

Association Analysis of LOC387715 Gene Polymorphism (A69S) rs10490924 with Age-Related Macular Degeneration in a Population of Tabriz

Fat-hi T¹, Bonyadi M^{2*}, Javadzadeh AR³, Jabbarpour Bonyadi MH⁴

1. Department of Biology, School of Genetics, Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Center of Excellence for Biodiversity, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, Tabriz, Iran

4. Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +98413357622 Fax: +984133357239 E-mail: Jabbarpour@tabrizu.ac.ir

Received: Oct 12, 2015

Accepted: Sep 26, 2016

ABSTRACT

Background & objectives: Age-related macular degeneration (AMD) is a disease affecting the central vision and causing irreversible blindness in aging patients. AMD is a complex disease caused by the actions and interactions of multiple genes and environmental factors. Genomic region at chromosome 10q26 may have a bigger role in susceptibility to AMD. Age-related maculopathy susceptibility 2 (LOC387715/age-related maculopathy susceptibility 2(ARMS2)) gene at 10q26 is associated with the risk of AMD. Here we studied (A69S) rs10490924 polymorphism of *LOC387715* gene in AMD patients from East Azerbaijan province of Iran.

Methods: In this case-control study, the association of G>T in *LOC387715/ARMS2* (A69S) rs10490924 polymorphism was investigated in 63 patients suffering from AMD and 150 healthy age, sex and ethnicity matched unrelated people as control group from northwest of Iran by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP).

Results: Statistical analysis showed high frequency of TT genotype in AMD patients (34.92%) compared to those of control group (6.67%), (p value=0.000 OR=11.9). The frequency of heterozygotes (GT) was 32.67% in control group and 38.1% in the case group ($p=0.422$). The frequency of homozygotes (GG) was 60.66% in control group and 26.98% in the case group ($p=0.000$). Genotype analysis of *LOC387715* like other studies in Chinese, Japan and a population in Iran revealed significant association in distribution between patients and controls.

Conclusion: The data suggest that individuals from East Azerbaijan carrying TT genotype in *LOC387715* have 11.9 times more risk of developing AMD compared to those carrying non-TT genotypes.

Keywords: Age Related Macular Degeneration; Polymorphism; *LOC387715* Gene.

بررسی همراهی پلی مورفیسم rs10490924 (A69S) ژن LOC387715 با بیماران مبتلا به دژنراسیون وابسته به سن ماکولا در جمعیتی از شهر تبریز

طناز فتحی^۱، مرتضی بنیادی^{۲*}، علیرضا جوادزاده^۳، محمد حسین جبارپوربنیادی^۴

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده ژنتیک، دانشگاه آزاد تبریز، تبریز، ایران ۲. قطب علمی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران ۳. گروه چشم پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران ۴. مرکز تحقیقات چشم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۵۷۶۲۲ فاکس: ۰۴۱۳۳۳۵۷۲۳۹ پست الکترونیک: Jabbarpour@tabrizu.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (AMD) بیماری است که نواحی مرکزی رتین و کروئید را تحت تاثیر قرار می‌دهد و منجر به از دست دادن دید مرکزی می‌شود. مطالعات در زمینه اتیولوژی این بیماری پیشنهاد می‌کند که AMD یک بیماری پیچیده می‌باشد که در اثر واکنش‌ها و میان‌کنش‌های چندین ژن و عوامل محیطی ایجاد می‌شود. یکی از ژن‌های شناخته شده در مورد این بیماری، ژن LOC387715 می‌باشد. جایگاه این ژن بر روی کروموزوم ۱۰ بوده و پروتئینی تولید می‌کند که احتمالاً با بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا ارتباط دارد. هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم rs10490924 (A69S) این ژن با بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا در جمعیتی از شهر تبریز در دو گروه بیمار و کنترل بود.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی ۶۳ نفر به عنوان گروه بیمار و ۱۵۰ نفر به عنوان گروه کنترل از منطقه مورد نظر در پلی مورفیسم rs10490924 (A69S) ژن LOC387715 مورد بررسی قرار گرفت. ژنوتیپ آنها با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و چند شکلی طول قطعات هضم شونده تعیین و با تعیین توالی تعدادی از نمونه‌ها مورد تایید قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۶۳ بیمار مورد بررسی ۱۷ نفر (۲۶/۹۸٪) دارای ژنوتیپ GG، ۲۴ نفر (۳۸/۱٪) با ژنوتیپ GT و ۲۲ نفر (۳۴/۹۲٪) باقی دارای ژنوتیپ TT بودند. در گروه کنترل نیز ۹۱ نفر (۶۰/۶۶٪) ژنوتیپ GG، ۴۹ نفر (۳۲/۶۷٪) هتروزیگوت و ۱۰ نفر (۶/۶۷٪) دارای ژنوتیپ TT بودند. مقادیر p-value محاسبه شده برای ژنوتیپ GG و TT معنی‌دار بوده و کمتر از ۰/۰۰۰ بود. OR برای ژنوتیپ TT در حدود ۱۱/۹ بود. آنالیز آماری نشان دهنده فرکانس بالای ال T در گروه بیمار (۵۴٪) در مقایسه با گروه کنترل (۲۳٪) بود. همانند مطالعات قبلی در جمعیت‌های چین و ژاپن، و در جمعیتی در ایران، در مطالعه حاضر نیز ارتباط معنی‌داری بین آل T و بیماری AMD وجود دارد.

نتیجه گیری: وجود ژنوتیپ TT در افراد احتمال بیماری AMD را ۱۱/۹ برابر نسبت به افرادی که ژنوتیپ غیر از TT دارند، افزایش می‌دهد و ژنوتیپ GG نقش محافظتی در برابر این بیماری دارد.

واژه‌های کلیدی: دژنراسیون وابسته به سن ماکولا، پلی مورفیسم، ژن LOC387715

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۵

مشخصه اصلی بیماری تجمع رسوب‌هایی به نام دروزن تشکیل یافته از لیپید و پروتئین در اپی تلیوم رنگ‌دانه‌ای شبکیه می‌باشد. این بیماری از نظر بالینی

مقدمه

دژنراسیون وابسته به سن ماکولا یکی از علل نابینایی غیر قابل برگشت در افراد مسن می‌باشد [۱].

به جای G در کدون ۶۹ باعث تبدیل شدن اسید آمینه آلانین به سرین (A69S) می‌شود، با بیماری AMD می‌باشد. کاندا و همکاران در مطالعه خود از معنی‌دار بودن ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری AMD گزارش دادند [۲۵]. در مطالعه دیگری بر روی جمعیتی در فرانسه و بررسی سه پلی مورفیسم *PLEKHA1-LOC387715-HTRA1* کروموزوم ۱۰ هم ارتباط مستقل این پلی مورفیسم با بیماری AMD تایید شد [۲۶]. همچنین مطالعات دیگری در جمعیت‌های مختلف نشان‌دهنده ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری مذکور می‌باشد. با بررسی بیشتر این پلی مورفیسم و ارتباط آن با بیماری AMD در مطالعات مختلف مقدار OR برای ژنوتیپ TT این پلی مورفیسم نسبت به ژنوتیپ GG ۸/۶۱ در جمعیتی از ترکیه گزارش شد [۲۷]. همچنین خطر ابتلا به این بیماری در جمعیتی از برزیل با ژنوتیپ TT برابر ۸/۳۲ [۲۸] و در جمعیتی از ژاپن ۸/۲۱ برابر نسبت به افراد با ژنوتیپ GG گزارش شد. بر طبق این تحقیقات ژنوتیپ GG نقش محافظت‌کننده در برابر بیماری AMD داشته و افراد با ژنوتیپ TT در معرض خطر بالاتری در ابتلا به بیماری قرار دارند [۲۹]. مطالعه دیگری در یونان نیز تاییدکننده مطالعات قبلی و ارتباط معنی‌دار پلی مورفیسم ذکر شده با بیماری AMD می‌باشد [۳۰]. مطالعه حاضر نیز در صدد است ارتباط این پلی مورفیسم را با بیماری AMD در جمعیت شهر تبریز در دو گروه کنترل و بیمار بررسی کند.

روش کار

در این مطالعه مورد-شاهدی ۲۱۳ نفر در جایگاه پلی مورفیسم G/T(rs10490924) در ژن *LOC387715/ARMS2* مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند. پلی مورفیسم rs10490924:G>T در ژن *LOC387715* و جمعیت سالم و بیمار متغیرهای مورد بررسی در این پژوهش می‌باشد. از این تعداد

به دو دسته خشک و مرطوب تقسیم می‌شود. نوع خشک همراه با تغییرات در غشاء مشیمیه می‌باشد که باعث مرگ آتروفیک سلولی در مرکز شبکیه می‌شود. نوع مرطوب در اثر رشد غیرطبیعی رگ‌های خونی در زیر ماکولا ایجاد می‌شود که به آن نئوواسکولاریزاسیون کوروئید^۱ و یا رگ‌زایی چشمی نیز می‌گویند [۲]. دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (AMD) یک بیماری مالتی فاکتوریال است. مطالعات وسیع نشان داده است که عوامل خطر شامل سن، جنسیت، قومیت، سیگار کشیدن، فشارخون بالا، رژیم غذایی و عوامل ژنتیکی می‌باشد [۸-۳]. در مورد عوامل ژنتیکی، ارتباط کروموزومی مناطق 1q, 9q, 10q, 16q و 21q با این بیماری نشان داده شده است و ارتباط بین AMD و پلی مورفیسم‌های تک نوکلوتیدی متعدد به طور گسترده گزارش شده است [۹-۱۳]. اصلی‌ترین آلل‌های ایجاد حساسیت به AMD بر روی کروموزوم 1q32 در ژن *CFH*^۲ و نیز بر روی کروموزوم 10q26 در ژن‌های *HTRA1* (کدکننده سرین پروتئاز) و *LOC387715/ARMS2* (کدکننده نوعی پروتئین میتوکندریایی) قرار گرفته‌اند [۱۴-۲۴]. ژن *LOC387715/ARMS2* بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۰ (10q26) در مجاورت ژن *HTRA1* قرار گرفته است. طول آن حدود ۲/۶۹ می‌باشد. دارای تنها دو اگزون می‌باشد که mRNA رونویسی شده از آن ۸۱۸ جفت باز طول دارد. این ژن کدکننده پروتئینی است که احتمالاً با بیماری دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (AMD) ارتباط دارد. به همین دلیل ژن ایجاد حساسیت ماکولوپاتی وابسته به سن ۲ (*ARMS2*) گفته می‌شود. ژن *ARMS2* به اسم ژن *LOC387715* نیز شناخته می‌شود [۲۳]. چندین مطالعه حاکی از ارتباط معنی‌دار پلی مورفیسم G/T(rs10490924) در ژن *LOC387715/ARMS2* که با جایگزینی نوکلئوتید T

¹ Choroidal Neovascularization

² Complement Factor H

سانتی‌گراد، قطعات DNA به ترتیب زیر تکثیر شدند: تعداد ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۶ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد) سپس یک مرحله طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ۵ میکرولیتر از محصولات PCR برای اطمینان از کارکرد PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و در زیر نور UV چک شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر باقیمانده محصولات PCR توسط آنزیم *PvuII* و روش PCR-RFLP به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها برش یافتند.

محصول اصلی PCR که ۴۴۹ bp طول دارد، محلی برای برش آنزیم *PvuII* دارد و آنزیم می‌تواند دو قطعه ۲۵۹ و ۱۹۰ bp ایجاد کند ولی در صورت جایگزینی نوکلئوتید T بجای نوکلئوتید G آنزیم نمی‌تواند برشی ایجاد کند. بنابراین در نمونه‌های با ژنوتیپ GG دو باند و در ژنوتیپ GT سه باند ۱۹۰، ۱۵۹ و ۴۴۹ بازی مشاهده شدند. فراوانی هر ژنوتیپ در هر دو گروه با استفاده از نرم افزار 2x2 Contingency. به روش مربع کای آنالیز شده و p-value بدست آمد (جدول ۱).

۶۳ نفر مبتلا به بیماری AMD بودند که توسط متخصص چشم پزشکی به مرکز ژنتیک معرفی شده بودند. هر دو گروه کنترل و بیمار از شهر تبریز جمع‌آوری شده بودند و از هر دو گروه بیمار و کنترل پس از تکمیل فرم رضایت خونگیری انجام شد. DNA ژنومی از ۴ میلی لیتر خون افراد با استفاده از پروتکل استاندارد استخراج DNA (نمک اشباع) استخراج گردید. DNA استخراج شده با استفاده از روش PCR تکثیر و با استفاده از روش PCR-RFLP ژنوتیپ افراد در جایگاه A69S تعیین گردید. PCR طبق مقاله Xu و همکاران انجام شد [۳۱]. به اختصار، برای هر واکنش شامل ۱ میکرولیتر پرایمر جلوبرنده و معکوس (10PM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی مولار، ۰/۱۸ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase (10X) (شرکت سیناژن) و ۳ میکرولیتر از DNA می‌باشد که با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانیده شد. برنامه PCR به صورت زیر استفاده شد: واسرشتت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه

جدول ۱. توزیع ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم rs10490924 (A69S) ژن LOC387715 در جمعیت شهر تبریز بین گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ و آلل‌ها	گروه بیمار (درصد)/تعداد	کنترل (درصد)/تعداد	Odd ratio (95% CI)	P-value
GG	۱۷(۳۶/۹۸)	۹۱(۶۰/۶۶)	۰/۲۴ (۰/۱۲۶-۰/۴۵۴)	۰/۰۰۰*
GT	۲۴(۳۸/۱)	۴۹(۳۲/۶۷)	۱/۲۶۹ (۰/۶۸۱-۲/۳۶۵)	۰/۴۲۲
TT	۲۲(۳۴/۹۲)	۱۰(۶/۶۷)	۱۱/۹۳۴ (۴/۶۷۵-۳۱/۹)	۰/۰۰۰*
G	۵۸(۴۶)	۲۳۱(۷۷)	۰/۲۵۵ (۰/۱۳۲-۰/۴۸۹)	۰/۰۰۰*
T	۶۸(۵۴)	۶۹(۲۳)	۳/۹۲۵ (۲/۰۴۵-۷/۵۷۸)	۰/۰۰۰*

*P value < 0.05

که فرکانس TT در گروه بیماران در مقایسه با گروه کنترل بسیار بالا می‌باشد (۳۴/۹۲٪ در مقایسه با ۶/۶۷٪) و p-value محاسبه شده ۰/۰۰۰ می‌باشد. فرکانس ژنوتیپ TG در گروه بیمار ۳۸/۱ درصد و در گروه کنترل ۳۲/۶۷ درصد می‌باشد و میزان P-value محاسبه شده برای این ژنوتیپ

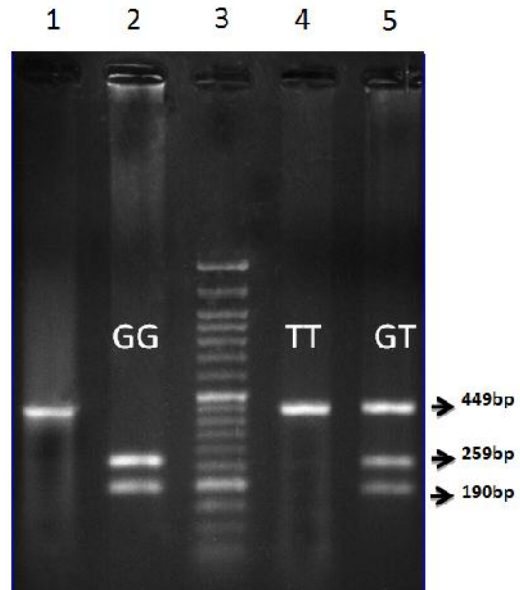
یافته‌ها

برای بررسی پلی مورفیسم rs10490924 (A69S) ۶۳ نفر بیمار و ۱۵۰ نفر به عنوان گروه کنترل که از نکته نظر جنسیت و نژاد و سن همسان‌سازی شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. توزیع ژنوتیپی بین گروه کنترل و بیمار صورت گرفت و مشاهده گردید

اتصال به پروتئین (CRP) C-reactive منجر شود. سطوح بیش از حد از CRP ممکن است به بیش فعالی سیستم کمپلمان و التهاب مزمن در ماکولا منجر شود و در نتیجه به آسیب سلولی و ذخیره رسوبات دروزنی منجر شود [۳۴]. در سال ۲۰۰۵، *CFH* اولین عامل ژنتیکی قوی شناخته شده برای AMD پیشرفته بود [۳۵]. در سال ۲۰۰۶ دو فاکتور ژنتیکی دیگر به نام‌های *HTRA1* SN(rs11200638) که یک سرین پروتئاز است و *LOC387715* SN(rs10490924) فرضی در ارتباط با این بیماری کشف شدند [۳۶]. داده‌های مطالعه حاضر ارتباط قوی بین بیماری AMD و ژن *LOC387715* را نشان داد. مطابق با مطالعاتی در چین مطالعه حاضر نشان‌دهنده خطر بالای بیماری با وجود آلل T می‌باشد [۳۷]. این یافته‌ها همچنین با مطالعه‌ای که در جمعیت ژاپن نیز انجام شد همخوانی دارد [۳۸-۴۰]. در ایران نیز مطالعه‌ای در مورد این پلی مورفیسم در جمعیتی از شهر تهران انجام شد و نتایج حاکی از ارتباط قوی آلل T با این بیماری می‌باشد [۳۲]. داده‌های بدست آمده در چندین مطالعه، حاکی از ارتباط معنی‌دار ژن *LOC387715* با خطر ابتلا به این بیماری در نژادهای مختلف می‌باشد. در مطالعات مختلف مقدار OR برای ژنوتیپ TT این پلی مورفیسم نسبت به ژنوتیپ GG 8.61 در جمعیتی از ترکیه گزارش شد [۲۷]. همچنین خطر ابتلا به این بیماری در جمعیتی از برزیل با ژنوتیپ TT برابر ۸/۳۲ [۲۸] و در جمعیتی از ژاپن ۸/۲۱ برابر نسبت به افراد با ژنوتیپ GG گزارش شد.

ژن *LOC387715* روی منطقه کروموزومی 10q26 قرار دارد که یکی از مناطق وسیع شناخته شده برای استعداد ابتلا به بیماری AMD می‌باشد. ژن *LOC387715* یک پروتئین فرضی با عملکرد ناشناخته را کد می‌کند که بیشتر در جفت بیان می‌شود، اما بیان آن در رتینا ضعیف می‌باشد [۲۳]. آلل T پلی مورفیسم ژن *LOC387715* آمینواسید ۶۹

می‌باشد. مقدار فرکانس GG در گروه کنترل و بیمار به ترتیب ۶۶/۶۰ و ۹۸/۲۶ درصد و با $p=۰/۰۰۰$ می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی‌های آماری میزان بالای آلل T را در گروه بیمار نشان داد (۶۸٪). نتایج حاصل از بررسی‌های آماری در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۱. محصول PCR ۲. ژنوتیپ GG (دو باند ۲۵۹ bp و ۱۹۰ bp که آنزیم PvuII هر دو رشته را در جایگاه G برش داده است). ۳. مارکر ۴. ژنوتیپ TT که هیچ کدام از رشته‌ها دچار هضم آنزیمی نشده است. ۵. ژنوتیپ GT تنها یکی از رشته‌ها توسط آنزیم برش داده شده است.

بحث

تحلیل وابسته به سن ماکولا یکی از علل شایع نابینایی در افراد مسن می‌باشد که علت اصلی بیماری تاکنون مشخص نشده است. نقش تنوعات ژنتیکی در بیماری AMD به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۳، ۳۲]. ژن *CFH* (واقع در کروموزوم ۱ (1q26)) که در پاسخ التهابی مزمن و تشکیل دروزن درگیر است، کدکننده پروتئینی است که در تنظیم سیستم کمپلمان که برای پاکسازی پاتوژن‌ها و باقیمانده‌های سلولی مهم است، نقش دارد. پلی مورفیسم SNP (rs1061147) ژن *CFH* ممکن است به تولید پروتئین *CFH* با کاهش توانایی در

محدود بودن تعداد نمونه‌های بیماران مورد مطالعه از محدودیت‌های این پروژه می‌باشد. این مطالعه نمی‌تواند ارتباط یک تغییر مولکولی را با یک بیماری بیان کند و صرفاً یک همراهی نسبتاً معنی‌داری را نشان می‌دهد که تفسیر علل آن از عهده این مطالعه خارج است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی افراد گروه بیمار و کنترل برای همکاری در این طرح تحقیقاتی نهایت تشکر را دارد. این مقاله حاصل کار پایان نامه مربوط به دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک دانشگاه آزاد واحد تبریز مربوط به خانم طناز فتحی می‌باشد.

آلانین پروتئین فرضی را به سرین تبدیل می‌کند. mRNA *LOC387715* در رتینا و دیگر رده‌های سلولی انسانی یافت شده است و یک پروتئین ۱۲kDa را کد می‌کند که در غشای بیرونی میتوکندری در سلول‌های پستانداران قرار می‌گیرد [۲۵]. بنابراین کاندا و همکاران پیشنهاد دادند که تغییر A69S در پروتئین *LOC387715* عملکرد احتمالی آن را در میتوکندری تحت تاثیر قرار می‌دهد و استعداد دژنراسیون وابسته به سن فوتورسپتورهای ماکولا را افزایش می‌دهد [۲۵]. اطلاعات بدست آمده نشان می‌دهد افراد با ژنوتیپ TT از آذربایجان شرقی در *LOC387715* در مقایسه با افراد با ژنوتیپ غیر از TT ۱۱/۹ برابر بیشتر در معرض پیشرفت بیماری AMD قرار دارند.

References

- 1- Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004 Apr; 122(4):564-72.
- 2- Xu L, Wang Y, Li Y, Wang Y, Cui T, Li J, et al. Causes of blindness and visual impairment in urban and rural areas in Beijing: the Beijing Eye Study. *Ophthalmology*. 2006 Jul;113(7):1134.e1-11.
- 3- Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science*. 1997 Sep 19;277(5333):1805-7.
- 4- Klaver CC, Kliffen M, van Duijn CM, Hofman A, Cruts M, Grobbee DE, et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*. 1998 Jul;63(1):200-6.
- 5- Stone EM, Braun TA, Russell SR, Kuehn MH, Lotery AJ, Moore PA, et al. Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):346-53.
- 6- Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001 Apr;108(4):697-704.
- 7- Tomany SC, Wang JJ, Van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, et al. Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology*. 2004 Jul;111(7):1280-7.
- 8- Chakravarthy U, Augood C, Bentham GC, de Jong PT, Rahu M, Seland J, et al. Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology*. 2007 Jun;114(6):1157-63.
- 9- Klein ML, Schultz DW, Edwards A, Matise TC, Rust K, Berselli CB, et al. Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q. *Arch Ophthalmol*. 1998 Aug;116(8):1082-8.
- 10- Kenealy SJ, Schmidt S, Agarwal A, Postel EA, De La Paz MA, Pericak-Vance MA, et al. Linkage analysis for age-related macular degeneration supports a gene on chromosome 10q26. *Mol Vis*. 2004 Jan 26;10:57-61.
- 11- Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zarepari S, Swaroop A, Iyengar SK, et al. Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2005 Aug 1;14(15):2257-64.

- 12- Weeks DE, Conley YP, Tsai HJ, Mah TS, Schmidt S, Postel EA, et al. Age-related maculopathy: a genomewide scan with continued evidence of susceptibility loci within the 1q31, 10q26, and 17q25 regions. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):174-89.
- 13- Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet.* 2005 Sep;77(3):389-407.
- 14- Edwards AO, Ritter R 3R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age related macular degeneration. *Science.* 2005 Apr 15;308(5720):421-4.
- 15- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005 Apr;308(5720):385-9.
- 16- Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age related macular degeneration. *Science.* 2005 Apr;308(5720):419-21.
- 17- Zarepari S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2005 Jul;77(1):149-53.
- 18- Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May;102(20):7227-32.
- 19- Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Moore AT, et al. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Feb;47(2):536-40.
- 20- Souied EH, Leveziel N, Richard F, Dragon-Durey MA, Coscas G, Soubrane G, et al. Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol Vis.* 2005 Dec;11:1135-40
- 21- Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):1049-54.
- 22- Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006 Sep;38(9):1055-9.
- 23- Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov;14(21):3227-36.
- 24- Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, et al. Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related, macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2006 May;78(5):852-64.
- 25- Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct;104(41):16227-32.
- 26- Leveziel N, Souied EH, Richard F, Barbu V, Zourdani A, Morineau G, et al. PLEKHA1-LOC387715-HTRA1 polymorphisms and exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol Vis.* 2007 Nov;13:2153-9.
- 27- Soysal Y, Inan U, Küsbeci T, Imirzalıo lu N. Age-related macular degeneration and association of CFH Y402H and LOC387715 A69S polymorphisms in a Turkish population. *DNA Cell Biol.* 2012 Mar;31(3):323-30.
- 28- Hirata FE, de Vasconcellos JP, Medina FM, Rim PH, Fulco EA, de Melo MB. Association of LOC387715/ARMS2 (rs10490924) gene polymorphism with age-related macular degeneration in the Brazilian population. *Ophthalmic Genet.* 2015;36(3):224-8.
- 29- Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, et al. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2007;52(7):636-41.
- 30- Tsiloulis AN, Zacharaki F, Kotoula MG, Chatzoulis DZ, Morrison MA, et al. Genetic variants in complement pathway and ARMS2/HTRA1 genes and risk of age-related macular degeneration in a homogeneous population from central Greece. *Ophthalmic Genet.* 2016 Sep;37(3):339-44.

- 31- Xu Y, Guan N, Xu J, Yang X, Ma K, Zhou H, et al. Association of CFH, LOC387715, and HTRA1 polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a northern Chinese population. *Mol Vis*. 2008 Jul;14:1373-81.
- 32- Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol*. 2009 Dec;87(3):234-8.
- 33- Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al. VEGF polymorphisms are associated with neo vascular age related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006 Oct;15(19):2955-61.
- 34- Wong CW, Yanagi Y, Lee WK, Ogura Y, Yeo I, Wong TY, et al. Age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Asians. *Prog Retin Eye Res*. 2016 Jul;53:107-39.
- 35- Quan YL, Zhou AY, Feng ZH. Systematic review and meta-analysis of the association between complementary factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Int J Ophthalmol*. 2012;5(2):242-6.
- 36- Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006 Nov;314(5801):992-3.
- 37- Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*. 2006 Nov;314(5801):989-92.
- 38- Mori K, Horie-Inoue K, Kohda M, Kawasaki I, Gehlbach PL, Awata T, et al. Association of the HTRA1 gene variant with age-related macular degeneration in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2007;52(7):636-41.
- 39- Tanimoto S, Tamura H, Ue T, Yamane K, Maruyama H, Kawakami H, et al. A polymorphism of LOC387715 gene is associated with age-related macular degeneration in the Japanese population. *Neurosci Lett*. 2007 Feb;414(1):71-4.
- 40- Yoshida T, DeWan A, Zhang H, Sakamoto R, Okamoto H, Minami M, et al. HTRA1 promoter polymorphism predisposes Japanese to age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2007 Apr;13:545-8.
- 41- Nazari Khanamiri H, Ghasemi Falavarjani K, Sanati MH, Aryan H, Irani A, Hashemi M, et al. Complement Factor H Y402H and LOC387715 A69S polymorphisms in association with age-related macular degeneration in Iran. *J Ophthalmic Vis Res*. 2014 Apr;9(2):181-7.