ORİJİNAL ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

DOI: 10.5336/medsci.2016-54052

# Mesane Kanserli Hastalarda CTLA-4 Geni +49 A/G Polimorfizminin Araştırılması

## Investigation of CTLA-4 Gene+49 A/G Polymorphism in Patients with Bladder Cancer

Songül BUDAK DİLER[a]

[a]Biyoteknoloji Bölümü,
Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi, Niğde

Geliş Tarihi/*Received:* 30.11.2016
Kabul Tarihi/*Accepted:* 07.02.2017

Yazışma Adresi/*Correspondence:*
Songül BUDAK DİLER
Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoteknoloji Bölümü, Niğde,
TÜRKİYE/TURKEY
budakdiler@gmail.com

*Bu çalışma 23. Ulusal Biyoloji Kongresi (5-9 Eylül 2016, Gaziantep)'nde sözel olarak sunulmuştur.*

**ÖZET Amaç:** İmmünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan sitotoksik T-lenfosit antijeni 4 (CTLA-4), aktive T hücreleri tarafından eksprese edilen bir uyarıcı moleküldür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, CTLA-4 antijenindeki fonksiyon bozukluğunun çeşitli hastalıklara (behçet hastalığı, diyabet, Graves hastalığı ve sistemik lupus eritematozus) yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca CTLA-4 geni ile çeşitli kanserler (meme kanseri, osteosarkom ve servikal kanser) arasında bir ilişki olabileceği de ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, CTLA-4 geni +49 A/G polimorfizminin (rs231775) mesane kanseri hastalar için bir risk faktörü olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği araştırıldı. **Gereç ve Yöntemler:** Yaş dağılımı benzerlik gösteren, mesane kanserli 69 hasta (62,07 ± 10,48 yıl) ile kontrol grubu olarak sağlıklı 149 gönüllü kişi (61,54 ± 14,43 yıl) çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu kişilerde genotip analizi yapmak için polimeraz zincir reaksiyonu ile sınırlı parça uzunluk polimorfizm analizi kullanıldı. Veriler, ki- kare ve Hardy-Weinberg testleri ile analiz edildi. Hardy-Weinberg testi genotip frekansının dağılımları için kullanıldı. **Bulgular:** Mesane kanserli hastalarda ve kontrol grubunda, CTLA-4 geni +49 A/G polimorfizminde, AA genotipi sırasıyla 41 (%60, hastalarda), 81 (%55, kontrolde), AG genotipi 23 (%33), 54 (%36) ve GG genotipi 5 (%7), 14 (%9) olarak bulunmuştur. GG genotipinin, hastalarda kontrole göre bir düşüş gösterdiği, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (p= 0,52). **Sonuç:** Sonuç olarak, mesane kanserli hastalarında, CTLA-4 geni +49 A/G polimorfizminin genotip ve allel frekanslarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklı olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mesane neoplazileri; polimeraz zincir reaksiyonu; ctla-4 antijen; polimorfizm, genetik

**ABSTRACT Objective:** Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) is a member of the immunoglobulin superfamily. This stimulator molecule is expressed by active T cells. Recent studies have determined that dysfunction of CTLA-4 antigen leads to various diseases (Behçet's disease, diabetes, Graves' disease and systemic lupus erythematosus). It has also been suggested that there may be a relationship between the CTLA-4 gene and various cancers (breast cancer, osteosarcoma, and cervical cancer). In this study, It was investigated whether the CTLA-4 gene +49 A/G (rs231775) polymorphism could be assessed as a risk factor for bladder cancer patients. **Material and Methods:** This study included 69 patients with bladder cancer (62.07 ± 10.48 years) with similar age distribution and 149 healthy control (61.54 ± 14.43 years). Genotypes were determined by the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Data was analysed using the Chi-square test and Hardy-Weinberg test. The Hardy-Weinberg equilibrium test was used to test the distributions of genotype frequency. **Results:** AA genotype was found in 41 (60%, in patients), 81 (55%, in control), AG genotype 23 (33%), 54 (36%) and GG genotype 5 (7%), 14 (9%) respectively in patients with bladder cancer and in healthy control groups. The frequency of GG genotype in patients was less than controls, but there was no statistically significant difference in the frequencies of GG genotype between patients and controls (P=0.52). **Conclusions:** These results indicated that genotype and allele frequencies of CTLA-4 gene +49 A/G polymorphism were not statistically significant different between bladder cancer patients and control groups.

**Keywords:** Urinary bladder neoplasms; polymerase chain reaction; ctla-4 antigen; polymorphism, genetic

Copyright © 2017 by Türkiye Klinikleri

Kanser, yeni yüzyılın başından beri, genetik ve çevresel faktörler arasındaki karmaşık etkileşimlerden kaynaklanan çok faktörlü bir hastalık olarak bilinmektedir. Bu hastalığın genetik etkileşimleri tam olarak bilinmemekle birlikte birden fazla genetik faktörün rol oynadığı saptanmıştır.[1,2] Yapılan çalışmalarla, canlı dokularınlardaki neoplastik büyümeye, habis hücre popülasyonunun kontrolsüz çoğalması sebep gösterilmekte ve bu büyümede rol oynayan karmaşık moleküler mekanizmalar hala bilinmemektedir. Ayrıca, hücrelerde çeşitli etkenler sonucu oluşan genetik hasarın da, tümör oluşumunun ana tetikleyici mekanizması olabileceği düşünülmektedir.[2]

Mesane Kanseri (MK), günümüzde en çok görülen kanser türleri arasında erkeklerde dördüncü, kadınlarda yedinci sırada yer almaktadır. Bu kanser çeşidi, idrar yollarında görülen en önemli kanserdir. MK, çocuklar da dahil olmak üzere her yaş grubunda gözlenebilmektedir. Ancak orta ve ileri yaşlarda görülme sıklığı daha yüksektir. Yapılan çalışmalarda mesane kanserlerinde Ras, AKT1, Pten, p53, EGFR, Rb, c-myc gibi pek çok gende mutasyonlar gözlenmiştir. Bu genlerdeki mutasyonlar hastalığın prognozu ile de ilişkili bulunmuştur.[3-7]

Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) (Farklılaşma kümesi 152 [CD152]), T hücre yüzeyinde aktivasyon sırasında eksprese olan immünoglobülin süper ailesinin bir üyesidir.[1] CTLA-4'ün, başka bir T-hücresi yardımcı uyarıcı molekül olan CD28'e benzediği ve her ikisinin de antijen sunan hücrelerde (APC) B7.1 ve B7.2'ye bağladığı, ancak CTLA-4'ün, CD28'den daha yüksek bir afinite sergilediği bilinmektedir. Ayrıca T hücre aktivasyonunu ve sitokin salgılanmasını da baskıladığı belirlenmiştir.[8] CTLA-4 geni, kromozom 2q33 üzerinde bulunur.[1,9,10] Bu gen, bir lider sekansı, bir hücre dışı alanı, bir zar-ötesi alanı ve bir de sitoplazmik alan olmak üzere dört ayrı fonksiyonel alanları kodlayan 4 ekzondan oluşur. CTLA-4 geninde, en önemlileri +49 adenin/guanin (+49A/G), +6230G/A (CT60), -318 sitozin/timin (-318C/T), -1611G/A, ve -1722T/C polimorfizmi olmak üzere 100'den fazla tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir. Bu polimorfizmlerden, +49A/G polimorfizmi (referans tek nükleotid polimorfizm no. 231775 [rs231775]), -318C/T polimorfizmi (rs5742909), ve CT60 polimorfizmi (G/A; rs3087243), kanser üzerindeki etkileri nedeniyle en çok incelenen polimorfizmlerdir.[1]

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, CTLA-4 antijenindeki fonksiyon bozukluğunun çeşitli hastalıklara yol açtığı tespit edilmiş ve bu kapsamda, CTLA-4 gen polimorfizminin, T hücre proliferasyonunun bozulmuş kontrolü ile birlikte olduğu saptanmıştır.[1,8,11] Türk toplumunda, Behçet hastalığı, diyabet, graves hastalığı ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi birçok otoimmün hastalık ile CTLA-4 geni arasında ilişki gösterilmiştir.[12-14] Ayrıca farklı toplumlarda CTLA-4 geni ile meme kanseri, osteosarkom, servikal kanser, kolorektal kanser ve mesane kanseri gibi çeşitli kanserler arasında da bir ilişki olabileceği araştırılmıştır.[9-11,15-19]

Bu çalışmanın amacı, MK tanısı konmuş hastalarda CTLA-4 geni +49 A/G tek nükleotid polimorfizminin önemini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Niğde Devlet hastanesi ile Lüleburgaz Devlet Hastanesi Üroloji Polikliniğe başvuran, MK tanısı konmuş 69 hasta ile kontrol grubu olarak, sağlıklı ve gönüllü olan 149 kişiden alınan kanlardan elde edilen DNA örnekleri kullanıldı.

"Prostat ve Mesane Kanserlerinde Endotelial Nitrik Oksid Sentaz Geni Polimorfizmlerinin Araştırılması" başlıklı proje için alınan ve hem hastaların hem de sağlıklı kişilerin bilgilendirilmiş olur izinleri bulunan etik rapor (ÇÜ, KAEK 2013-29) kapsamındaki kanlardan elde edilen DNA örnekleri, GOKAEK 2016/93 no'lu etik rapora göre bu çalışmada kullanıldı.

Genotip analizinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve sınırlı parça uzunluk polimorfizm yöntemleri, Çelmeli ve ark.nın yapmış oldukları çalışmaya göre modifiye edilerek kullanıldı.[14] Genomik DNA'dan CTLA-4 geninin +49 A/G tek nükleotid polimorfizmini kapsayan bölgesi uygun primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı ve daha sonra elde edilen PZR ürünleri uygun restriksiyon endonükleaz enzimi (BbvI) ile kesildi (Tablo 1).

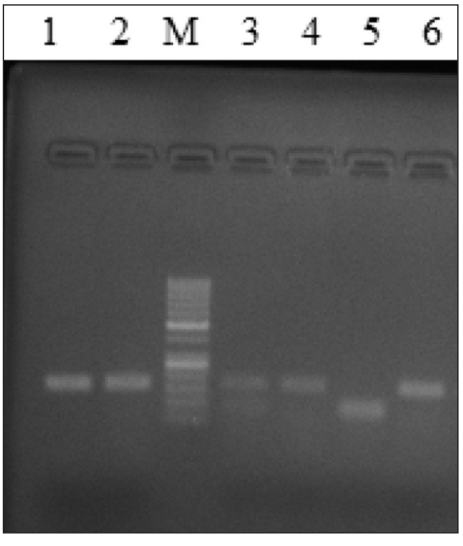
**TABLO 1:** CTLA-4 (+49 A/G) gen polimorfizmi için kullanılan primerler ve restriksiyon enzim.

| Gen Adı | TNP no | Primer | PZR ürünü | Enzim |
|---|---|---|---|---|
| CTLA-4 +49 A/G | rs231775 | F: (5'-GCTCTACCTCT TGAAGACCT-3') R: (5'-AGTCTCAC TCACCTTTGCAG-3') | 162 bp | BbvI |

PZR ve sınırlı parça uzunluk polimorfizm işlemleri sonrasında elde edilen ürünler, %2,5'lik etidyum bromürlü agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve daha sonra UV altında görüntülendi. CTLA-4 gen +49 A/G polimorfizminde, enzimin kesilmediği homozigot yabani genotipin (AA) jelde, 162 bp uzunluğunda tek bant oluşturduğu tespit edilmiştir. Enzimin kestiği mutant G allelini bulunduran heterozigot genotip AG'nin, 162 bp, 88 bp ve 74 bp uzunluğunda üç bant ve homozigot mutant genotip GG'nin ise 88 bp ve 74 bp uzunluğunda olmak üzere iki bant oluşturduğu belirlenmiştir.[14] Sınırlı parça uzunluk polimorfizm analizinin jel görüntüsü, Resim 1'de görülmektedir.

### DEĞERLENDİRME VE İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizi, SPSS paket programında yapıldı. Bu programa göre, örneklerin CTLA-4 (+49 A/G) genindeki homozigot ve heterozigot genotip frekansları ile allel frekansları, kikare ($c^2$) analizi ile karşılaştırılarak, risk oranları (OR: odds ratio) ve güvenilirlik aralıkları (Cl: %95 confidense interval) değerlendirildi. Ayrıca Hardy-Weinberg analizini yapmak için, Michael H. Court'un (2005-2008) online hesaplama yazılımı kullanıldı. (http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls).




**RESİM 1:** BbvI enzimi tarafından kesilen CTLA-4 gen +49 A/G polimorfizminin sınırlı parça uzunluk polimorfizm jel görüntüsü. 1,2,4 ve 6 no'lu hatlar AA genotipi (162 bp); M, 50 bp markır; 3 no'lu hat AG genotipi (162 bp, 88 bp, 74 bp); 5 no'lu hat GG genotipi (88bp, 74bp) göstermektedir.

## BULGULAR

Yaş dağılımı benzerlik gösteren 69 MK hastası (62,07 ± 10,48) ile kontrol grubu olarak sağlıklı ve gönül olan 149 kişi (61,54 ± 14,43) bu çalışmaya dahil edilmiştir. MK hastaları ile kontrol grubunda, yaş, cinsiyet ve sigara içme durumu gibi demografik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlanmadı.

CTLA-4 geni +49 A/G gen polimorfizmi genotip dağılımları, Hardy-Weinberg eşitliği bakımından değerlendirildiğinde, ne hastalarda ($c^2$=0,486, p=0,485) ne de kontrol grubunda ($c^2$=1,246, p=0,264) herhangi bir sapma görülmedi.

MK hastalar ile kontrol grubu arasındaki CTLA-4 geni +49A/G polimorfizmi genotip dağılımı incelendiğinde, AA, AG ve GG genotiplerinin sıklığı sırasıyla %60, %33 ve %7 iken, sağlıklı kontrolde sırasıyla %55, %36 ve %9 olarak bulundu (Tablo 2). Hastalarda, hem AG hem de GG genotipinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (AG= OR: 1,18, CI: 0,64-2,20, p=0,58 ve GG= OR: 1,41, CI: 0,47-4,20, p=0,52) (Tablo 2). AA genotipinin ise hastalarda (%60) kontrol grubuna (%55) göre daha yüksek olduğu, fakat istatistiki olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 2). Ayrıca CTLA-4 (+49 A/G) gen polimorfizminde, G alleli frekansı da gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır (OR: 1,28, CI: 0,75-1,92, p=0,42) (Tablo 2).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, CTLA-4 geni +49 A/G tek nükleotid polimorfizmi, MK hastaları ile kontrol grubunda araştırıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, MK hastalarında CTLA-4 geni +49 A/G polimorfizminin

**TABLO 2:** Mesane kanseri hastalar ile kontrol grubunda, CTLA-4 geni +49A/G polimorfizminde, genotip ve allel frekansları dağılımı.

| Gen/Gonotipler | | Hastalar n=69 n/% | Kontrol n=149 n/% | P Değeri | Odds ratio (OR) | (CI) %95 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CTLA-4 | | | | | | |
| Alleller | AA | 41 (60) | 81 (55) | - | 1 | - |
| | AG | 23 (33) | 54 (36) | 0,58 | 1,18 | 0,64-2,20 |
| | GG | 5 (7) | 14 (9) | 0,52 | 1,41 | 0,47-4,20 |
| | A | 105 (76) | 216 (72) | | | |
| | G | 33 (24) | 82 (28) | 0,42 | 1,28 | 0,75-1,92 |

genotip dağılımı ve allel frekansının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Literatürde, CTLA-4 geni +49A/G tek nükleotid polimorfizmi, özellikle G alleli ile G/G, A/G genotipi, SLE hastalığı[20] ve tip 1 diyabet gibi hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir.[21] Ayrıca yapılan meta analizlerle de bu tek nükleotid polimorfizminin çeşitli kanser hastalıklarıyla ilişkisi saptanmıştır.[1,8]

Türk toplumunda, CTLA-4 geni +49A/G polimorfizmi, Sallakcı ve ark. tarafından Behçet hastalarında çalışılmış ve hastalar ile kontrol grubu arasında allel ve genotip frekansları bakımından anlamlı bir farklılığın olmadığı gösterilmiştir.[12] Üzer ve ark. ise CTLA-4 ve CD 28 gen polimorfizmlerini, tip 2 diyabetli hastalarda çalışmışlar ve bu gen polimorfizmlerinin, tip 2 diyabetli Türk hastalarda bir risk faktörü oluşturmadığını belirlemişlerdir.[22] Çelmeli ve ark. da tip 1 diyabetli çocuklarla yaptıkları çalışmada, CTLA-4 geni +49A/G polimorfizminin bu hastalıkla ilişkili olmadığını saptamışlardır. Son yıllarda Türk toplumunda, bu gen polimorfizmi otoimmün kan hastalıklarında da çalışılmış ve bireylerde otoimmün komplikasyonların gelişmesi açısından risk oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.[23] Ayrıca Türk kolorektal kanser hastalıklarında CTLA-4 ve CD28 gen polimorfizmleri incelenmiş ve hastalarda bu polimorfizmlerin önemli bir rol oynamadığı ileri sürülmüştür.[11]

Yukarıda açıklandığı gibi, bu gen bölgesindeki polimorfizm, Türk toplumunda farklı araştırmacılar tarafından, çeşitli hastalıklarda çalışılmış ve bizim bulduğumuz sonuçlara benzer sonuçlar bulunmuştur.

Fakat Ghaderi ve ark., göğüs kanserli hastalarda CTLA-4 geni +49A/G polimorfizmini çalışmışlar ve bu hasta grubunda GG genotipini kontrole göre çok düşük bulmuşlardır. Ayrıca tümör büyüklüğü ile AA genotipi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu da belirlemişlerdir.[15] Aynı şekilde Liu ve ark. da, osteosarkomalı hastalarla yaptıkları çalışmada CTLA-4 +49A/G gen bölgesinin bu hastalık için bir risk faktörü olduğunu saptamışladır.[10] Bu gen bölgesi, Jaiswal ve ark. tarafından, Kuzey Hint popülasyonunda 200 mesane kanserli hasta ve 200 sağlıklı kontrol grubunda çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada, CTLA-4 +49A/G gen polimorfizminde GG varyantının 3.74 kat riskli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu araştırmada G allelinin de kontrole göre önemli olduğu (p= 0,010) bulunmuştur.[19] Bu sonuç da bize, Kuzey Hint popülasyonu ile bizim çalıştığımız Türk popülasyonunun CTLA-4 geni +49A/G polimorfizmi açısından risk oranlarının farklı olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, mesane kanseri ile ilişkili olduğunu düşündüğümüz CTLA-4 (+49A/G) gen polimorfizmini, MK'lı hastada ve sağlıklı bireylerde araştırdık ve elde ettiğimiz sonuçlara göre bu gende bulunan varyantın bu hastalar için bir risk faktörü olmadığını belirledik. Fakat gelecekte, daha geniş hasta grubu ile yapılacak çalışmalarla, Türk toplumundaki CTLA-4 (+49A/G) gen polimorfizminin yeniden değerlendirilmesi uygun olacaktır.

*Çıkar Çatışması*

*Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması veya finansal destek bildirmemiştir.*

### *Yazar Katkıları*

***Fikir/Kavram: Araştırma ve/veya makalenin hipotezini veya fikrini oluşturmak:*** *Songül Budak Diler;* ***Tasarım: Sonuçlara ulaşılmasını sağlayacak yöntemi tasarlamak:*** *Songül Budak Diler;* ***Denetleme/Danışmanlık: Araştırmanın/çalışmanın yürütülmesini organize etmek, ilerlemesini gözetmek ve sorumluluğunu almak:*** *Songül Budak Diler;* ***Veri Toplama ve/veya İşleme: Hastaların takibi, ilgili biyolojik materyallerin toplanması, verilerin düzenlenmesi ve raporlanması, deneylerin yapılması için sorumluluk almak:*** *Songül Budak Diler;* ***Analiz ve/veya Yorum: Bulguların mantıklı bir şekilde değerlendirilerek sonuçlandırılmasında sorumluluk almak:*** *Songül Budak Diler;* ***Kaynak Taraması: Çalışma için gerekli kaynak taramasında sorumuluk almak:*** *Songül Budak Diler;* ***Makalenin Yazımı: Çalışmanın tamamının ya da önemli bölümlerinin yazılmasında sorumluluk almak:*** *Songül Budak Diler.*

## KAYNAKLAR


1. Zhang Y, Zhang J, Deng Y, Tian C, Li X, Huang J, et al. Polymorphisms in the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and cancer risk. Cancer 2011;117(18):4312-24.
2. Loktionov A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. Cancer Lett 2004;208(1):1-33.
3. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994;54(18):4855-78.
4. Sardi I, Dal Canto M, Bartoletti R, Guazzelli R, Travaglini F, Montali E. Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer. Eur Urol 1998;33(4):424-30.
5. Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. Br J Cancer 1999;80(5-6):904-8.
6. Buyru N, Tigli H, Ozcan F, Dalay N. Ras oncogene mutations in urine sediments of patients with bladder cancer. J Biochem Mol Biol 2003;36(4):399-402.
7. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. Cancer Metastasis Rev 2009;28(3-4):305-16.
8. Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. Cancer Res 2008;68(17):7025-34.
9. Wang L, Li D, Fu Z, Li H, Jiang W, Li D. Association of CTLA-4 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han population. BMC Cancer 2007;7(1):173.
10. Liu J, Wang J, Jiang W, Tang Y. Effect of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, TNF-alpha polymorphisms on osteosarcoma: evidences from a meta-analysis. Chin J Cancer Res 2013;25(6):671-8.
11. Dilmec F, Ozgonul A, Uzunkoy A, Akkafa F. Investigation of CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms in a group of Turkish patients with colorectal cancer. Int J Immunogenet 2008;35(4-5):317-21.
12. Sallakci N, Bacanli A, Coskun M, Yavuzer U, Alpsoy E, Yegin O. CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease. Clin Exp Dermatol 2005;30(5):546-50.
13. Ulker M, Yazisiz V, Sallakci N, Avci AB, Sanlioglu S, Yegin O, et al. CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. Int J Immunogenet 2009;36(4):245-50.
14. Çelmeli F, Türkkahraman D, Özel D, Akçurin S, Yegin O. CTLA-4 (+49A/G) polymorphism and type-1 diabetes in Turkish children. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2013;5(1):40-3.
15. 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.
16. Gokhale P, Kerkar S, Tongaonkar H, Salvi V, Mania-Pramanik J. CTLA-4 gene polymorphism at position +49 A>G in exon 1: a risk factor for cervical cancer in Indian women. Cancer Genet 2013;206(5):154-61.
17. Farbod M, Shiryazdi SM, Harazi H, Nazari T, Sheikhha MH. Association between the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms and breast cancer risk and prognosis. J Cancer Metastasis Treat 2015;1(1):16-20.
18. Qiu H, Tang W, Yin P, Cheng F, Wang L. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 polymorphisms and susceptibility to cervical cancer: a meta-analysis. Mol Med Rep 2013;8(6):1785-94.
19. Jaiswal PK, Singh V, Mittal RD. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene polymorphism with bladder cancer risk in North Indian population. Mol Biol Rep 2014;41(2):799-807.
20. Devaraju P, Gulati R, Singh BK, Mithun CB, Negi VS. The CTLA4 +49 A/G (rs231775) polymorphism influences susceptibility to SLE in South Indian Tamils. Tissue Antigens 2014;83(6):418-21.
21. Ei Wafai RJ, Chmaisse HN, Makki RF, Fakhoury H. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. Saudi J Kidney Dis Transpl 2011;22(2):273-81.
22. Uzer E, Dilmec F, Akkafa F, Boduroglu O, van Kuilenburg AB. Investigation of CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms in patients with diabetes mellitus type 2 using PCR-RFLP in a Turkish population. West Indian Med J 2010;59(3):235-40.
23. Aktürk F, Hançer VS, Küçükkaya R. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) A49G polymorphism and autoimmune blood diseases. Turk J Haematol 2010;27(2):78-81.