

## بررسی ارتباط بین پلی مرفیسم آلل G مولکول CTLA-4 در موقعیت ۴۹ در

### اگزون ۱ و استعداد ابتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱

دکتر سهیلا حاجی علی عسگر<sup>۱</sup>، دکتر محمدرضا آگاه<sup>۱</sup>، دکتر محمدرضا رضوانی<sup>۲</sup>، دکتر محمدرضا زالی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> پزشک عمومی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۲</sup> استادیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

#### چکیده

سابقه و هدف: نقش استعداد ژنتیکی در ابتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ به وسیله تمایل بیشتر ابتلا در جنس مونث و همراهی انواع ویژه آنتی ژنهای لکوسیتی انسان (HLA) در بیماران نشان داده شده است. از طرف دیگر ارتباط بین پلی مرفیسم ژنی 49A/G در اگزون ۱ ژن CTLA-4 و چندین بیماری اتوایمیون دیگر نشان داده شده است که احتمالاً ناشی از تاثیر آن در بیان مولکولی CTLA-4 می باشد. در این مطالعه فراوانی پلی مرفیسم مذکور در بیماران مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ به صورت مورد-شاهدی بررسی گردید. روش بررسی: DNA از سلول های منونوکلتر خون محیطی از ۷۶ بیمار مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ و ۱۸۵ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل تهیه گردید. ژنوتیپ مولکول CTLA-4 بوسیله تکنیک PCR-RFLP (polymerase chain reaction-) Restriction fragment length polymorphism تعیین گردید.

یافته ها: فراوانی ژنوتیپ های AA، AG و GG در بیماران به ترتیب ۵۹/۲٪، ۳۰/۳٪ و ۱۰/۵٪ و در گروه کنترل ۵۶/۲٪، ۳۸/۹٪ و ۴/۹٪ بود. فراوانی آلل G در گروه بیماران ۲۵/۶ و در گروه کنترل ۲۴/۳ درصد به دست آمد. در این مطالعه، هیچ تفاوت آماری معنی داری در توزیع ژنتیکی مولکول CTLA-4 در موقعیت ۴۹ اگزون ۱ در مبتلایان به بیماری در مقایسه با گروه کنترل بدست نیامد. نتیجه گیری: این مطالعه نشان می دهد که استعداد ابتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ در جمعیت ایرانی تحت تاثیر پلی مرفیسم های ژنی اگزون ۱ مولکول CTLA-4 در موقعیت ۴۹ نمی باشد. این پلی مرفیسم ممکن است تنها در نژاد قفقازی با بیماری هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ ارتباط داشته باشد یا آنکه مخزن ژنتیکی جدید در جمعیت ایرانی داشته باشد که در این مطالعه قابل مشاهده نیست. واژگان کلیدی: پلی مرفیسم، CTLA-4، هیپاتیت اتوایمیون.

#### مقدمه

هیپاتیت اتوایمیون یک بیماری مزمن التهابی کبد است که اگر بدون درمان رها شود منجر به سیروز و نارسایی کبدی می گردد (۲-۴). هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ که بوسیله وجود اتوآنتی بادی های ضد عضله صاف (SMA) و یا آنتی بادی های ضد هسته (ANA) در سرم مشخص می گردد شایعترین فرم بیماری می باشد و تمامی گروه های سنی، بویژه بالغین جوان را درگیر می نماید (۵، ۶). وجود استعداد ژنتیکی در ابتلا به نوع ۱ بیماری، بوسیله درگیری بیشتر جنس مؤنث و ارتباط با آلل های HLA کدکننده پپتیدهای DR نشان داده شده است (۷-۱۵).

شناخت مکانیسم های پدیدآورنده بیماری های اتوایمیون در سازمان دهی و تکامل درمان های تعدیل کننده و پیشگیری کننده در آینده مفید می باشد. در راس این عوامل، استعداد ژنتیکی قرار دارد که نقش آن در بروز اتوایمیونیتی، در تمامی مطالعات پیشین نشان داده شده است (۱).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دکتر سهیلا حاجی علی عسگر (email: soh2002@med.cornell.edu)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۶/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۱۰/۱۹

به درمانگاه سرپایی مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد بیمارستان شهید طالقانی انجام گرفت.

نمونه‌گیری به روش آسان صورت پذیرفت. متوسط سن بیماران (۵۲ زن و ۲۴ مرد)  $35/4 \pm 13/4$  سال (از ۱۷ تا ۷۳ سال) و تشخیص بیماری بر اساس سیستم نمره‌گذاری تشخیص بین‌المللی با در نظر گرفتن پارامترهای گوناگون شامل نسبت AP/AST، سطح IgG، مارکرهای اتوایمیون، مارکرهای ویروسی، شرح حال دارویی، مصرف الکل، یافته‌های بافت‌شناسی و پاسخ به درمان صورت گرفت. کلیه بیماران انتخاب شده فاقد هر بیماری اتوایمیون دیگری بودند.

جمعیت کنترل متشکل از ۱۸۵ نفر از پرسنل مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و خون‌دهندگان سالم (۹۸ زن و ۸۷ مرد) با متوسط سن  $32/1 \pm 7/5$  سال (۵۸-۱۶ سال) بودند. گروه شاهد از نظر سن با گروه بیماران مطابقت داشتند. آنزیم‌های کبدی آنها در حد طبیعی بود و تست‌های HBsAg و آنتی‌بادی ضد HCV در آنها منفی بود.

*استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: DNA*  
ژنومیک به روش هضم نمکی استخراج گردید (۱۹) و تا زمان بررسی آزمایشگاهی در دمای  $-70^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. قطعه ژنی (bp) ۳۲۸ جفت باز از اگزون ۱ ملکول CTLA-4، دربرگیرنده پلی مرفیسم A-G در موقعیت ۴۹، بوسیله پرایمرهای مخصوص استفاده شده به وسیله Bittencourt و همکاران (۲۰) در  $25 \mu\text{l}$  از محلول واکنش‌دهنده حاوی بافر PCR،  $2 \text{ mmol/L}$  کلرید منیزیم،  $10 \mu\text{mol/L}$  پیکومول از هر پرایمر،  $200 \mu\text{mol}$  از dNTP (Tehran, gene phanavaran.co) و  $0.2 \mu\text{g}$  از DNA ژنومیک و  $0.2 \text{ IU}$  از Taq پلی‌مراز (Super Taq company, England) تکثیر گردید. واکنش PCR شامل ۳۵ سیکل بود که هر سیکل شامل دناتوراسیون در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال  $57^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه، زمان امتداد یافتن رشته در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ ثانیه بود. دمای امتداد نهایی  $72^{\circ}\text{C}$  و مدت ۵ دقیقه بود.

پس از تکثیر،  $1 \mu\text{l}$  از محصول PCR بوسیله  $1 \text{ IU}$  از اندونوکلاز BbVI، به مدت ۱۶ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  تحت هضم آنزیمی قرار گرفت. این آنزیم قطعه ژنی تکثیر شده را در صورت وجود باز G در موقعیت ۴۹ قطع نموده و سبب به دست آمدن دو قطعه ژنی  $84 \text{ bp}$ ،  $244 \text{ bp}$  می‌گردد. در صورت وجود باز A، برش صورت نمی‌گرفت و محصول  $328 \text{ bp}$  دست نخورده باقی می‌ماند. سه ژنوتیپ مختلف ملکول CTLA-4 (GG)  $84 \text{ bp}$  و  $244 \text{ bp}$ ،  $244 \text{ bp}$ :AG،  $84 \text{ bp}$ ،  $244 \text{ bp}$ :AA (۳۲۸bp) بر روی

ملکول‌های HLA کلاس II، نقش برجسته‌ای در بروز پاسخ ایمنی، از طریق اتصال به پپتیدها و ارائه آنها جهت شناسایی توسط لنفوسیت‌های T ایفا می‌نمایند. این ملکول‌ها بسیار پلی مرفیک بوده و به نظر می‌رسد که تمایل بالقوه آنها در اتصال به پپتیدهای آنتی‌ژنی خودی، منجر به بروز پدیده خودایمنی می‌گردد. با این حال HLA به تنهایی، نمی‌تواند استعداد ژنتیکی در ابتلا به بیماری را به طور کامل توجیه نماید چرا که حداقل ۵۰ - ۳۰٪ بیماران، حامل شایع‌ترین آلل‌های مستعدکننده نمی‌باشند (۱۶).

CTLA-4 که بر روی کروموزم 2q33 قرار می‌گیرد، یک ملکول سطحی سلول‌های T می‌باشد و پس از فعال شدن سلول T کمکی، بر سطح آن پدیدار می‌شود. این ملکول اثر مهارتی خود را از طریق رقابت با ملکول تحریک‌کننده CD28 در اتصال به ملکول‌های B7-1، B7-2 بر روی سلول‌های ارائه‌کننده آنتی‌ژن اعمال می‌نماید (۱۷). شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که تعادل بین ملکول‌های CTLA-4 و CD28 در اتصال به لیگاند‌های مشترک آنها (ملکول‌های B7) نقش ویژه‌ای در کنترل محیطی پاسخ ایمنی سلولی به عهده دارد. بدین ترتیب فاکتورهای تنظیم‌کننده بیان یا عمل ملکول CTLA-4 می‌توانند باعث تغییر این تعادل و منجر به از دست رفتن کنترل محیطی و ایجاد پاسخهای خود ایمنی گردند (۱).

اخیراً جابجایی بازی A به G در موقعیت ۴۹ اگزون ۱ ژن CTLA-4 در استعداد ابتلا به بیماری هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ در برخی گروه‌های نژادی موثر شناخته شده است (۱۶). این جایگزینی در ژن CTLA-4 در ردیف کدکننده پروتئین منجر به قرارگیری آلانین به جای ترئونین در پروتئین بیان شده می‌گردد و نشان داده شده است که بیان ملکول CTLA-4 را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در همین راستا فراوانی آلل G، در چندین بیماری اتوایمیون دیگر از قبیل دیابت و ابسته به انسولین، بیماری سلیاک و مولتیپل اسکلروزیس گزارش شده است (۱۸). هدف از این مطالعه تعیین فراوانی پلی مرفیسم‌های اگزون ۱ ملکول CTLA-4 در موقعیت ۴۹ و ارتباط آن با بیماری در افراد ایرانی مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ و مقایسه پارامترهای آزمایشگاهی در ژنوتیپ‌های مختلف CTLA-4 در بیماران مذکور بود.

## مواد و روشها

این مطالعه با طراحی مورد - شاهدهی در ۷۶ نفر از بیماران مبتلا به هیپاتیت اتوایمیون (۵۲ زن و ۲۴ مرد) مراجعه‌کننده

هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ و دارای ژنوتیپ GG. سطوح پایینتری از ALT را در مقایسه با بیماران دارای سایر فرم‌های ژنتیکی نشان می‌دهند هر چند این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. هیچگونه یافته آزمایشگاهی دیگری مرتبط با ژنوتیپ‌های مختلف CTLA-4 در بیماران شناخته نشده. یافته‌ها در جدول شماره ۲ آورده شده است. قابل ذکر است که ارتباط معنی‌داری بین جنس و پلی مورفیسم‌های مختلف وجود نداشت.

## بحث

نتیجه مطالعه حاضر هیچ ارتباط معنی‌داری را بین پلی مورفیسم‌های اگزون ۱ ملکول CTLA-4 در موقعیت ۴۹ و هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ نشان نمی‌دهد. یافته‌های این مطالعه هماهنگ با یافته‌های گزارش شده از مطالعه Bittencourt و همکاران (۲۰) می‌باشد. این محققین مطالعه خود را بر روی ۱۰۶ بیمار مبتلا به هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ و ۶۷ فرد سالم از برزیل انجام دادند. یافته‌های آنها توزیع یکسانی از پلی مورفیسم مذکور را در گروه بیماران و افراد سالم نشان می‌دهد (۲۰).

از سوی دیگر این یافته‌ها متفاوت از نتایجی است که توسط Agrawal و همکاران گزارش شده است (۱۶). این محققین افزایشی را در فراوانی آلل G در بیماران مبتلا به هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ در اروپای شمالی نشان دادند.

علت وجود این نتایج ضد و نقیض به روشنی معلوم نیست لیکن می‌توان یافته‌های متفاوت بدست آمده از ایران و برزیل از یک سو و اروپای شمالی و آمریکا از سوی دیگر را به صورت‌های مختلف توجیه نمود.

از مدت‌ها قبل ملکول‌های HLA بویژه B8, DR4 و HLA-A1 به عنوان ریسک فاکتور در هیاتیت اتوایمیون شناخته شده‌اند (۲۴-۲۱). برای مثال افزایش فراوانی HLA-DRB1\*03 در بیماران مبتلا به هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ دارای فرمول ژنتیکی GG در مطالعه Agrawal گزارش شده است. این امکان وجود دارد که بین ملکول‌های HLA و سایر پروتئین‌های سیستم ایمنی در ناحیه MHC و یا در قسمت‌های ژنوم، سینرژی وجود داشته باشد همچنین وجود نوعی وابستگی و ارتباط بین ملکول CTLA-4 و بیماری‌های اتوایمیون مرتبط با HLA قبلاً نشان داده شده است (۱۵). بنابراین یک توجیه آن است که ژنوتیپ‌های خاصی از HLA که فرد را به هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ مستعد می‌سازند در ارتباط با ژن CTLA-4 هستند و حضور آنها در پاتوژنز هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ ضروری است.

ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰٪ به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره مورد شناسایی قرار گرفتند.

مقایسه فراوانی آلل G و A در گروه شاهد و کنترل توسط آزمون آماری مجذور خی با استفاده از نرم افزار SPSS (version 11) انجام شد. جهت مقایسه پارامترهای آزمایشگاهی در دو گروه از تست t غیرزوجی استفاده گردید. مقادیر  $p < 0.05$  از نظر آماری سطح معنی‌دار بین بیماری و پلی مورفیسم ژنی ملکول CTLA-4 در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

تعیین پلی مورفیسم ژنی ملکول CTLA-4 در اگزون ۱ در موقعیت ۴۹ در بیماران مبتلا به هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ و در جمعیت کنترل توزیع یکنواخت ژنتیکی را در هر دو گروه نشان داد. فراوانی ژنوتیپ‌های مختلف CTLA-4 بر حسب گروه‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- فراوانی ژنوتیپ‌های CTLA-4 در بیماران مبتلا به هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ و گروه کنترل

ژنوتیپ	هیاتیت اتوایمیون نوع ۱	گروه شاهد
A/A	۴۵ (۵۹/۲)*	۱۰۴ (۵۶/۲)
A/G	۲۳ (۳۰/۳)	۷۲ (۳۸/۹)
G/G	۸ (۱۰/۵)	۹ (۴/۹)

\* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ‌های CTLA-4 در بیماران دچار هیاتیت اتوایمیون نوع ۱ بر اساس پارامترهای آزمایشگاهی

سن (سال)	AA (n=۴۵)	AG (n=۲۳)	GG (n=۸)	AA & AG (n=۶۸)
جنس مونث (%)	۳۱ (۱۰-۶۴)	۲۹/۸ (۱۹-۴۳)	۳۰/۷ (۱۷-۶۴)	۴۶ (۱۷-۶۴)
(IU/l)ALT	۳۶۹/۱	۳۳۲/۱	۱۱۹/۵	۳۵۰/۶
(IU/l)AST	۴۰۶/۱	۲۸۵/۷	۴۴۵/۵	۳۴۵/۹
بیلی روبین (mg/dl)	۳/۹۵	۲/۷۵	۱/۷۵	۳/۳۵
گاما گلوبین (g/dl)	۲۸/۰	۲۲/۵	۲۱/۹	۲۵/۳

فراوانی آلل G در گروه بیماران ۲۵/۶ و در گروه کنترل ۲۴/۳ درصد به دست آمد. بررسی و مقایسه پارامترهای آزمایشگاهی در ژنوتیپ‌های مختلف بیماران، نشان داد که بیماران مبتلا به

وجود آلل G و کاهش عملکرد ملکول CTLA-4 و افزایش تکثیر T-cellها در آزمایشگاه نشان دادند. همگی این یافته‌ها نشان می‌دهند که هر یک از این پلی‌مرفیسم‌ها می‌توانند سبب تغییر بیان یا عملکرد ملکول شوند و نقشی را در بوجود آوردن شرایط اتوایمیون ایفا نمایند (۲۹). علاوه بر این در مطالعات دیگری پیوستگی نامتعادل بین پلی‌مرفیسم‌های مختلف CTLA-4 گزارش شده است (۳۰).

Holopainene و همکاران (۲۹) دریافتند که پیوستگی نامتعادل قدرتمندی بین تمامی جفت‌های نواحی پلی‌مرفیک وجود دارد. آنها نشان دادند که پلی‌مرفیسم‌هایی که قبلاً به عنوان ریسک فاکتورهای عملکردی در مطالعات مختلف گزارش شده‌اند، تقریباً همیشه به صورت همزمان و در هاپلوتیپ‌های تکرار شونده رخ می‌دهند. بنابراین بررسی تنها یک پلی‌مرفیسم، نمی‌تواند تشخیص دهد که کدامیک از اشکال مختلف ژنی سبب تفاوت‌های عملکردی می‌شود و رویکردهای موتاژنزی یا مطالعاتی که با بررسی کلیه پلی‌مرفیسم‌های مرتبط صورت پذیرد، در این خصوص راهگشا خواهد بود.

توارث بیماری‌های اتوایمیون به طور کلی بسیار پیچیده است و علت آن بیش از هر چیز وجود تعداد زیادی از ژن‌های مستعدکننده و فاکتورهای تاثیرگذار محیطی است (۱۸). یافته‌های متضاد مرتبط با فراوانی پلی‌مرفیسم‌های اگزون ۱ ملکول CTLA-4 در گروه‌های مختلف بیماران مبتلا به گریوز، بیماری سلیاک، مولتیپل اسکروزیس و دیابت نوع ۱ دیده می‌شود (۱۸). این یافته‌ها مطرح‌کننده آن هستند که هنوز ژن‌های پلی‌مرفیک ناشناخته دیگری در پیوستگی نامتعادل با آلل‌های CTLA-4 قرار دارند که می‌توانند تعیین‌کننده استعداد به بیماری و شدت آن در بیماری‌های اتوایمیون باشند. یافته‌های ما در مورد ارتباط بین هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ و اگزون ۱ ملکول CTLA-4 تاییدکننده فرضیه اخیر می‌باشد.

در حال حاضر تعیین فرمول ژنتیکی HLA در گروه بیماران، در مرکز تحقیقات گوارش و کبد در حال انجام است. از سوی دیگر این فرض نیز مطرح می‌شود که ژن‌های متفاوتی در جمعیت‌های مختلف در استعداد ابتلا به بیماری دخیل هستند و ممکن است انواع خاص موتاسیون‌های بیماریزا در تمامی گروه‌های نژادی و جغرافیایی وجود نداشته باشد، همان چیزی که تنوع ژنتیکی خوانده می‌شود (۲۵). چون بیماری مورد بررسی یک بیماری اتوایمیون می‌باشد این احتمال نیز وجود دارد که بسته به فاکتورهای محیطی، ساختار ژنتیکی به صورت‌های مختلف سبب استعداد به بیماری شود. به این ترتیب که اگر چه جمعیت‌های متفاوت همگی به بیماری یکسانی مستعد هستند لیکن فاکتورهای آنتی‌ژنی و محیطی متفاوت سبب فعال شدن موتاسیون‌های متفاوتی در ژنوم می‌گردند که فرد را مستعد می‌سازد.

از سوی دیگر این یافته‌ها ممکن است بیانگر توزیع ژنی متفاوت در مخزن ژنتیکی جمعیت در هر ناحیه جغرافیایی باشد. در واقع پلی‌مرفیسم‌های اگزون ۱ ملکول CTLA-4 در موقعیت ۴۹ تعیین‌کننده‌های اصلی استعداد ابتلا به هیپاتیت اتوایمیون نوع ۱ نمی‌باشند. در این راستا جالب است که بدانیم ۲ پلی‌مرفیسم دیگر در ژن CTLA-4 گزارش شده است. یک تکرار دی نوکلئوتیدی (به عبارت دیگر AT) در اگزون ۳، که می‌تواند سازمان‌دهنده ۲۳ نوع آلل متفاوت باشد و دیگری جایابی C به T در موقعیت ۳۱۸ در ناحیه پرموتور می‌باشد (۱۸).

Ligers و همکاران (۲۶) افزایش میزان mRNA و سطح پروتئین CTLA-4 را در ناکلین T-318 که برای A49 هموزیگوت بودند، گزارش نمودند. Hung و همکاران (۲۷) میزان تکثیر و سطح فعالیت بالاتر T-cellها را در بیماران که حامل آلل‌های بلند هستند نسبت به کسانی که آلل‌های کوتاه دارند، نشان دادند. Kouki و همکاران (۲۸) ارتباطی را بین

## REFERENCES

1. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;29:506-11.
2. Czaja AJ, Freese DK. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002;36:479-97.
3. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 2001;120:1502-17.
4. Takeuchi F, Kawasugi K, Mori M, Nakae N, Kobayashi N, Kuwata S. The genetic contribution of CTLA-4 dimorphisms in promoter exon 1 regions in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2006;35:154-5.
5. Czaja AJ, Manns MP. The validity and importance of subtype of autoimmune hepatitis: a point of view. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1206-11.

6. Czaja AJ. Diagnosis and therapy of autoimmune liver disease. *Med Clin North Am* 1996;80:973-94.
7. Ban Y, Tomer Y. Genetic susceptibility in thyroid autoimmunity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2005;3(1):20-32.
8. Czaja AJ, Strettell MD, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Donaldson PT, et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997;25:317-23.
9. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 1992;103:1041-7.
10. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, et al. Pediatric and adult forms of type 1 autoimmune hepatitis in Argentina: Evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999; 30:1374-80.
11. Vazquez-Garcia MN, Alaez C, Olivo A. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28:985-90.
12. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1906-13.
13. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL. Different HLA profiles confer susceptibility to autoimmune hepatitis type 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1394-5.
14. Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougin B. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. *Hum Immunol* 2001;62:165-9.
15. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-59.
16. Agrawal K, Czaja AJ, David EJ. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene polymorphism and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000;31:49-53.
17. Lenschow DJ, Walunas TL. CD28/B7 system of T cell stimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
18. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases-a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* 2000;1:170-84.
19. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids Res* 1988;16:1215-18.
20. Bittencourt PL, Palacios SA, Cancado EL. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1616-20.
21. Mackay IR, Morris PJ. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HLA-A1, 8. *Lancet* 1972; 2:793-95.
22. Page AR, Sharp HL, Greenberg LJ. Genetic analysis of patients with chronic active hepatitis. *J Clin Invest* 1975;56:530-35.
23. Williams RM. Increased frequency of HLA-DRW4 in chronic active hepatitis. *Vox Sang* 1978;35:366-69 (abstract).
24. Mackay IR, Tait BD. HLA association with autoimmune-type chronic active hepatitis: identification of B8-DRW3 haplotype by family studies. *Gastroenterology* 1980;79:95-8.
25. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997;6:1275-82.
26. Ligiers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2001;2:145-52.
27. Huang D, Giscombe R, Zhou Y, Pirskanen R, Lefvert AK. Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2000;105:69.
28. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000;165:606.
29. Holopainen PM, Partanen JA. Technical note: linkage disequilibrium and disease-associated CTLA4 gene polymorphisms. *J Immunol* 2001;167:2457-8.
30. Donner HC, Seidl J, Braun Rau R, Finke M, Venz P. CTLA4 gene haplotypes cannot protect from IDDM in the presence of high-risk HLA DQ8 or DQ2 alleles in German families. *Diabetes* 1998;47:1158.