵
بیش از ۴۵ سال	۱۰ (۵/۵)	۵ (۲/۸)	۶ (۳/۴)	۲۱ (۱۱/۷)	
بله	۱۰ (۵/۵)	۹ (۵)	۸ (۴/۵)	۲۷ (۱۵)	۰/۹۲
سابقه بیماری در خانواده	۵۶ (۳۱/۱)	۵۰ (۲۷/۸)	۴۷ (۲۶/۱)	۱۵۳ (۸۵)	
بله	۲۵ (۱۳/۹)	۲۲ (۱۲/۲)	۲۰ (۱۱/۱)	۶۷ (۳۷/۲)	۰/۸۶
پدر و مادر خویشتاوند	۴۱ (۲۲/۸)	۳۷ (۲۰/۷)	۳۵ (۱۹/۵)	۱۱۳ (۶۲/۸)	
خیر	۳۸ (۲۱/۱)	۳۱ (۱۷/۲)	۲۸ (۱۵/۶)	۹۷ (۵۳/۹)	
فارسی	۱۳ (۷/۲)	۲۰ (۱۱/۱)	۱۹ (۱۰/۶)	۵۲ (۲۸/۹)	۰/۵۹
قومیت	۱۵ (۸/۲)	۸ (۴/۵)	۸ (۴/۵)	۳۱ (۱۷/۲)	
ترکمن					
سایر					

جدول شماره ۲- توزیع فراوانی آلل و ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم 1661AG در افراد مورد مطالعه

پلی مورفیسم 1661	بیماران (%)	کنترل (%)	P	OR (95% CI)
ژنوتیپ AA	۶۶ (۳۶/۷)	۱۱۲ (۳۶/۸)	۰/۴۹	۰/۹۷ (۰/۶۶-۱/۴۳)
AG	۵۹ (۳۲/۸)	۱۰۳ (۳۳/۹)	۰/۴۲	۰/۹۴ (۰/۶۳-۱/۳۹)
GG	۵۵ (۳۰/۶)	۸۹ (۲۹/۳)	۰/۴۹	۱/۰۲ (۰/۶۸-۱/۵۳)
جمع	۱۸۰	۳۰۴		
آلل A	۱۹۰ (۵۲/۸)	۳۲۷ (۵۳/۸)	۰/۳۲	۰/۸۹ (۰/۵۹-۱/۳۲)
G	۱۷۰ (۴۷/۲)	۲۸۱ (۴۶/۲)	۰/۵	۰/۹۸ (۰/۶۷-۱/۴۴)
جمع	۳۶۰	۶۰۸		



شکل شماره ۱- پلی مورفیسم 318CT ژن 4-CTLA، الکتروفورز ژل آگاروز. M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، (۱) ژنوتیپ GG (۴۸۶ جفت باز)، (۲) ژنوتیپ AG (۴۸۶ و ۳۴۷ و ۱۳۹ جفت باز)، (۳) ژنوتیپ AA (۳۴۷ و ۱۳۹ جفت باز).

بحث

که هیچ یک از آنها ارتباط معنی داری بین بیماری و پلی مورفیسم مورد نظر گزارش نکردند [۱۷، ۱۵، ۱۱، ۱۰، ۸]. با وجود یکسان بودن نتایج بررسی حاضر با سایر مطالعات انجام شده، قابل ذکر است که تعداد بیماران و گروه کنترل در تمامی مطالعات یافت شده کمتر از بررسی حاضر می باشد. همچنین، اگرچه اکثریت مطالعات انجام شده در مناطق مختلف آسیایی نظیر چین، کره، ژاپن و مالزی می باشد [۱۷، ۱۵، ۱۱، ۱۰]، اما مطالعه ای که Parks و همکاران در آمریکا در دو گروه آمریکایی و آفریقایی-آمریکایی انجام دادند نیز در تایید بررسی حاضر و دیگر مطالعات انجام شده می باشد [۸]. در مطالعه حاضر فراوانی آلل G با ۴۷/۲ درصد و ۴۶/۲ درصد و آلل A با فراوانی ۵۲/۸ و ۵۳/۸ به ترتیب در بیماران و گروه کنترل بسیار به یکدیگر نزدیک می باشد، در حالی که در سایر مطالعات انجام شده فراوانی آلل A در هر دو گروه بسیار بیشتر از آلل G می باشد. به طور مثال در مطالعه ای که در ژاپن انجام شد

اگرچه علت بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک تاکنون ناشناخته باقی مانده است، اما شواهد نشان می دهد پلی مورفیسم-های ژن 4-CTLA نقش مهمی در ابتلا به بیماری لوپوس ایفا می کنند. برخی مطالعات ارتباط معنی داری بین بیماری و پلی مورفیسم های ژن 4-CTLA عنوان کرده اند [۱۱-۱۳]، در حالی که برخی دیگر هرگونه ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن و بیماری لوپوس را رد کرده اند [۱۷-۱۴]. در مطالعه حاضر نه تنها هیچ یک از ژنوتیپ ها و آلل های پلی مورفیسم 1661AG ارتباط معنی داری با بیماری لوپوس اریتماتوی سیستمیک نداشتند، بلکه علی رغم تعداد بالای گروه کنترل، فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های متفاوت در هر دو گروه بسیار نزدیک به یکدیگر بودند. در جستجوهای جامعی که انجام شد در مجموع ۶ مطالعه یافت شد که در آن به بررسی ارتباط پلی مورفیسم مورد نظر با بیماری لوپوس پرداخته شده بود

پذیرد تا بتوان نتیجه‌گیری کامل‌تری در مورد تاثیر پلی مورفیسم مورد بررسی بر بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک در منطقه به- دست آورد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج یکسان از مطالعه حاضر و سایر مطالعاتی که در قومیت‌ها و نواحی مختلف جغرافیایی صورت گرفته است، شاید بتوان این چنین نتیجه‌گیری کرد که پلی مورفیسم 1661AG متاثر از قومیت و نژاد نبوده و ارتباطی با بیماری لوپوس اریتماتوس سیستمیک ندارد. هم‌چنین، ریسک فاکتورهای احتمالی بیماری نیز در بررسی حاضر ارتباطی با پلی مورفیسم مورد بررسی نشان ندادند. لذا، با توجه به تنوع قومیتی در کشور و عدم انجام مطالعه مشابه، بررسی‌های بیشتر جهت دست‌یابی به نتایج قوی‌تر توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه بیماران و افرادی که در جمع‌آوری داده‌های این مطالعه ما را یاری رساندند و هم‌چنین معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان که هزینه این طرح را تأمین نمودند، قدردانی می‌شود.

References:

- [1] Kotzin BL. Systemic lupus erythematosus. *Cell* 1996; 85(3): 303-6.
- [2] Utz PJ. Multiplexed assays for identification of biomarkers and surrogate markers in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13(5): 304-11.
- [3] Marshall E. Lupus: mysterious disease holds its secrets tight. *Science* 2002; 296(5568): 689-91.
- [4] Stahl-Hallengren C, Jonsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol* 2000; 27(3): 685-91.
- [5] Davatchi F, Jamshidi AR, Banihashemi AT, Gholami J, Forouzanfar MH, Akhlaghi M, et al. WHO-ILAR COPCORD Study AND (Stage 1, Urban Study) AND in Iran. *J Rheumatol* 2008; 35(7): 1384.
- [6] Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun* 2007; 8(6): 445-55.
- [7] Eagar TN, Karandikar NJ, Bluestone JA, Miller SD. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2002; 32(4): 972-81.
- [8] Parks CG, Hudson LL, Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, et al. CTLA-4 gene

فراوانی آلل A ۸۹/۹ درصد در گروه بیماران و ۸۵/۲ درصد در گروه کنترل گزارش شد، این در حالی است که آلل G از فراوانی ۱۰/۱ درصد در بیماران و ۱۴/۸ درصد در افراد سالم برخوردار بود [۱۵]. اگرچه الگوی فراوانی آلل‌ها در مطالعه حاضر کاملاً متفاوت از سایر مطالعات می‌باشد، اما این ارتباط به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. در مطالعه حاضر هم‌چنین تاثیر برخی فاکتورها نظیر سن، قومیت، سابقه بیماری در خانواده و وجود رابطه خویشاوندی پدر-مادر مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که اگرچه ۸۵ درصد بیماران سابقه‌ای از ابتلا به بیماری در خانواده عنوان نکردند و والدین ۱۱۳ نفر (۶۲/۸ درصد) از بیماران هیچ نسبت فامیلی با یکدیگر نداشتند، اما ارتباط هیچ‌یک از ریسک فاکتورهای مورد بررسی با ژنوتیپ‌های مختلف معنی‌دار نبود. از آنجا که هیچ‌یک از مطالعات انجام شده به بررسی ارتباط ریسک فاکتورهای مختلف با ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم 1661AG نپرداخته‌اند، در مطالعه حاضر امکان بررسی و مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر بررسی‌های انجام شده میسر نگردید. با توجه به این که مطالعه حاضر اولین بررسی می‌باشد که در ایران و منطقه خاورمیانه در این خصوص به انجام رسیده است و بیشتر بررسی‌های انجام شده در جمعیت آسیایی می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد مطالعات دیگری با حجم نمونه بالاتر، در سایر مناطق کشور انجام

- polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a population-based study of whites and African-Americans in the southeastern United States. *Lupus* 2004; 13(10): 784-91.
- [9] Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG. Polymorphisms of the CTLA-4 exon 1 and promoter gene in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10(9): 601-5.
 - [10] Taha Khalaf A, Song JQ, Gao TT, Yu XP, Lei TC. CTLA-4 Gene Polymorphism and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus in the Chinese Population. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 167395.
 - [11] Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet* 2002; 111(4-5): 452-5.
 - [12] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1725.
 - [13] Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50(1): 328-9.

- [14] Kimkong I, Nakkuntod J, Sae-Ngow S, Snabboon T, Avihingsanon Y, Hirankarn N. Association between CTLA-4 polymorphisms and the susceptibility to systemic lupus erythematosus and Graves' disease in Thai population. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2011; 29(3): 229-35.
- [15] Takeuchi F, Nakaue N, Kawasaki K, Mori M, Kuwata S, Tanimoto K. The CTLA-4, 1661A/G and, 1772T/C dimorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2007; 27(8): 785-7.
- [16] Aguilar F, Torres B, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF. CTLA4 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003; 64(10): 936-40.
- [17] Chua KH, Puah SM, Chew CH, Tan SN, Lian LH. Study of the CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus (SLE) samples from Malaysia. *Ann Hum Biol* 2010; 37(2): 274-80.