

بررسی پلی مورفیسم ژن CTLA-4 در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و مقایسه آن با افراد نرمال

سیروس نعیمی^{1*}؛ کامبیز باقری¹؛ نصراله عرفانی³

چکیده

زمینه: سرطان تخمدان یکی از سرطان‌های نسبتاً شایع در زنان بعد از یائسگی می‌باشد. در حال حاضر بحث زیادی راجع به درمان ایمنی سرطان تخمدان پیش آمده است و از ایترفرون‌ها و اینترلوکین 2 به این منظور استفاده شده است. مولکول CTLA-4 مولکولی است که بر سطح لنفوسیت‌های T بیان می‌شود و نقش مهمی در هموستاز و تنظیم پاسخ ایمنی ایفا می‌نماید. ژن مولکول CTLA-4 در موقعیت‌های +49 A/G و -318 C/T دارای پلی مورفیسم بوده که در بیان مولکول مذکور تأثیرگذار می‌باشند.

روش‌ها: در این تحقیق برای بررسی پلی مورفیسم‌های موقعیت‌های +49 A/G و -318 C/T، ژن مولکول 4 مرتبط با سمیت سلولی لنفوسیت T (CTLA-4) از خون محیطی 73 بیمار مبتلا به سرطان تخمدان و 115 فرد سالم به‌عنوان گروه کنترل برای استخراج DNA استفاده گردید و پلی مورفیسم‌های ژن مذکور با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های حاصل از پلی مورفیسم‌های +49A/G و -318C/T ژن ctla-4 تفاوت معناداری را در افراد مبتلا به سرطان تخمدان و گروه کنترل نشان نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری: براساس این تحقیق به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم ژن ctla-4 در ایجاد بیماری نقشی نداشته و در تحقیقات آینده نقش سایر پلی مورفیسم‌های این ژن را بایستی مورد مطالعه قرار داد.

کلیدواژه‌ها: پلی مورفیسم، سرطان تخمدان، ژن وابسته به تومور، CTLA-4

«دریافت: 1388/8/7 پذیرش: 1389/1/24»

1. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون

2. مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

* عهده‌دار مکاتبات: کازرون، بخش زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، تلفن: 2230505 و 0721-2230506

Email: Naeimis@kau.ac.ir

مقدمه

شناسایی و از بین بردن سلول‌های توموری دارد (2). مکانیسم‌های فرار از سیستم در بدخیمی‌های انسان و حیوانات مشابه بوده و شامل بروز آنتی‌ژن‌های کمپلکس سازگاری بافتی اصلی غیرکلاسیک مانند HLA-E، HLA-G، مرگ سلولی القا شده و دیگر مکانیسم‌ها است. مکانیسم اصلی ایمنی بر علیه تومورها، تخریب سلول‌های توموری توسط لنفوسیت‌های T کشنده است. این سلول‌ها از طریق اتصال گیرنده‌های خود به مولکول‌های کمپلکس سازگاری بافتی اصلی موجود بر سطح سلول‌های ارایه‌دهنده آنتی‌ژن و همچنین اتصال مولکول CD28

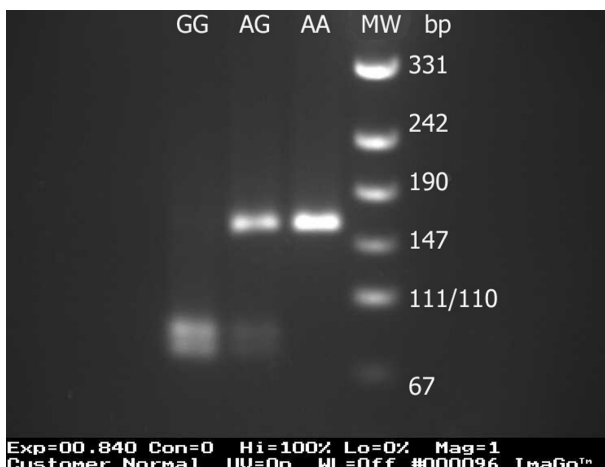
سرطان تخمدان بیشترین میزان مرگ و میر را در بین سرطان‌های زنان تشکیل می‌دهد. شایع‌ترین سرطان تخمدان، نوع اپی‌تلیال آن است. به‌علت علائم بالینی ناچیز، معمولاً در هنگام تشخیص این سرطان حدود 60 درصد افراد دچار متاستاز شده‌اند. سرطان تخمدان از نوع اپی‌تلیال بین سنین 60-56 سالگی بیشتر اتفاق می‌افتد (1). روندا ایجاد سلول‌های توموری با جهش‌های مختلف ژنی همراه است که چرخه سلولی و تکثیر آن‌ها را دچار تغییر می‌نماید. سیستم ایمنی افراد نقش مهمی در

ژن *ctla-4* و تغییر احتمال ابتلا به سرطان‌های متعدد از جمله سرطان سینه، لنفوم غیرهوجکینی و میلوم مولتیپل وجود دارد (21-19). با توجه به مطالعات انجام شده، به نظر می‌رسد که پلی مورفیسم ژن *ctla-4* ممکن است در ایجاد سرطان تخمدان نقش ایفا نماید. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی پلی مورفیسم ژن *ctla-4* در موقعیت‌های +49 A/G و -318 C/T در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و مقایسه آن با افراد سالم و ارتباط آن با ایجاد این بیماری انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد 73 بیمار مبتلا به سرطان تخمدان که بیماری آن‌ها به تأیید جراح و متخصص زنان و زایمان رسیده بود وارد این مطالعه شدند. پس از تکمیل پرسشنامه مخصوص و بررسی وضعیت بالینی و تاریخچه خانوادگی، کار نمونه‌گیری از آنان انجام شد. همچنین از 115 فرد سالم مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون شیراز که از لحاظ سن و جنس با بیماران مطابقت داشتند و سابقه سرطان و بیماری‌های خودایمنی در آنان و خانواده‌شان وجود نداشت به‌عنوان گروه کنترل نمونه‌گیری شد. از افراد مورد مطالعه، 7 سی‌سی خون سیاهرگی گرفته شد و به لوله‌های آزمایش حاوی EDTA منتقل شد. DNA ژنومی از لکوسیت‌های خون محیطی با روش Proteinase K استخراج شد (22). برای تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه در موقعیت +49A/G از روش PCR - RFLP استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا قطعه مورد نظر DNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد، سپس محصول PCR تحت تأثیر آنزیم‌های محدودکننده (Restriction Endonuclease) مربوطه قرار گرفت و به قطعاتی تبدیل شد. براساس تعداد و اندازه قطعات به‌دست آمده به ژنوتیپ DNA مورد آزمایش پی برده شد. برای انجام PCR در موقعیت +49A/G جهت تکثیر DNA مورد نظر از زوج پرایمرهای ذیل استفاده شد:

سطح لنفوسیت T به لیگاند خود به نام مولکول B7.1 موجود بر سطح سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (به‌عنوان کمک پذیرنده) فعال می‌گردند (3). تنظیم دقیق تکثیر سلول‌های T نقش مهم و حیاتی در پاسخ ایمنی ایفا می‌کند، این عمل توسط سیگنال‌های تحریکی و سیگنال‌های تنظیم منفی تعدیل می‌شود. گیرنده‌هایی همچون مولکول B7.1 در ایجاد سیگنال‌هایی برای مهار لنفوسیت‌ها مؤثر هستند و این کار را با اتصال به مولکول CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Associated Molecule-4) موجود بر سطح لنفوسیت‌ها انجام می‌دهند (4-6). شناسایی گیرنده‌های تنظیم منفی لنفوسیت‌های T این ایده را در ذهن ایجاد می‌کند که دستکاری آن‌ها می‌تواند باعث افزایش ایمنی ضد توموری اختصاصی سلول‌های T در محیط آزمایشگاهی گردد (7). مولکول CTLA-4 یا CD152 یک گلیکوپروتئین درون‌غشایی نوع یک و از خانواده بزرگ ایمونوگلوبولین‌ها است که دارای 223 اسید آمینه ساختاری و 34 اسید آمینه به‌عنوان پپتید سیگنال‌دهنده می‌باشد (8 و 9). این مولکول به‌صورت هومودایمر با پیوند کووالانسی بر سطح لنفوسیت‌های T فعال بیان می‌شود (10 و 11). علاوه بر لنفوسیت T، این مولکول بر سطح سلول‌های B، مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و سلول‌های بنیادی وجود دارد (12 و 13). ولی عملکرد آن در این سلول‌ها نامعلوم است (14). در مطالعه اولیه در محیط آزمایشگاه نشان داده شده است که اتصال آنتی‌بادی ضد مولکول CTLA-4 به مولکول مذکور باعث افزایش تولید اینترلوکین 2 (IL-2) توسط سلول‌های T و نیز افزایش تکثیر این سلول‌ها می‌گردد (15 و 16). در مطالعه‌ای که توسط ملیچار (Melichar) در سال 2000 انجام گردید ارتباطی بین افزایش بیان این مولکول و دیگر مولکول‌های مهاری موجود بر سطح لنفوسیت‌های T به‌دست آمده از مایع صفاقی افراد مبتلا به سرطان تخمدان مشاهده شد (17). ژن *ctla-4* روی کروموزوم شماره 2 قرار داشته و شامل چهار اگزون است (18). گزارش‌های زیادی در مورد ارتباط پلی مورفیسم‌های



تصویر 1- نتیجه الکتروفورز محصول PCR در موقعیت +49A/G

برای هر نمونه دو لوله 0/2 میلی‌لیتری مخصوص PCR در نظر گرفته می‌شد، هر 16/2 میکرولیتر از مخلوط تکثیر PCR حاوی یک میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت (0/3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)، 2 میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز با غلظت (1u/ μl)، 0/45 میکرومول dNTP با غلظت (10mM)، 0/45 میکرولیتر از MgCl₂ با غلظت (50mM)، 1/5 میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 10X، 0/6 میکرومول از هر پرایمر با غلظت (20pm) و 9/6 میکرولیتر آب دیونیزه شده است. مخلوط حاصل ابتدا در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه حرارت داده شد و سپس برای 30 دور، تحت فرآیند PCR قرار گرفت این فرآیند شامل 20 ثانیه denaturation در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، 20 ثانیه annealing در دمای 53/5 درجه و 20 ثانیه extension در دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود. این مخلوط سپس به مدت 5 دقیقه در دمای 72 درجه به‌عنوان extension نهایی قرار گرفت. محصول نهایی بر روی ژل آگاروز 2 درصد و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. در صورت هوموزیگوت بودن یک قطعه 195 جفت بازی را فقط در یک تیوب و در صورت هتروزیگوت بودن در هر دو تیوب واکنش PCR مشاهده می‌گردد. برای اطمینان از نتایج PCR از کنترل داخلی استفاده شد. در این جا پرایمرهای طراحی شده یک قطعه 100bp از B house keeping gene globin را به‌عنوان

Forward: 5'-GCTCTACCTGAAGACCT-3' و

Reverse: 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'

برای انجام این واکنش در یک تیوب اپندروف با حجم 0/2 سی‌سی برای هر نمونه DNA مواد ذیل به‌ترتیب اضافه شدند: هر 16 میکرولیتر از مخلوط تکثیر PCR، حاوی یک میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت (0/3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)، 2 میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز با غلظت (1u/ μl)، 0/57 میکرومول dNTP با غلظت (10mM)، 0/49 میکرولیتر از MgCl₂ با غلظت (50mM)، 1/5 میکرولیتر از بافر PCR با غلظت (10X)، 0/3 میکرومول از هر پرایمر با غلظت (20pm) و 9/84 میکرولیتر آب دیونیزه شده است. مخلوط حاصل ابتدا در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه گرم شد و سپس برای 33 دور، تحت فرآیند PCR قرار گرفت. این فرآیند شامل 45 ثانیه denaturation در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، 45 ثانیه annealing در دمای 60 درجه و 45 ثانیه extension در دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود. محصول نهایی که یک قطعه 162 جفت بازی بود توسط آنزیم محدودکننده BbvI هضم شده و در صورت وجود آلل G به دو قطعه 88 و 74 جفت بازی تقسیم می‌شد. سپس بر روی ژل آگاروز 2/5 درصد و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز مورد مشاهده قرار گرفت. براین اساس سه ژنوتیپ برای این پلی مورفیسم قابل مشاهده است (23 تصویر 1).

برای بررسی پلی‌مورفیسم ژن مذکور در موقعیت 318C/T از روش Allele specific PCR (ARMS) استفاده گردید. زوج پرایمرهای مورد استفاده شامل دو پرایمر Forward برای هر نمونه و یک پرایمر Reverse مشترک بود. سکانس پرایمرهای مورد استفاده از این قرار بود:

FI: 5' ACTTAGTTATCCAGATCCAC 3' و

FII: 5'-ACTTAGTTATCCAGATCCAT-3'

.Rev: 5'- AGGCTCTTGAATAGAAAGC-3'

همچنین به عنوان نتیجه نهایی در مورد پروموتور 318(C/T)- یک قطعه به طول 185 جفت باز تولید گردید.

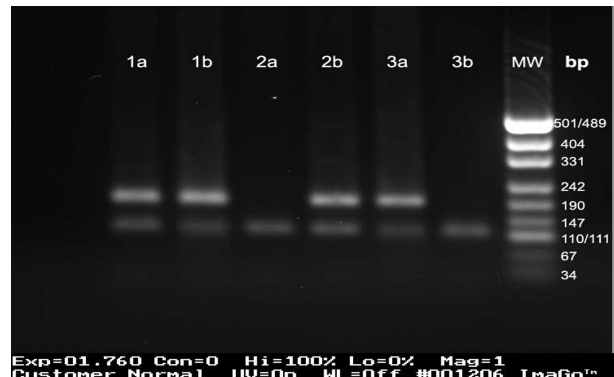
از میان 73 نفر مورد مطالعه مبتلا به سرطان تخمدان، تعداد 56 نفر (76/7%) ژنوتیپ CC، 16 نفر (21/9%) ژنوتیپ CT و 1 نفر (1/4%) ژنوتیپ TT را نشان دادند. این درصد در مورد افراد کنترل به ترتیب 99 (86/1%)، 15 (13/1%) و 1 نفر (0/8%) بود (جدول 1).

همچنین در مورد پروموتور +49A/G، در گروه مورد 41 نفر (56/1%) ژنوتیپ AA، 24 نفر (32/8%) ژنوتیپ AG و 8 نفر (10/9%) ژنوتیپ GG داشتند این نسبت در افراد کنترل به ترتیب 65 (56/6%)، 41 (35/6%) و 9 نفر (7/8%) بود. نتایج حاصله توسط نرم افزار epi2000 و آزمون X2 نشان داد که در هر دو جایگاه تفاوت معناداری بین پلی مورفیسم ژن ctla-4 بیماران در مقایسه با افراد کنترل وجود ندارد ($P > 0/05$) (جدول 1).

از میان 146 نفر مورد مطالعه در سرطان تخمدان، تعداد 128 نفر (87/7%) آلل C و 18 نفر (12/3%) آلل T را نشان داده اند. این درصد در مورد افراد کنترل به ترتیب 213 نفر (92/6%)، 17 نفر (7/4%) بود (جدول 2).

جدول 1- مقایسه پلی مورفیسم های ژن ctla4 در بیماران سرطان تخمدان و گروه کنترل

P	کنترل	بیمار	ژنوتیپ	لوکوس
	115	73		N
$P > 0/05$	99(86/1)	56 (76/7)	CC	-318
	15(13/1)	16(21/9)	CT	
	1(0/8)	1(1/4)	TT	
	115	73		N
$P > 0/05$	65(56/6)	41(56/1)	AA	+49
	41(35/6)	24(32/8)	GA	
	9(7/8)	8(10/9)	GG	



تصویر 2- نتیجه الکتروفورز محصول PCR در موقعیت C/T -318 (1a,1b): هتروزیگوت (C/T)-(2a,2b): هوموزیگوت (C)-(3a,3b): هوموزیگوت (T)

کنترل داخلی تکثیر می نمایند. پرایمرهای مورد استفاده برای کنترل داخلی دارای توالی های ذیل می باشند (تصویر 2).

Control forward: 5'- ACACAACCTGTGTTCACTAGC -3'

Control reverse: 5'- CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS 15.0 و Epi Info 2000 و از آزمون های مجذور کای (X^2) و Hardy-weinberg equilibrium استفاده شد.

یافته ها

در این بررسی، ژنوتیپ 73 بیمار مبتلا به سرطان تخمدان و 115 نفر به عنوان کنترل، در ناحیه 318(C/T)- و +49(A/G) پروموتور ژن ctla-4 با آزمایش ARMS و RFLP-PCR به ترتیب تعیین و با هم مقایسه شدند. میانگین سنی بیماران مورد مطالعه و گروه کنترل به ترتیب $48 \pm 11/7$ و 50 ± 13 سال بود. نتایج حاصل از آزمایش PCR-RFLP بر روی بیماران و گروه کنترل با شرایط ذکر شده، منجر به تولید محصولی به طول 162 جفت باز (base pair) به عنوان قطعه مورد آزمایش در مورد پروموتور +49A/G گردید. سپس قطعه حاصل در معرض آنزیم قرار گرفته و به قطعات متفاوت تبدیل گردید.

لنفوسیت T کشنده است. تنظیم فعالیت هر سلول در هسته واقع شده و توسط ژن‌ها تنظیم می‌گردد. مولکول CTLA-4 به‌عنوان یک مولکول مهارکننده بر سطح لنفوسیت‌های T فعال بیان می‌شود. اتصال مولکول مذکور با لیگاند خود (B7.1, B7.2) که بر سطح سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن بیان می‌شود، باعث مهار شدن فعالیت‌های لنفوسیت‌های T می‌گردد. ژن این مولکول بر روی بازوی بلند 2q33 قرار دارد و شامل چهار اگزون است (17 و 18). ژن این مولکول دارای پلی‌مورفیسم‌های مختلفی است که در این تحقیق دو پلی‌مورفیسم آن که شامل 318C/T- در پروموتور ژن مذکور و +49A/G در اگزون شماره یک است، مورد بررسی قرار گرفت. پلی‌مورفیسم موقعیت +49A/G باعث تبدیل اسید آمینه ترئونین به اسید آمینه آلانین در قسمت پپتید رهبر می‌گردد. که این عمل باعث کاهش بیان مولکول CTLA-4 بر سطح لنفوسیت‌های T شده و منجر به افزایش فعالیت این سلول‌ها می‌گردد که افزایش فعالیت لنفوسیت‌های T در سرکوب سرطان تأثیر مثبت داشته ولی ممکن است منجر به ایجاد بیماری‌های خودایمنی گردد (4). از طرف دیگر پلی‌مورفیسم موقعیت 318C/T- نیز بر بیان ژن اثر دارند (5). مطالعات انجام‌شده حاکی از این است که بیان مولکول CTLA-4 بر سطح لنفوسیت‌های T در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان افزایش می‌یابد که افزایش بیان این مولکول می‌تواند تحت تأثیر پلی‌مورفیسم‌های این ژن قرار بگیرد (17). تأثیر پلی‌مورفیسم‌های این ژن در بیماری‌های اتوایمیون و سرطان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. مثلاً گزارش‌هایی مبنی بر بالا بودن آلل G در موقعیت +49A/G در بیماری‌های اتوایمیون وجود دارد. مطالعاتی که در گذشته انجام شده است، ارتباط معناداری در پلی‌مورفیسم موقعیت 318C/T- در بین بیماران مبتلا به بیماری‌های خود ایمنی و گروه کنترل گزارش نکرده‌اند (25). نتایج تحقیقی که در بیماران دیابتی نوع یک انجام شده، نشان داده است که آلل G نسبت به آلل A در

جدول 2- مقایسه فراوانی آلل‌های ctla-4 در بیماران سرطان تخمدان و گروه کنترل

	لوکوس	آلل	بیمار	کنترل	P
	N		146	230	
P>0/05	-318	C	128(87/7)	213(92/6)	
		T	18(12/3)	17(7/4)	
	N	146	146	230	
P>0/05	+49	A	106(72/6)	171(74/3)	
		G	40(27/4)	59(25/7)	

همچنین در مورد پروموتور +49A/G، در گروه مورد 106 نفر (72/6%) آلل A و 40 نفر (27/4%) آلل G داشتند این نسبت در افراد کنترل به ترتیب 171 (74/3%) و 59 نفر (25/7%) بود. مقایسه فراوانی آلل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Epi Info 2000 در بیماران و گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد (P>0/05) (جدول 2).

بحث

سرطان مقوله‌ای است که با پیشرفت علم پزشکی و بالا رفتن سطح بهداشتی، پررنگ شده است. افزایش طول عمر افراد، کنترل بیماری‌های عفونی که در قدیم باعث مرگ و میر سنین پایین‌تر می‌شد و پیشرفت‌های علم پزشکی در تشخیص بیماری‌ها از دلایل این امر می‌باشند (1). در حال حاضر با پیشرفت علوم پزشکی، بحث بسیار تازه‌ای راجع به سیستم ایمنی - روانی - هورمونی مطرح می‌شود. بر این اساس بیشتر رفتارهای بیولوژیک و فیزیولوژیک انسان را به این سه محور نسبت می‌دهند و تأکید دارند که تقابل این سه محور با یکدیگر رفتار فیزیولوژیک بدن را در شرایط مختلف فراهم می‌سازد (2). لنفوسیت‌های T به‌عنوان رهبر سیستم ایمنی در نظر گرفته می‌شوند و نقش مهمی در القا یا مهار سیستم ایمنی و جهت‌دهی به فعالیت‌های آن به عهده دارند. دفاع اصلی در مقابل انواع تومورها بر عهده لنفوسیت‌های T خصوصاً

سایتوکاین‌های مهارکننده دیگری مانند TGFb-1، IL-10 و همچنین پلی مورفیسم‌های دیگر ژن ctla-4 به سادگی گذشت (28).

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح پژوهشی بررسی پلی مورفیسم ژن Cytotoxic T Lymphocyte Associated (CTLA-4) Molecule-4 در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و مقایسه آن با افراد نرمال می‌باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون به نتیجه رسیده است.

موقعیت +49 در بین این بیماران بالا است (26). در تحقیق دیگری که بر روی سرطان سینه انجام گردیده، همانند تحقیق حاضر تفاوت معناداری در پلی مورفیسم ژن ctla-4 بین بیماران مبتلا به این بیماری و گروه کنترل مشاهده نشده است (27).

نتیجه گیری

نتایج مقایسه پلی مورفیسم ژن ctla-4 در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان و گروه کنترل نشان‌دهنده این موضوع است که پلی مورفیسم‌های اشاره شده با ایجاد بیماری ارتباطی ندارد. نباید از نقش سایر عوامل ایمنی از جمله

References

- González Martín A. Anti-angiogenic therapy in ovarian cancer: a great expectation to be confirmed. Clin Transl Oncol 2009; 11(9): 559-60.
- Di Pasqua AJ, Wallner S, Kerwood DJ, Dabrowiak JC. Adsorption of the pt (II) anticancer drug carboplatin by mesoporous silica. Chem Biodivers 2009; 6(9):1343-1349
- Wong YK, Chang KW, Cheng CY, Liu CJ. Association of CTLA-4 gene polymorphism with oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2006; 35(1):51-4.
- 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
- Riley JL, June CH. the CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. Blood 2005; 105(1):13-21.
- Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. Nat Rev Immunol 2003; 3(7):544-56.
- Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. Immunol Today 1997; 18(4):175-82.
- Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. Eur J Immunol 1988; 18(12): 1901-5.
- Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. Nature 1987; 328(6127):267-70.
- Linsley PS, Nadler SG, Bajorath J, Peach R, Leung HT, Rogers J, et al. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. J Biol Chem 1995; 270(25):15417-24.
- Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. Int J Cancer 2005; 117(4):538-50.
- Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. J Immunol 1993; 151(7):3489-99.
- Pistillo MP, Tazzari PL, Palmisano GL, Pierri I, Bolognesi A, Ferlito F, Capanni P, et al. CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. Blood 2003; 101(1): 202-9.
- Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. Annu Rev Immunol 2006; 24:65-97.
- Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. J Exp Med 1992; 176(6):1595-604.
- Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. Immunity 1994; 1(9):793-801.

17. Melichar B, Nash MA, Lenzi R, Platsoucas CD, Freedman RS. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 119(1):19-27.
18. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Agostino MJ, Graham JR, Chen S, et al. Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics* 2001; 78(3):155-68.
19. Ghaderi A, Yeganeh F, Kalantari T, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudchi M, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86(1):1-7.
20. Monne M, Piras G, Palmas A, Arru L, Murineddu M, Latte G, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 2004; 76(1):14-8.
21. Zheng C, Huang D, Liu L, Björkholm M, Holm G, Yi Q, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 microsatellite polymorphism is associated with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001; 112(1):216-8.
22. Naeimi S, Ghiam AF, Mojtahedi Z, Dehaghani AS, Amani D, Ghaderi A. Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128(1-2):5-9.
23. Heward J, Gordon C, Allahabadia A, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. The A-G polymorphism in exon 1 of the CTLA-4 gene is not associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* (1999); 58: 193-5.
24. Golovina TN, Mikheeva T, Suhoski MM, Aqui NA, Tai VC, Shan X, et al. CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *J Immunol* 2008; 181(4): 2855-68.
25. Almasi S, Erfani N, Mojtahedi Z, Rajaei A, Ghaderi A. Association of CTLA-4 gene promoter polymorphisms with systemic sclerosis in Iranian population. *Genes Immun* 2006; 7(5): 401-6.
26. Mojtahedi Z, Omrani GR, Doroudchi M, Ghaderi A. CTLA-4 +49 A/G polymorphism is associated with predisposition to type 1 diabetes in Iranians. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68(2):111-6.
27. Arandi N, Talei A, Erfani N, Ghaderi A. Intercellular adhesion molecule-1 genetic markers (+241G/A and +469A/G) in Iranian women with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183(1):9-13.
28. Kaufman HL, Rao JB, Irvine KR, Bronte V, Rosenberg SA, Restifo NP. Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J Immunother* 1999; 22(6):489-96.