Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 14(59): 82-88

The role of PD-1 gene promoteric allele A in rheumatoid arthritis in Iranian patients

Tahoori MT(M.Sc)[1], Pourfathollah AA(Ph.D)[1*], Daneshmandi S(M.Sc)[1], Akhlaghi M(M.D)[2]

1- Department of Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Department of Rheumatology, Rheumatology Research Center, Shariati Hospital, Tehran, Iran

Received: 9 May 2011, Accepted: 16 Jan 2010

Abstract

Background: Programmed death 1 (PDCD1), a negative T-cell regulator which induces peripheral tolerance, belongs to Ig super and CD28/CTLA-4 families. PD-1 gene induces negative signals in T-cells during interaction with its ligands. Thus the aim of this study was to investigate the relationship between PD-1 polymorphism and the risk of rheumatoid arthritis (RA) in Iranian patients and healthy controls.

Materials and Methods: In this case-control study, genomic DNA was extracted from the whole blood samples using DNA purification kit (DNG-plus, Cinnagen, Iran). PD1.1G/A as a SNP located on promoter with position -536 were genotyped for 120 RA patients and 188 healthy controls through PCR-RFLP method. Association of genotypes and alleles frequency in the patients was compared with controls and analyzed using Chi-square test and 2×2 contingency table in SPSS software version 15.0. The diagnosis of RA patients and provision of their clinical information was done in Rheumatology Research Center of Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Results: The A allele of the PD1.1 polymorphism located on the promoter of PD-1 gene was significantly more frequent in Iranian RA patients than the controls ($p=0.04$). There were no significant differences in PD1.1G/G genotype ($p=0.08$), PD1.1A/A genotype ($p=0.39$), and PD1.1G/A genotype ($p=0.16$) between RA cases and controls.

Conclusion: The findings of this study showed the presence of a significant relationship between the A allele of the PD1.1 (-536) of the promoter and susceptibility to RA in Iranian patients.

Keywords: A allele, Polymorphism, Programmed death-1, Promoter, Rheumatoid arthritis

*Corresponding author:
Address: Department of Immunology, Tarbiat Modares University, Aleahmad Highway, Tehran, Ira
Email: pourfa@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۶ (شماره پیاپی ۵۹)، بهمن و اسفند ۱۳۹۰، ۸۸-۸۲

نقش آلل A پروموتور ژن مرگ برنامه‌ریزی‌شده۱(PD-1) با آرتریت روماتوئید در بیماران ایرانی

محمد طاهر طهوری[۱]، علی اکبر پور فتح اله[۲*]، سعید دانشمندی[۱]، معصومه اخلاقی[۳]

۱- دانشجوی دکترای ایمنی شناسی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران
۲- استاد، دکترای ایمنی شناسی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران
۳ - استادیار، فوق تخصص روماتولوژی، گروه روماتولوژی، مرکز تحقیقات روماتولوژی بیمارستان شریعتی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: مولکول مرگ برنامه‌ریزی شده ۱ (PD-۱)، تنظیم کننده منفی و القا کننده تولرانس محیطی در لنفوسیت‌های T است که متعلق به خانواده بزرگ ایمونوگلوبولینی و CTLA4/CD28 می‌باشد. این ملکول در طول میانکنش با لیگاندهای خود سیگنال منفی به سلول‌های T القا می‌کند. هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین چند شکلی ژن مولکول مرگ برنامه‌ریزی شده و بیماری آرتریت روماتوئید در جمعیت ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد شاهدی استخراج DNA ژنومیک از خون کامل با استفاده از کیت DNG-PLUS شرکت سیناژن انجام گرفت. چند شکلی ژنی (SNP، PD1.1 G/A واقع در پروموتور با موقعیت ۵۳۶- ، در ۱۲۰ بیمار آرتریت روماتوئید و ۱۸۸ کنترل سالم با روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. آنالیز وابستگی فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها با بیماری در مقایسه با کنترل با استفاده از تست کای دو در نرم افزارآماری SPSS نسخه ۱۵ انجام شد. تشخیص بیماران آرتریت روماتوئید و اطلاعات بالینی آنها در مرکز تحقیقات روماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

یافته ها: آلل PD1.1 A در موقعیت۵۳۶- پروموتور ژن PD-1 با فراوانی بیشتر در بیماران ایرانی آرتریت روماتوئید در مقایسه با گروه کنترل همراه است (p= ۰/۰۴) اختلاف معنی‌داری در ژنوتیپ PD1.1G/G (p=۰/۰۸)، ژنوتیپ PD1.1A/A (p=۰/۳۹) و ژنوتیپ PD1.1G/A (p=۰/۱۶) بین بیماران و کنترل وجود نداشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین آلل A پروموتور (PD1.1(-۵۳۶ با استعداد به آرتریت روماتوئید در بیماران ایرانی را نشان داد.

واژگان کلیدی: مولکول مرگ برنامه‌ریزی شده۱، آرتریت روماتوئید، چند شکلی ژنی، پروموتور، آلل A

***نویسنده مسئول:** بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس تهران، گروه ایمنی شناسی پزشکی
Email: pourfa@modares.ac.ir

مقدمه

آرتریت روماتوئید یک بیماری شایع خود ایمن مزمن و التهابی است که با التهاب سینوویوم و تخریب غضروف و استخوان مفاصل و هم‌چنین با نفوذ و تجمع پاتولوژیک لنفوسیت‌ها در مفاصل همراه است. هر دو پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال در ایجاد این ضایعات دخیل هستند اما لنفوسیت‌های T نوع غالب سلول‌های نفوذ کننده، در التهاب مفاصل هستند. اگر چه عوامل بیماری‌زایی آن هنوز نامشخص است ولی یکی از مکانیسم‌هایی که احتمالا در بیماری‌زایی آرتریت روماتوئید و دیگر بیماری‌های خود ایمنی نقش دارد، فعال شدن لنفوسیتی تنظیم نشده و شکست تحمل محیطی این سلول‌ها می‌باشد(۱). مولکول PD-1 (یا همان PDCD-1,CD279,SLEB2) یک تنظیم کننده منفی لنفوسیت‌های T است(۲، ۳)، که متعلق به خانواده گیرنده‌های کمک محرک CTLA4/ CD28 و عضوی از ابر خانواده ایمنوگلوبولین است که یک گلیکوپروتئین ۵۵- ۵۰ کیلو دالتون عبوری از غشا تیپ I را کد می‌کند(۸-۴) و به صورت مونومریک روی سطح سلول وجود دارد زیرا سیستئین پروکسیمال غشایی که برای دایمریزه شدن دیگر اعضای خانواده CD28 مورد نیاز است، وجود ندارد(۸). دومین سیتوپلاسمیک PD-1 یک موتیف گیرنده ایمنی مهاری تیروزینی (ITIM) دارد که نقش مهمی در تنظیم منفی و هموستاز پاسخ‌های ایمنی و مهار عملکرد لنفوسیت‌های T و B و در نتیجه حفظ تحمل محیطی آنها به عهده دارد(۳). PD-1 به عنوان یک گیرنده ایمنی مهاری، روی سطح سلول‌هایی مثل T، B و سلول‌های میلوئیدی به محض فعال شدن این سلول‌ها بیان می‌شود و با اتصال به لیگاندهای خانواده B7، شامل PDL-1(B7-H1) و PDL-2(B7-DC) تکثیر و ترشح سایتوکین‌ها را از این سلول‌ها مهار می‌کند(۷، ۹). موش‌های با نقص PD-1(C57BL/6)، گلومرولونفریت شبیه لوپوس و آرتریت پیشرونده را نشان می‌دهند که پیشنهاد دهنده ژن مستعد برای تنظیم منفی سیستم ایمنی در ایجاد خود ایمنی است(۱۰).

بنابراین بر اساس این یافته‌ها در مدل حیوانی که عملکرد صحیح این ژن در تنظیم منفی و هموستاز پاسخ‌های ایمنی نقش ویژه و تاثیر گذار دارد، احتمالا چند شکلی‌های ژنی (SNPs) آن (از جمله در پروموتور) می‌تواند در بیان یا عملکرد آن در ایجاد بیماری‌های خودایمن از قبیل آرتریت روماتوئید، لوپوس اریتروماتوزسیستمیک، مولتیپل اسکلروز و دیابت نوع یک در انسان دخیل باشد. امروزه بیش از ۳۰ چند شکلی ژنی (SNPs) در این ژن مشخص شده است و ارتباط آنها با بیماری‌های خودایمن مختلف ارزیابی شده است(۱۴-۱۱). در این مطالعه یک چند شکلی ژنی در پروموتور ژن PD-1 به نام PD-1.1 (G/A ۵۳۶-) انتخاب کردیم و ارتباط بین ژنوتیپ و آلل‌های مختلف این SNP در بیماران ایرانی با آرتریت روماتوئید بررسی شد (شماره دستیابی به توالی کامل ژن PD-1 از AF363458:GeneBank).

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد شاهدی، ۱۲۰ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید از مرکز تحقیقات روماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران با همکاری روماتولوژیست‌ها و تشخیص بالینی بیماران بر طبق معیارهای بالینی دانشکده روماتولوژی آمریکا در این مطالعه شرکت کردند(۱۵)، هم‌چنین ۱۸۸ نفر فرد سالم (بدون هیچ سابقه‌ای از بیماری‌های خود ایمنی از جمله آرتریت روماتوئید در خود و خانواده) نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. برای تمام بیماران تست‌های آزمایشگاهی از قبیل فاکتور روماتوئید (RF) و سرعت رسوب گلبول‌های قرمز (ESR) انجام شد. رضایت آگاهانه از افراد جهت شرکت در مطالعه در هر دو گروه در فرم‌های مربوطه گرفته شد. کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران گواهی مربوط به این مطالعه را صادر کرد. خون کامل از بیماران و گروه کنترل در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد. در ابتدا این خون کامل با بافر لیز کننده حاوی آمونیوم کلراید جهت لیز گلبول‌های قرمز مجاور و تا سه بار شستشو انجام شد. سپس

از رسوب لکوسیتی به دست آمده از مرحله قبلی برای استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA(DNG-PLUS سیناژن ایران) بر طبق دستور کیت استفاده شد. حداقل غلظت DNA استفاده شده به عنوان الگوی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر بود که در بافر Tris-EDTA و در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شد. چند شکلی واقع در پروموتور ژن PD-1 معروف به PD1.1G/A با موقعیت ۵۳۶- (از محل شروع ترجمه) در این مطالعه با روش PCR-RFLP و با استفاده از آنزیم محدودگر MspI (Fermentase,England) تعیین ژنوتیپ شد. در این روش محصول PCR پس از مجاورت با آنزیم محدودگر اختصاصی SNP مورد نظر در دمای بهینه عملکرد آنزیم هضم شده و با توجه به ژنوتیپ، طول متفاوتی از قطعات هضم شده را بعد از الکتروفورز روی ژل آگارز نتیجه می‌دهد. جفت پرایمر مورد نیاز، بر اساس توالی کامل ژن PD-1 (با شماره بازیابی AF363458:GeneBank) و مقالات مرتبط با این چند شکلی و ارزیابی آن توسط نرم افزارOLIGO V6 به دست آمد(۱۶). اطلاعات مربوط به توالی پرایمر و چند شکلی مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱. چند شکلی ژنی مورد مطالعه ، پرایمر و آنزیم محدودگر استفاده شد.

SNP	SNP موقعیت	محل	روش کار	آنزیم محدودگر	پرایمرهای استفاده شده جهت PCR
PD1.1	G/A۵۳۶-	پروموتور	PCR-RFLP	Msp I	Forward: TTCTAGCCTCGCTTCGGTTA Reverse: CTCAACCCCACTCCCATTCT

SNP: چند شکلی نوکلئوتیدی

شرایط بهینه برای PCR به منظور تکثیر قطعه ژن حاوی چند شکلی مورد نظر شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای۴ دقیقه، سپس با ۳۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و دمای اتصال در ۶۰ درجه سانتی‌گراد (بهینه شده بر اساس دمای ذوب پرایمر) برای ۵۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه دنبال می‌شود. محصول نهایی PCR برای PD-1.1 به طول ۵۵۲ جفت باز پس از هضم با آنزیم محدودگر MspI (Fermentase) قطعاتی به طول ۲۲۷جفت باز برای آلل G و ۲۸۲ جفت باز برای آلل A است. هضم آنزیمی محصول PCR توسط MspI با انکوباسیون در طول شب در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس الکتروفورز روی ژل آگارز ۲/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الگوی شکستگی، طول قطعات و در نتیجه ژنوتیپ فرد مورد نظر را مشخص کرد. فراوانی ژنوتیپ و آلل گروه بیماران و کنترل با استفاده از آزمون آماری کای دو مقایسه شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام شد.

یافته ها

۶۸/۳ درصد از بیماران RF مثبت و میانگین برای ESR، ۱۶/۶±۲۹/۵ بود. در گروه مورد ۱۶مرد و ۱۰۴ زن با محدوده سنی ۱۷ تا ۷۶ سال و در گروه کنترل ۶۵ مرد و۱۲۳ زن با محدوده سنی ۱۷ تا ۶۳ سال قرار داشتند.

نتایج نشان دادند که آللA PD1.1 در موقعیت ۵۳۶- واقع در پروموتور ژن PD-1 در بیماران با آرتریت روماتوئید به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر است (۲/۹ درصد در بیماران در مقایسه با ۰/۷ درصد در گروه کنترل، P=۰/۰۴۲ ، OR=۳/۷). ژنوتیپ های مرتبط با این چند شکلی ژنی درمقایسه فراوانی بین گروه بیماران و کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. فراوانی آلل و ژنوتیپ و نتایج آماری در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۲. مقایسه فراوانی آلل و ژنوتیپ PD1.1 بیماران با آرتریت روماتوئید در مقایسه با کنترل گروه کنترل

SNP	ژنوتیپ	آلل	بیماران آرتریت روماتوئید (n=۱۲۰)	کنترل (n=۱۸۸)	OR	p
PD1.1	PD1.1AA		۱(۰/۸۳)	۰(۰)	۲/۵۸	۰/۳۹۰
	PD1.1GA		۵(۴/۱۶)	۳(۱/۵۹)	۲/۶۹۱	۰/۱۶۷
	PD1.1GG		۱۱۴(۹۵)	۱۸۵(۹۸/۴)	۰/۳۰۸	۰/۰۸۴
		PD1.1A	۷(۲/۹۱)	۳(۰/۹۷)	۳/۷۳۵*	*۰/۰۴۲
		PD1.1G	۲۳۳(۹۷/۰۸)	۳۷۳(۹۹/۲۰)		

بحث

فعال شدن لنفوسیتی دقیقاً به وسیله سیگنال‌های مثبت و منفی تنظیم می‌شود. این سیگنال‌ها از طریق گیرنده‌های تنظیمی ایمنی مختلف دریافت می‌شود(۱۷). یک نقص در سیگنال منفی از گیرنده‌های ایمنی مهاری ممکن است آستانه فعال شدن لنفوسیتی خود واکنش گر را کاهش دهد و منجر به ایجاد بیماری خود ایمن گردد. این ادعا با بیان فنوتیپ خود ایمن و یا افزایش فعالیت لنفوسیتی در موش‌های دستکاری شده ژنتیکی در PD-1 و دیگر گیرنده‌های ایمنی مهاری مثل FCγRIIB ،CD22 و CTLA-4 اثبات شده است(۲۲-۱۸)، بنابراین سیگنال‌های منفی شروع شده به وسیله گیرنده‌های ایمنی مهاری نقش مهمی در حفظ تحمل محیطی در موش ایفا می‌کنند. در انسان سهم گیرنده‌های ایمنی مهاری ومولکول‌های سیگنال آنها برای ایجاد بیماری‌های خود ایمن نامشخص باقی مانده است، با این وجود گیرنده‌های مهاری ذکر شده به عنوان ژن‌های کاندید در مطالعات SNPs برای بررسی امکان ارتباط آنها با بیماری‌های خود ایمن انسانی از قبیل آرتریت روماتوئید و لوپوس اریتروماتوزسیستمیک استفاده می‌شوند. بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان فرض کرد که SNP بررسی شده در پروموتور ژن۱-PD(PD1.1G یا آلل وحشی به PD1.1A یا آلل موتانت) ممکن است منجر به عدم عملکرد صحیح این ژن در ایجاد و حفظ تحمل محیطی و در نتیجه ایجاد بیماری‌های خود ایمن از جمله آرتریت روماتوئید گردد.کونگ و همکاران ارتباط آلل PD1.1A و پیش‌گیری از آرتریت روماتوئید را در بیماران چینی نشان دادند که به طور مخالف در مطالعه ما آلل A به عنوان آلل خطر در نظر گرفته شده است. در واقع نتایج ما حاکی از افزایش فراوانی آلل A در گروه بیماران است در حالی که در مطالعه کونگ و همکاران آلل A با فراوانی کاهش یافته در بیماران و به عنوان آلل پیش‌گیری کننده از آرتریت روماتوئید شناخته شده است. از مطالعه ما می‌توان نتیجه گرفت که آلل PD1.1G به عنوان آلل شایع در جمعیت ایرانی می‌باشد(۹۹ درصد) که از لحاظ فراوانی تقریباً مشابه جمعیت اروپایی و افریقایی است و به طور معکوس آلل A در جمعیت چینی‌ها و مکزیکی-هندی‌ها آلل غالب محسوب می‌شود(۱۲). از جمله SNP مهم دیگر ژن PD-1 که در مطالعات بررسی شده است، PD1.3G/A با موقعیت ۷۱۴۶+ در چهارمین اینترون و به عنوان افزاینده می‌باشد. این یک SNP تنظیمی و محل اتصال فاکتور رونویسی RUNX1 است که آلل A آن منجر به مهار اتصال این فاکتور رونویسی و در نتیجه کاهش بیان ژن PD-1 می شود و بنابراین ارتباط آن با بیماران آرتریت روماتوئید در جمعیت ایران قابل بررسی خواهد بود(۱۱، ۲۳).

نتیجه گیری

آلل A PD1.1 در موقعیت ۵۳۶- واقع در پروموتور ژن PD-۱ در بیماران با آرتریت روماتوئید به عنوان آلل خطر و با افزایش استعداد ابتلا به این بیماری شناخته شد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان نامه کارشناسی ارشد و در دانشگاه تربیت مدرس با همکاری مرکز تحقیقات روماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است

لذا از زحمات دانشجویان وکارشناسان گروه ایمنی شناسی پزشکی و هم‌چنین مرکز تحقیقات روماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌نماییم. هم‌چنین از تمام افرادی که در این مطالعه به عنوان بیمار و یا فرد سالم شرکت کرده‌اند صمیمانه سپاسگذاریم.

منابع

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology: Saunders Elsevier; 2007.
2. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science. 2001; 291(5502): 319-22.
3. Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. Trends Immunol. 2001;22(5):265-8.
4. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992; 11(11): 3887-95.
5. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics. 1994;23(3):704-6.
6. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. Int Immunol. 1996; 8(5):765-72.
7. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. 2000; 192(7):1027-34.
8. Zhang X, Schwartz JC, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. Immunity. 2004; 20(3): 337-47.
9. Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. J Immunol. 2003;170(2):711-8.
10. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity. 1999;11(2):141-51.
11. Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet. 2002; 32(4):666-9.
12. Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Alarcón-Riquelme M, et al. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. Arthritis Rheum. 2005;52(4):1058-62.
13. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. Tissue Antigens. 2003;62(6):492-7.
14. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2005; 58(1): 50-7.
15. Arnett FC. Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Orthop Nurs. 1990; 9(2): 58-64.
16. Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. Arthritis Rheum. 2004;50(8):2590-7.
17. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J Clin Invest. 2002;109(3):295-9.
18. Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. Immunity. 2000;13(2):277-85.
19. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. Science. 1996; 274(5288): 798-801.

20. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science. 1995;270(5238):985-8.
21. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fcgamma receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. Arthritis Rheum. 2002; 46(5): 1242-54.
22. Hatta Y, Tsuchiya N, Matsushita M, Shiota M, Hagiwara K, Tokunaga K. Identification of the gene variations in human CD22. Immunogenetics. 1999; 49(4):280-6.
23. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, et al. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. Arthritis Rheum. 2004; 50(6): 1770-3.