مجـلـه‌ی علمـی، پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکـی زنجـان
دوره‌ی ۱۶، شماره‌ی ٦٤، پاییـز ۱۳۸۷، صفحات ۱۱ تا ۲۰

رابطه‌ی عدم بیان پروتئین تیروزین‌کیناز بروتون و بروز جهش در نواحی غیرکدکننده‌ی ژن، در بیماران آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس

سعید ناصری[۱]، دکتر رحیم سروری‌زنجانی[۲]، دکتر زهرا پورپاک[۳]، دکتر نیما رضایی[۴]، دکتر مصطفی معین[۵]، دکتر نیما پروانه[۶]، دکتر اصغر آقامحمدی[۷]

نویسنده‌ی مسئول: تهران، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران aghamohammadi@sina.tums.ac.ir

دریافت: ۸۷/۴/۳۰ پذیرش: ۸۷/۱۰/۹

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس نوعی نقص ایمنی اولیه بوده که علایم آن شامل عفونت‌های راجعه‌ی باکتریـایی، کمبـود شدید آنتی‌بادی‌های سرمی و کاهش لنفوسیت‌های B خون می‌باشد. بروز جهش در ژن BTK موجب بروز این بیماری می‌شود. نـشان داده شـده است که در مواردی عدم بیان پروتئین Btk با جهش خاصی در نواحی کدکننده‌ی ژن همراه نیست و ممکن است در نواحی تنظیمی نظیر پروموتر یا ناحیه‌ی ابتدایی اینترون ۱ جهشی رخ داده باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان پروتئین Btk و بررسی جهش در نـواحی کدکننـده یـا نواحی تنظیمی ژن BTK در بیماران وابسته به جنس مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلـرژی دانـشگاه علـوم پزشـکی تهـران می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه ۱۱ بیمار وابسته به جنس مورد تحقیق قرار گرفتند. بیان پروتئین Btk توسط روش وسترن بـلات بررسـی شـد. در هشت بیمار بررسی جهش ژن BTK انجام شد. در سه مورد از این افراد، PCR ناحیه‌ی تنظیمی به کمک پرایمرهای طراحی شده انجام گرفـت و محصولات PCR تعیین توالی شدند.*

یافته‌ها: *بر پایه‌ی روش وسترن بلات، در سه بیمار، بیان Btk در حد نرمال و در هشت مورد دیگر، بیان وجود نداشت. بر اساس بررسی جهـش، در دو بیمار دو جهش جدید یافت شد (1038-1040 delAGG, IVS8-2delA)، در سه بیمار فاقد بیان Btk، هیچ جهشی در نواحی کدکننده و یا نواحی تنظیمی یافت نشد.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس نتایج به دست آمده، سه بیمار فاقد بیان پروتئین Btk که هیچ جهشی در نواحی کدکننده یـا نـواحی تنظیمـی ژن BTK در آن‌ها یافت نشده بود، قابل‌توجه می‌باشند. احتمال وجود جهش در نواحی تنظیمی دیگر، غیر از نواحی رایج شناخته شده وجود دارد کـه نیازمنـد تحقیقات تکمیلی خواهد بود.*

واژگان کلیدی: ***تیروزین‌کیناز بروتون، جهش غیرکدکننده، آگاماگلوبولینمی***

۱- کارشناس‌ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- دکترای میکروبیولوژی پزشکی، استادیار دانشگاه بقیه‌ا... و دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۳- دکترای ایمونولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵- فوق‌تخصص ایمونولوژی بالینی و آلرژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶- متخصص کودکان، مرکز طبی کودکان، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
۷- فوق‌تخصص ایمونولوژی بالینی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، بخش ایمونولوژی و آلرژی مرکز طبی کودکان دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیماری آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس (X-Linked Agammaglobulinemia [XLA]) نوعی نقص ایمنی اولیه است که علایم آن شامل سلول‌های B کمتر از یک درصد، کاهش تمامی ایزوتایپ‌های ایمونوگلوبولین و عفونت‌های مکرر باکتریایی می‌باشد (۲،۱). این بیماری در سال ۱۹۵۲ توسط بروتون معرفی شد (۳). در سال ۱۹۹۳، توسط دو گروه به طور جداگانه، ژن این بیماری روی کروموزوم X شناسایی شد و تیروزین‌کیناز بروتون (*BTK*) نام نهاده شد (۴،۵). اندازه‌ی این ژن حدود ۳۷/۵ کیلوباز و دارای ۱۹ اگزون بوده که ۱۸ عدد از آن‌ها کدکننده می‌باشند. طول اگزون‌ها بین ۵۵ تا ۵۶۰ جفت باز متغیر است. در ناحیه‌ی پروموتر این ژن، TATA Box و یا CAAT Box مشخصی وجود ندارد (۶،۷). این ژن، یکی از پروتئین‌های خانواده‌ی Tec به نام پروتئین Btk را کد می‌کند که نقش مهمی را در تمایز سلول‌های B برعهده دارد (۴،۵). پروتئین Btk از ناحیه‌ی N -ترمینال به سمت ناحیه‌ی C -ترمینال شامل پنج دومین PH، TH، SH3، SH2 و SH1 (دومین کینازی) می‌باشد (۶،۷). تشخیص مولکولی بیماری بروتون بر اساس بررسی جهش ژن *BTK* بوده و در اغلب بیماران مورد مطالعه، بروز جهش در این ژن منجر به نقص در بیان پروتئین Btk می‌شود (۸،۹). با این حال در موارد خاص، علی‌رغم عدم بیان پروتئین Btk، هیچ جهشی در ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن مربوطه، یافت نشده است. در این موارد، احتمال آسیب‌های تنظیمی وجود دارد (۱۰،۱۱). نشان‌داده شده است که جهش در اینترون ۱ ژن *BTK* می‌تواند عملکردی بوده و بر میزان نسخه‌برداری از ژن *BTK* تأثیرگذار باشد (۱۲). گزارشات قبلی نشان داده‌اند که در این ناحیه یک منطقه‌ی تنظیمی مثبت در نزدیکی مرز پردازش اگزون۱- اینترون ۱ و یک ناحیه‌ی تنظیمی منفی در ناحیه‌ای دورتر از این مرز موجود است که محل اتصال عوامل تنظیمی ترانس می‌باشند (۱۱). بنابراین بررسی جهش نواحی تنظیمی ژن *BTK* در بیماران فاقد جهش کدکننده و فاقد بیان پروتئین Btk ضروری خواهد بود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی و تأیید مولکولی بیماری XLA در ۱۱ بیمار مراجعه‌کننده به این مرکز بود که دارای علایم بالینی بیماری آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس بوده و با استفاده از روش‌های وسترن بلات و آنالیز جهش، مورد بررسی قرارگرفتند.

روش بررسی

این مطالعه از نوع بنیادی-کاربردی بوده و در مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفت. در این بررسی، ۱۱ بیمار غیروابسته و دارای علایم بالینی آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس، با تشخیص در مرکز طبی کودکان، وارد طرح شدند. معیار انتخاب بیمار در این افراد تاریخچه‌ی ابتلا به عفونت‌های مکرر باکتریایی، کاهش سطح ایمونوگلوبولین‌های سرمی و تعداد کم سلول‌های B (کمتر از یک درصد کل لنفوسیت‌ها) در نظرگرفته شد. تعداد و عملکرد سلول‌های T نرمال بود. به طور خلاصه این علایم بالینی به صورت عفونت‌هایی راجعه بوده که از سنین نوزادی آغاز می‌شوند و با آتروفی یا هیپوپلازی بافت لنفاوی و لوزه‌ها همراهند. این عفونت‌ها شامل برونشکتازی، سینوزیت، اسهال مزمن، اوتیت میانی و عفونت‌های غیرباکتریایی همچون عفونت‌های انتروویروسی می‌باشند (۱۳). جهت سنجش بیان پروتئین Btk، تست وسترن بلات انجام شد: سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cells [PBMCs]) توسط روش سانتریفیوژ گرادیان به کمک فایکول جداسازی و در بافر PBS1X سرد شستشو داده شدند. آنگاه هر 1×10^{6} سلول توسط سمپل بافر [بروموفنل بلو (۰/۰۵ درصد وزن به حجم)، تریس ۷۰ میلی‌مولار (PH:۶/۸)، بتامرکاپتواتانول (۵ درصد وزن به وزن)، گلیسرول (۴۰ درصد وزن به وزن)،

Archive of SID
www.SID.ir

SDS (۳ درصد وزن به حجم)] لیز شد. جهت کاهش ویسکوزیته سلولی، DNA نمونه‌ها توسط امواج فراصوت تخریب شد. لایزیت سلولی در SDS-PAGE جداسازی و سپس به غشای PVDF منتقل شد. بلات‌های بریده شده بر اساس وزن مارکر مولکولی، در مجاورت آنتی‌بادی‌های اولیه ضد Btk (Cell signaling # ۳۵۳۲) و ضدبتااکتین (Cell signaling # ٤٩٦٧) خرگوشی پروب شده و سپس در کنار آنتی‌بادی ثانویه ضدخرگوشی متصل به HRP (Cell signaling # ۷۰۷٤) انکوبه شدند. در نهایت با استفاده از سوبسترای کمی لومینسانس ECL (Amersham Biosciences, UK) و با کمک فیلم اشعه‌ی X باندهای مورد نظر ظاهر شدند.

با استفاده از روش متداول سالتینگ اوت، DNA هشت بیمار در دسترس، از سلول‌های خون محیطی، استخراج شد و مقداری از این DNA جهت یافتن جهش‌های احتمالی در ژن *BTK* به خارج از کشور ارسال شد. در آنجا، نمونه‌ها ابتدا توسط روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و تقلیب شده، مورد ارزیابی قرار گرفتند: مبنای کار این روش بر پایه‌ی ایجاد هترودوپلکس بین تک‌رشته‌ای‌های DNA وحشی و جهش‌یافته می‌باشد. مولکول‌های هترودوپلکس جهش‌یافته از هومودوپلکس‌های نوع وحشی توسط کروماتوگرافی مایع فاز معکوس بر روی ستون ماتریکس ویژه‌ای از یکدیگر جدا شدند. این ستون دارای حرارت جهت دینیچر کردن دورشته‌ای DNA می‌باشد (١٤). به طور خلاصه، ابتدا کلیه‌ی اگزون‌ها و مرزهای اینترونی توسط PCR تکثیر می‌شوند. سپس محصولات PCR به مدت ٤ دقیقه در دمای ٩٤ درجه تک‌رشته‌ای شده و سپس در دمای اتاق با سرعت یک درجه در هر دقیقه سرد می‌شوند. سپس ۳ الی ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR روی ستون حرارتی فاز معکوس، لود شده آنگاه آزادسازی DNA روی گرادیان خطی استونیتریل توسط بافر A (۰/۱ M Triethylammonium Acetate [TEAA]) و بافر B (۲۵ درصد استیرنیتریل و ۰/۱ TEAA مول) انجام می‌شود. دمایی که بهترین حد تفکیک هترودوپلکس و همودوپلکس را دارا باشد، توسط تحلیل ذوب شدن قطعات PCR شده هر اگزون به دست می‌آید. در این حالت، زمانی که دما با افزایش یک درجه‌ای، از ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به ۵۵ درجه می‌رسد، در نقطه‌ی خاصی، ۷۵ درصد از DNA موجود به صورت آلفاهلیکس خواهد بود. پس از انجام کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و تقلیب شده توسط کمپانی مربوطه، آن‌ها تمامی قطعات PCR شده را تعیین ترادف نموده و نتایج سکانس را ارسال نمودند. در سه بیمار (۹–۷)، پس از حصول نتایج تعیین ترادف نواحی کدکننده، جهت تکثیر ناحیه‌ی پروموتر، پرایمرهای:

5′-TCTGTGGGCTTATATTCCGAC-3
و 5′- GGCCCTGGAGACATATTC-3′

و برای ناحیه‌ی ابتدای اینترون ۱، جفت پرایمر:

5′- CTGAGTGGCTGTGAAAGGGT-3′ و
5′-TTTTATCTGACTGCTCCCTGC-3′

طراحی شدند و محصولات PCR جهت تعیین ترادف ارسال‌شد.

یافته‌ها

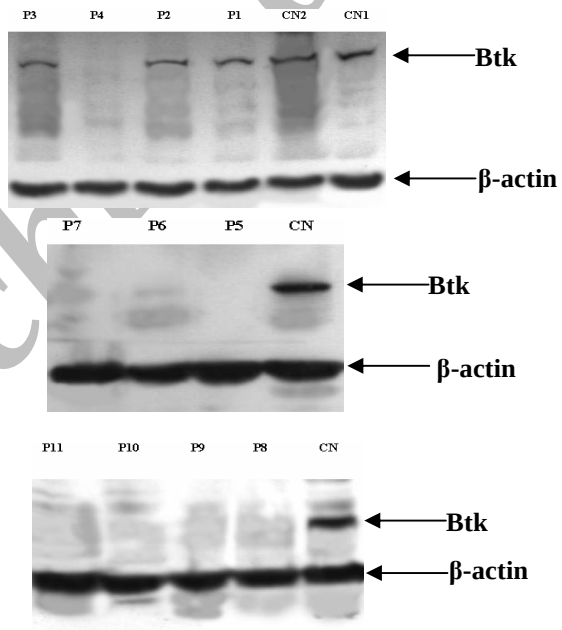
در این مطالعه، ابتدا بیان پروتئین Btk در یازده بیمار مبتلا به بیماری XLA توسط روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). در هشت مورد (بیماران ۱۱–٤) بیان پروتئین Btk مشاهده نشد (شکل۱). این موضوع با مقایسه‌ی باند Btk در نمونه‌ی نرمال و افراد بیمار مشخص شد. آنگاه نمونه‌های DNA ژنومیک بیمارانی که در دسترس بودند، استخراج شد و این نمونه‌ها جهت یافتن جهش به کمپانی مربوطه ارسال شدند. بر این اساس، هیچ‌گونه جهشی در بیماران ۳–۱ و ۹–۷ مشاهده نشد. در دو مورد، دو جهش جدید در ژن *BTK* یافت شد (جدول ۱). بیمار ۱۰ دارای حذف کدن (1038-1040 delAG) بود.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: مشخصات مولکولی و ایمونولوژیک بیماران ایرانی آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس: تحلیل جهش و سنجش بیان پروتئین Btk در این بیماران انجام شد که در سه مورد بیان نرمال Btk و در هشت مورد عدم‌بیان پروتئین Btk مشاهده شد. دو جهش جدید نیز در این بیماران یافت شد. در تمامی این بیماران، میزان ایمونوگلوبولین‌های سرمی دارای افت شدید بوده و درصد سلول‌های B کمتر از یک درصد می‌باشد.

بیمار	بیان Btk	خویشاوندی والدین	تحلیل جهش	CD۱۹	IgG	IgM	IgA
۱	بیان نرمال	بلی	موتاسیونی یافت نشد	۰/۰۷	انجام نشد	انجام نشد	انجام نشد
۲	بیان نرمال	بلی	موتاسیونی یافت نشد	۰/۰۱	انجام نشد	انجام نشد	انجام نشد
۳	بیان نرمال	بلی	موتاسیونی یافت نشد	۰/۵۵	۲۵۷	۳	۰
۴	عدم بیان	خیر	انجام نشد	۰/۳۳	۴۹	۲۹	۰
۵	عدم بیان	خیر	انجام نشد	۰	۵۲۰	۱۲۲	۳۰
۶	عدم بیان	خیر	انجام نشد	۰/۹۴	۰	۰	۰
۷	عدم بیان	خیر	موتاسیونی یافت نشد	۰/۲	انجام نشد	انجام نشد	انجام نشد
۸	عدم بیان	خیر	موتاسیونی یافت نشد	۰/۰۵	انجام نشد	انجام نشد	انجام نشد
۹	عدم بیان	خیر	موتاسیونی یافت نشد	۰/۵	انجام نشد	انجام نشد	انجام نشد
۱۰	عدم بیان	خیر	c.1038-1040 delAGG	۰/۱۷	۱۰۰	۲۵	۲۰
۱۱	عدم بیان	خیر	IVS8-2delA	۰/۴۶	انجام نشد	انجام نشد	انجام نشد

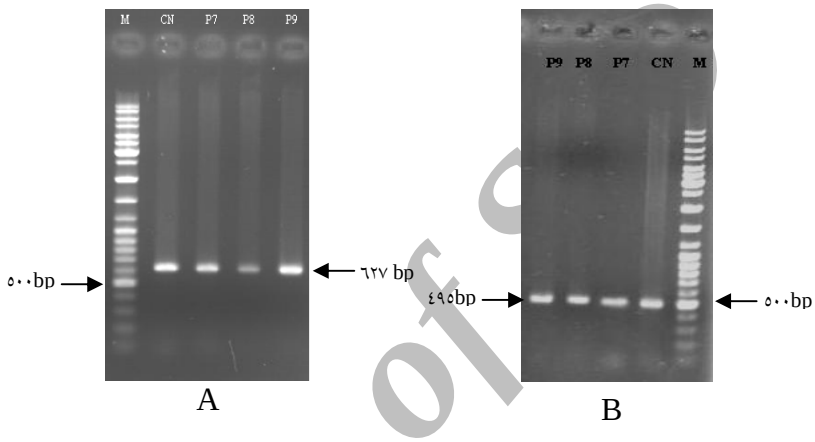
c. cDNA del. حذف (deletion) IVS: توالی فاصله‌انداز (Intervening Sequence)



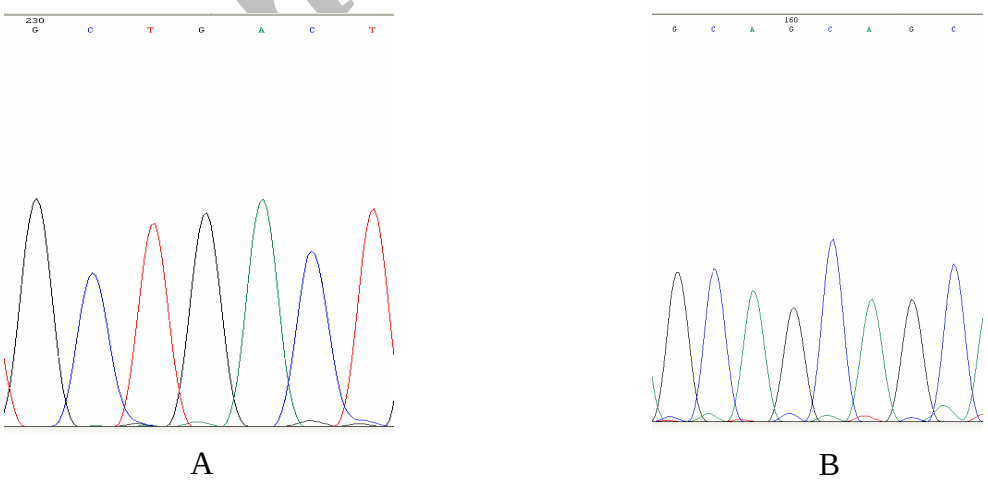
شکل۱: گراف‌های تست وسترن بلات در بیماران ایرانی XLA: *در هشت بیمار، بیان پروتئین Btk مشاهده نشد (۱۱-۴) و در سه بیمار، پروتئین Btk به صورت نرمال بیان شد (۳-۱). لایزیت 10^6 سلول از ژل آکریل‌آمید به غشای PVDF منتقل شد و غشا به دو قسمت دارای باندهای Btk و بتااکتین بریده شد. استریپ‌ها به صورت جداگانه با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ضد Btk (۷۷ کیلودالتون) و ضدبتا اکتین (۴۵ کیلودالتون) کونژوگه شدند و سپس باندهای موردنظر توسط سیستم ECL روی فیلم رادیوگرافی ظاهر شدند (CN: Control Normal).*

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه‌ی این حذف تغییر در اگزون ۱۱ به صورت حذف درون چارچوب می‌باشد که در نتیجه آمینواسید گلایسین از دومین SH_2 حذف شده است. در بیمار ۱۱ نقص پردازشی به صورت حذف نقطه‌ای در اینترون ۸ اتفاق افتاد (IVS8-2delA) که موجب بروز اشکال در ناحیه‌ی گیرنده‌ی پردازشی در اینترون ۸ شد. به دلیل این که در بیماران ۹-۷، پروتئین Btk بیان نشده بود و در عین حال هیچ‌گونه جهشی در نواحی کدکننده ژن *BTK* یافت نشد، نواحی پروموتر و اینترون۱ این ژن به عنوان مناطق مهم تنظیمی، PCR و تعیین توالی شدند (اشکال ۲و۳).



شکل۲: PCR نواحی تنظیمی در سه بیمار XLA (P7-P9): *A . ناحیه‌ی پروموتر ژن BTK در این سه بیمار PCR شد و باند ۶۲۷ جفت بازی روی ژل آگاروز ۱ درصد تأیید شد. B. باند ۴۹۵ جفت بازی مربوط به ناحیه‌ی ابتدایی اینترون ۱ ژن BTK نیز در سه بیمار فوق روی ژل ۱ درصد آگاروز مورد تأیید قرار گرفت (M:marker، CN: Control Normal).*



شکل۳: *سکانس نواحی تنظیمی ژن BTK : قسمتی از کروماتوگرام نواحی پروموتر (A) و نیز اینترون ۱ ژن BTK (B) در بیمار شماره۷ نمایش داده شده است. در هر دو مورد، هیچ‌گونه تغییری در نواحی سکانس شده مشاهده نشد. در دو بیمار دیگر نیز (۸ و ۹) توالی‌های به دست آمده مطابق با سکانس‌های فوق می‌باشد.*

www.SID.ir

سپس با استفاده از نرم‌افزار آنلاین BLAST (http://blast. ncbi. nlm.nih. gov/ Blast. cgi) هم‌تراز نمودن توالی مربوط به بیمار با توالی نرمال ژن *BTK* (www.ensembl.org) انجام شد. با این حال، در این مناطق نیز جهش یافت نشد. در سه مورد دیگر (بیماران ۳-۱)، بیان پروتئین Btk در حد نرمال ارزیابی شد و جهشی در ژن *BTK* یافت نشد (شکل ۳). از یازده بیمار بررسی شده در این مطالعه، به دلیل عدم‌دسترسی به نمونه‌های DNA سه فرد (بیماران ٦-٤)، این موارد تحلیل‌جهش نشدند و تنها بیان پروتئین آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفت و مشخص شد که در این افراد نیز نقص در بیان پروتئین Btk وجود دارد.

بحث

اصولا، تحلیل‌جهش ژن *BTK* به دلیل تعداد ۱۹ اگزون آن کاری زمانبر است (۱۵). علاوه بر این، در مواردی از نقص آنتی‌بادی با علت نامعلوم، نمی‌توان با روش تعیین توالی جهش‌ها را در ژن موردنظر پیدا نمود (۸). بنابراین اولین قدم در تشخیص مولکولی بیماری XLA، سنجش بیان یا عدم‌بیان پروتئین Btk می‌باشد. نشان داده شده است که در حدود ۹۸ درصد از موارد، بیان پروتئین Btk وجود ندارد یا کاهش یافته است (۹). با این‌حال، سنجش بیان پروتئین Btk همواره به عنوان روش تعیین‌کننده جهت تأیید مولکولی افراد مشکوک به بیماری XLA نخواهد بود. چنانچه، یک مورد با بیان نرمال پروتئین Btk و فنوتیپ شکننده (Leaky Phenotype) گزارش شده است (۱۵). همچنین برخی از جهش‌های نقطه‌ای مانند R۲۸C، بیان نرمال پروتئین Btk را به دنبال خواهند داشت (۱۶). از گروه بیمارانی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، سه بیمار (۳-۱) دارای بیان نرمال پروتئین Btk بودند. به دلیل عدم‌وجود جهش در ژن *BTK* و نیز خویشاوندی والدین بیماران، احتمال نقص در سایر اجزای مسیر سیگنالینگ گیرنده‌های سطح سلول‌های B از جمله: زنجیره‌ی سنگین μ، λ5، BLNK، زیرواحد ۸۵ کیلودالتونی فسفاتیدیل‌اینوزیتول تری‌کیناز (PI3K)، فسفولیپاز C گاما۲، Igα و Igβ وجود دارد (۱۸و ۱۷، ۸). نکته‌ی قابل‌توجه این‌که، نقص در ژن‌های اتوزومال معمولا با شروع زودهنگام عفونت‌ها و پیچیدگی‌های شدیدتر علایم بیماری در مقایسه با بیماران XLA همراهند (۸،۱۷). در سه بیمار دیگر این مطالعه (۹-۷)، با وجود عدم‌بیان پروتئین Btk، نواحی کدکننده و نیز مرزهای اگزون- اینترون سالم بودند. در این افراد، ناحیه‌ی پروموتر ژن *BTK* که دارای چندین box تنظیمی جهت اتصال عوامل نسخه‌برداری از قبیل GC box، GT box، PU1 box و ... می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). اما هیچ جهشی در این ناحیه یافت نشد. همچنین ناحیه‌ی ابتدایی اینترون ۱ نیز تحلیل‌جهش شد که در این ناحیه هم تغییری مشاهده نشد. نشان داده شده است که در ۵۰۰ باز ابتدایی اینترون ۱ ژن *BTK*، دو عنصر تنظیمی موجودند (Cis-acting Elements) که تغییرات تک‌نوکئوتیدی در آن‌ها مستقیما بر میزان نسخه‌برداری از ژن *BTK* تأثیر می‌گذارد (۱۲و۱۱). این دومین‌ها شامل یک ناحیه‌ی قوی تنظیمی مثبت در ٤۳ باز ابتدای اینترون ۱ جهت اتصال عامل ترانس PU1 می‌باشد که تغییرات A > 5G+ و G > 6T+ در این ناحیه به دلیل ایجاد اختلال در اتصال عوامل شروع نسخه‌برداری به این قسمت، مستقیما بر نسخه‌برداری ژن تأثیر می‌گذارند. ناحیه‌ی دوم در دوردست‌تر قرار گرفته است (بین بازهای ۲۸۱ و ٤۹۱) که به عنوان ناحیه‌ی تنظیمی منفی، البته با اهمیت کمتری نسبت به دومین قبل، بر میزان نسخه‌برداری مؤثر می‌باشد (۱۱). همچنین نشان داده شده است که اینترون ۱۰ ژن *BTK* دارای یک سایت متیلاسیون در سلول‌های Pre-B است که در سلول‌های B، دمتیله می‌شود (۲۰). این ناحیه و دو ناحیه‌ی مجاور

Archive of SID
www.SID.ir

متصل‌شونده به عوامل نسخه‌برداری، همچون جعبه‌های E و ناحیه‌ی AP-۲، در روند صحیح بیان پروتئین Btk مؤثرند.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب یاد شده، تنها نمی‌توان به بیان یا عدم بیان پروتئین Btk جهت تأیید قطعی بیماری آگاماگلوبولینمی وابسته به جنس اکتفا نمود. مضافا، بروز نقص در برخی از ژن‌های اتوزومال نیز ممکن است فنوتیپ‌های مشابه XLA را موجب شود. موضوع دیگر بررسی جهش‌های نادر اینترونیک در ارتباط با بیمارانی است که فاقد بیان پروتئین Btk و فاقد جهش در ژن آن می‌باشند.

منابع

1- Sideras P, Smith CI. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol*. 1995; 59: 135-223.

2- Smith CI, Notarangelo LD. Molecular basis for X-linked immunodeficiencies. *Adv Genet*. 1997; 35: 57-115.

3- BRUTON OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics*. 1952; 9: 722-8.

4- Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*. 1993; 72: 279-90.

5- Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*. 1993; 361: 226-33.

6- Ohta Y, Haire RN, Litman RT, et al. Litman GW genomic organization and structure of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase: localization of mutations associated with varied clinical presentations and course in X chromosome-linked agammaglobulinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 9062-6.

7- Sideras P, Muller S, Shiels H, et al. Genomic organization of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) loci. *J Immunol*. 1994; 153: 5607-17.

8- Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev*. 2005; 203: 216-34.

9- Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998; 91: 595-602.

10- Conley ME, Mathias D, Treadaway J, Minegishi Y, Rohrer J. Mutations in BTK in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 1034-43.

11- Rohrer J, Conley ME. Transcriptional regulatory elements within the first intron of Bruton's tyrosine kinase. *Blood*. 1998; 91: 214-21.

12- Jo EK, Kanegane H, Nonoyama S, et al. Characterization of mutations, including a novel regulatory defect in the first intron, in Bruton's tyrosine kinase gene from seven Korean X-linked agammaglobulinemia families. *J Immunol*. 2001; 167: 4038-45.

Archive of SID
www.SID.ir

13- Moin M, Aghamohammadi A, Farhoudi A, et al. X-linked agammaglobulinemia: a survey of 33 Iranian patients. *Immunol Invest.* 2004; 33: 81-93.

14- Keller G, Hartmann A, Mueller J, Hofler H. Denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC) for the Analysis of Somatic *p53* mutations. *Laboratory Invest.* 2001; 81: 1735-7.

15- Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, et al. Kinnon C Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clin Exp Immunol.* 1998; 111: 334-8.

16- Broides A, Yang W, Conley ME. Genotype/phenotype correlations in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol.* 2006. 118: 195-200.

17- Dobbs AK, Yang T, Farmer D, Kager L, Parolini O, and Conley ME. Cutting edge: a hypomorphic mutation in Igbeta (CD79b) in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development. *J Immunol.* 2007. 179: 2055-9.

18- Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME. Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1115-21.

19- Muller S, Maas A, Islam TC, et al. Smith CI synergistic activation of the human Btk promoter by transcription factors Sp1/3 and PU.1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 364-9.

20- Parolini O, Rohrer J, Shapiro LH, Conley ME. B-cell-specific demethylation of BtK, the defective gene in X-linked agammaglobulinemia. *Immunogenetics.* 1995; 42: 129-35.

Archive of SID

www.SID.ir

Correlation of Null Btk Expression and Gene Noncoding Mutations in XLA Patients

Nasseri S[1], Sorouri R[2], Pourpak Z[3], Rezaei N[4], Moin M[5], Parvaneh N[6], Aghamohammadi A[7]

[1] Dept of Molecular Biology, Immunology, Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2] Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran and, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[3] Dept of Immunology, Immunology, Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4] Dept of Immunology, Immunology, Asthma and Allergy Research Institute and Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[5] Dept of Immunology, Immunology, Asthma and Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[6] Dept of Infectious Diseases, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[7] Section of Immunology and Allergy, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author's Address: Section of Immunology and Allergy, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: aghamohammadi@sina.tums.ac.ir

Received: 20 July, 2008 **Accepted:** 29 Dec, 2008

Background and Objective: X-linked agammaglobulinemia (XLA) is a primary immunodeficiency disorder characterized by recurrent bacterial infections, profound lack of serum antibodies and reduced circulating B lymphocytes. Mutations in Bruton´s tyrosine kinase gene (*BTK*) result in XLA. It is shown that absence of *Btk* protein expression may be accompanied by no mutations in coding regions in some cases, instead alterations in conserved regulatory domains of promoter and the first intron of *BTK* gene maybe occurred. The aim of this study was evaluation of *Btk* expression and mutation analysis in coding and regulatory regions of the gene.

Materials and Methods: In this study, eleven XLA patients were enrolled. *Btk* expression was analyzed by western immunoblotting method. Mutation analysis was carried out in eight patients. In three cases, PCR of the regulatory regions was performed with designed primers, followed by sequencing.

Results: According to western blot, normal *Btk* expression in three patients and null expression in eight others was observed. Mutation analysis showed two novel *BTK* mutations in two patients (1038-1040 delAGG and IVS8-2delA). No coding or regulatory region mutations were found in three cases with null *Btk* expression.

Conclusion: Based on these results, three cases with null expression and had no coding or regulatory region mutations are interesting. It is possible that some rare regulatory defects may have been occurred, other than conventional sites. This must be taken into account for future investgations.

Key words: Btk, Noncoding mutation, Agammaglobulinemia

Archive of SID

www.SID.ir