Original Article

The Study of AID Gene Expression in B Lymphocytes from CVID Patients

Amir Salek Farrokhi[1], Asghar Aghamohammadi[2], Seyed Mohammad Moazzeni[3*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Research Center for Immunodeficiencies, Pediatrics Center of Excellence, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: moazzeni@modares.ac.ir

Received: 24/Oct/2012, Accepted: 29/Dec/2012

Abstract

Objective: Common variable immunodeficiency (CVID) is one of the most frequent cases of primary immunodeficiency. It is likely that this heterogeneous disease is caused by several distinct genetic disorders. The activation-induced cytidine deaminase (AID) enzyme is involved in class switching, somatic hypermutation (SHM) and processes associated with gene conversion in the germinal center. In order to clarify the possible role of AID in the pathogenesis of CVID, we have studied the AID gene expression in CVID patients.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 21 patients and healthy controls were isolated. The isolated cells were stimulated by CD40L and IL-4 to induce AID gene expression. After five days, total RNA from the stimulated cells was extracted and AID gene expression was investigated by RT-PCR.

Results: RT-PCR results showed that after stimulation by CD-40L and IL-4, the AID gene was expressed in all of the samples. The control samples were also positive for AID gene mRNA expression.

Conclusion: In this investigation we studied the expression of AID gene in CVID patients' B lymphocytes for the first time. Regards to our results which showed that all patients normally expressed the AID gene mRNA and considering that one of the main problems in a number of CVID patients is disorders in phenomena related to the germinal center and complete differentiation of B lymphocytes, it can be concluded that possible defects in other molecules involved in class switching is responsible for this disease. Understanding the various genetic defects responsible for this heterogeneous disease could lead to its division into more homogenous subtypes with distinct therapeutic strategies, so further investigations is recommended.

Keywords: AID, CVID, Reverse Transcriptase-PCR, B Lymphocyte

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 4, Winter 2013, Pages: 63-73

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

مقاله اصیل

بررسی بیان ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز القا شونده در لنفوسیت‌های B بیماران مبتلا به نقص ایمنی شایع متغیر

امیرسالک فرخی[1]، اصغر آقامحمدی[2]، سیدمحمد مؤذنی[3*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، مرکز تحقیقات نقص ایمنی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی
Email: moazzeni@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۸/۰۳ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۰۹

چکیده

هدف: نقص ایمنی شایع متغیر شامل انواعی از اختلالات هتروژن سیستم ایمنی بوده که توسط نقص‌های ژنتیکی مختلف ایجاد می‌شود. آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز القا شونده در پدیده تعویض کلاس و بروز جهش‌های سوماتیک در مرکز زایا نقش دارد؛ از این رو به منظور روشن شدن نقش احتمالی اختلال در بیان ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز در بیماری زایی نقص ایمنی شایع متغیر، بیان این ژن در افراد مبتلا بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ۲۱ فرد مبتلا و کنترل سالم جدا شد. سلول‌های جدا شده به منظور القای بیان ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز توسط CD40L و اینترلوکین ٤ تحریک شدند. پس از ۵ روز RNA سلول‌های تحریک شده استخراج شده و بیان ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز القا شونده توسط RT-PCR بررسی شد.

نتایج: نتایج آزمایش RT-PCR نشان داد که پس از تحریک توسط CD-40L و اینترلوکین ٤، mRNA ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز در تمام نمونه‌های مورد آزمایش بیان شده است. نمونه‌های کنترل نیز از نظر بیان mRNA ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز مثبت بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر برای اولین بار بیان ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز القا شونده در لنفوسیت‌های B مبتلایان به نقص ایمنی شایع متغیر بررسی شد. با توجه به این‌که تمام بیماران مورد بررسی در این مطالعه از نظر بیان mRNA ژن آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز طبیعی بودند و با توجه به این‌که یکی از مشکلات اصلی در بیماران نقص ایمنی شایع متغیر اختلال در پدیده‌های مرتبط با مرکز زایا و تمایز کامل لنفوسیت B است، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً سایر مولکول‌های درگیر در پدیده تعویض کلاس در ایجاد بیماری نقش دارند. از آن‌جا که شناخت نقص‌های ژنتیکی متنوع ایجاد کننده این بیماری هتروژن می‌تواند به دسته‌بندی مبتلایان به گروه‌های همسان‌تر و اتخاذ استراتژی درمانی متناسب و اختصاصی برای هر زیرگروه منجر شود، ضرورت ادامه این گونه تحقیقات همچنان احساس می‌شود.

کلیدواژگان: سیتیدین دی‌آمیناز القا شونده، نقص ایمنی شایع متغیر، RT-PCR، لنفوسیت B

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات: ۶۳-۷۳

مقدمه

نقص ایمنی شایع متغیر (Common Variable Immunodeficiency: CVID) یکی از فراوان‌ترین موارد نقص ایمنی اولیه است که با هیپوگاماگلوبولینمی (Hypogammaglobulinemia) و افزایش

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

استعداد ابتلا به عفونت‌های مکرر مشخص می‌شود. بیماری‌های خودایمنی و لنفوم (Lymphoma) هم در این بیماران شیوع بیشتری دارد [۱-۳]. تشخیص CVID براساس ناتوانی در تولید آنتی‌بادی اختصاصی بعد از مواجهه با آنتی‌ژن، کاهش مشخص سطح سرمی IgG و IgA و به طور شایع IgM و رد سایر عوامل ایجاد کننده نقص آنتی‌بادی صورت می‌گیرد [٤]. CVID در زنان و مردان به طور مساوی بروز می‌کند و شیوع آن بین ۵ تا ۲۰ مورد در یک میلیون نفر تخمین زده می‌شود که از شایع‌ترین بیماری‌های نقص ایمنی اولیه است [۵، ٦]. به علاوه این بیماران دارای ریسک افزایش یافته‌ای از ابتلا به سرطان از جمله لنفوم‌های بدخیم و سرطان معده هستند [۷-۹].

مکانیسم‌های مولکولی درگیر در بیماری CVID به طور کامل مشخص نیست. نقص‌های موجود در لنفوسیت‌های B، T و سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells) در بعضی از بیماران نشان داده شده است [۱۰-۱۳]. با توجه به هتروژن بودن علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی بیماران احتمالاً نقص‌های متعدد در مولکول‌های مختلف باعث ایجاد این بیماری می‌شود. یکی از ویژگی‌های بیماری شناختی که به عنوان ویژگی اصلی CVID به شمار می‌آید کاهش تعداد لنفوسیت‌های B تعویض کلاس کرده است که در بیش از ۷۵ درصد از بیماران دیده می‌شود [١٤-١٦]. در کنار نقص‌های کمّی در تولید ایمونوگلوبولین در بیماران CVID، نقص‌های موجود در کیفیت ایمونوگلوبولین‌های تولید شده که به وسیله کاهش وقوع جهش‌های سوماتیک نقطه‌ای (Somatic hypermutation: SHM) در ژن‌های ایمونوگلوبولین ایجاد می‌شود، در این بیماران شایع است [١٦-١٨]. در حقیقت در ۷۷ درصد بیماران CVID کاهش جهش در زنجیره سبک کاپا نشان داده شده است [۱۷].

براساس این یافته حداقل گروهی از بیماران در مولکول‌های دخیل در مراحل نهایی تمایز لنفوسیت‌های B و واکنش‌های مراکز زایا (پدیده تعویض کلاس و SHM) دارای نقص هستند. یکی از مهم‌ترین مولکول‌های دخیل در واکنش‌های مراکز زایا آنزیم سیتیدین دی‌آمیناز القا شونده (Activation Induced Cytidinedeaminase: AID) است. AID نقش بسیار مهمی در پدیده تعویض کلاس، SHM و فرآیندهای مرتبط با تبدیل ژنی (Gene Conversion) دارد [۱۹-۲۲].

بیان AID به طور عمده توسط پیام‌های حاصل از اتصالات لیگاند- گیرنده اختصاصی همچون CD40-CD40L تنظیم می‌شود. دو دسته از پیام‌ها شامل پیام‌های حاصل از اتصال سایتوکاین- گیرنده سایتوکاین (Cytokine-Receptor) و لیگاند- گیرنده، بیان AID را تقویت می‌کند [۲۳]. در بیشتر موارد شروع تعویض کلاس در سلول‌های B وابسته به اتصال CD40 و CD40L روی سلول‌های B و T است. تحریک لنفوسیت‌های B به صورت آزمایشگاهی (In vivo) به منظور تبدیل کلاس ایمونوگلوبولین در حضور LPS (Lipopolysaccharide) یا CD40L و اینترلوکین ٤ (Interleukin 4: IL-4) باعث روشن شدن نقش مهم AID در تمایز نهایی لنفوسیت‌های B شد. نقص در AID نه تنها منجر به اختلال شدید پدیده تعویض کلاس بلکه باعث نقص در تولید جهش‌های نقطه‌ای در ناحیه متغییر ژن ایمونوگلوبولین و در مجموع باعث ایجاد نقص در بلوغ میل پیوندی (افینیتی) آنتی‌بادی می‌شود [۲۰].

نقص در AID مسئول شکل اتوزومال مغلوب نشانگان Hyper-IgM-II است، در این بیماران لنفوسیت‌های B قادر به تعویض کلاس نیستند [۲۰]. در عین حال نقص در آنزیم AID ممکن است در گروهی از بیماران CVID نیزکه دارای میزان طبیعی IgM همراه با SHM کاهش یافته هستند، دیده شود. با توجه به هتروژن بودن بیماری CVID و با توجه به این‌که شناخت نقص‌های ژنتیکی متنوع مسئول ایجاد این بیماری هتروژن می‌تواند به دسته‌بندی بیماران در زیرگروه‌های مختلف ولی هموژن بیانجامد و از طریق اتخاذ استراتژی‌های درمانی مناسب و اختصاصی هر زیرگروه، به درمان بهتر مبتلایان کمک نماید، در این مطالعه، بیان mRNA ژن AID در لنفوسیت‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

B ۲۱ بیمار ایرانی مبتلا به CVID و ۲۱ فرد سالم بعد از تحریک توسط CD40L و IL-4 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

بیماران

از بین بیماران مبتلا به CVID مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان تهران تعداد ۲۱ بیمار وارد مطالعه شدند. معیارهای ورود به مطالعه مطابق با معیارهای انجمن نقص ایمنی اروپا به شرح زیر در نظر گرفته شد:

۱) سن بالای دو سال ۲) هیپوگاماگلوبولینمی ۳) جمعیت لنفوسیت B بالای ۲ درصد لنفوسیت‌های خون محیطی ٤) رد سایر علل شناخته شده هیپوگاماگلوبولینمی

تشخیص نهایی ابتلا به بیماری CVID توسط پزشک متخصص صورت گرفته است. به منظور مقایسه بیماران با افراد سالم از ۲۱ فرد سالم که از نظر سن و جنس با بیماران یکسان بودند نیز نمونه خون گرفته شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC) نمونه‌های بیمار و افراد سالم با استفاده از محلول فایکول و سانتریفوژ در محیط شیب غلظت جدا شد. پس از جداسازی، سلول‌ها به وسیله بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) دو بار شستشو داده شدند. شمارش سلول‌ها و تعیین درصد سلول‌های زنده به وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan Blue) ۲ درصد انجام شد.

کشت PBMC در حضور rhCD40L و rhIL-4

PBMC برای بیان mRNA ژن AID توسط rh-CD40L (Recombinant human-CD40L) (Invitrogen، آلمان) و rh-IL-4 (Invitrogen، آلمان) تحریک شد. ابتدا محیط کشت حاوی ٤۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از rh-CD40L و ۲۰۰ واحد بین المللی/میلی لیتر از rh-IL-4 تهیه شد و سپس مواد تقویتی مانند سرم جنین گاو (Fetal Calf Serum: FCS) (Invitrogen، آلمان) به مقدار ۱۰ درصد، سدیم پیرووات ۱ درصد (Sigma، آمریکا) و اسیدهای آمینه غیرضروری ۱ درصد (Sigma، آمریکا) برای تکثیر بهتر سلول‌ها به آن اضافه شد. آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (Penicillin) و استرپتوماسین (Streptomycin) (Sigma، آمریکا) نیز برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت اضافه شد. سوسپانسیون سلول‌های تک هسته‌ای (یک میلیون سلول در میلی‌لیتر) در پلیت‌های کشت ۲٤ خانه‌ای (Nunc، دانمارک) در حضور rh-CD40L و rh-IL-4 در غلظت‌های ذکر شده به مدت پنج روز کشت داده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور بررسی بیان ژن AID توسط لنفوسیت‌های B، سلول‌های کشت داده شده در روز پنجم جمع‌آوری شدند. استخراج RNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی کشت داده شده در حضور rh-CD40L و rh-IL-4 به وسیله تریزول (Trizol) (Gibco-BRLGrandIsland، آمریکا) و کلروفرم (Merck، آلمان) و به روش دستی انجام شد. برای حذف آلودگی با DNA، نمونه‌های استخراج شده با آنزیم DNase (Fermentase، آمریکا) تیمار شدند. پس از استخراج RNA نمونه‌ها، از کیت سنتز cDNA (Fermentase، آمریکا) و آنزیم Revert Aid M-MULV (Fermentase، آمریکا) و آغازگر Olig(dT) برای تولید cDNA استفاده شد.

RT-PCR

برای انجام PCR ژن‌های مورد نظر از کیت Master mix شرکت Fermentase (آمریکا) استفاده شد. در این روش ابتدا RNA کل استخراج شد و سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA، توسط آغازگر Olig(dT) و آنزیم رونویسی معکوس (Reverse Transcriptase)، cDNA مولکول‌های mRNA

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

سنتز شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بیان ژن مورد نظر بررسی شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای انجام RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) در جدول ۱ اشاره شده است. در این مطالعه از یک جفت آغازگر برای cDNA ژن AID و همچنین از یک جفت آغازگر برای cDNA ژن بتا اکتین (β-actin) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. روش انجام PCR برای هر یک از ژن‌های بتا اکتین و AID در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱ توالی آغازگرها و اندازه محصول PCR ژن‌های بتا اکتین و AID

ژن	توالی آغازگر	محصول PCR
بتا اکتین	جلویی: 5′-TACCACTGGCATCGTGATGGACT-3′ برگشتی: 5′-TCCTTCTGCATCCTGTCGGCAAT-3′	۵۱۰ جفت‌باز
AID	جلویی: 5′-GAGGCAAGAAGACACTCTGG-3′ برگشتی: 5′-GTGACATTCCTGGAAGTTGC-3′	۷۴۹ جفت‌باز

جدول ۲ روش انجام PCR برای هرکدام از ژن‌های بتا اکتین و AID

ژن	مخلوط اصلی (Master mix)	آغازگر جلویی (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)	آغازگر برگشتی (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)	cDNA الگو (۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر)	آب مقطر	حجم نهایی
بتا اکتین	۱۲/۵ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۹/۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
AID	۱۲/۵ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر	۲ میکرولیتر	۸/۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر

جدول ۳ مراحل انجام PCR ژن‌های بتا اکتین و AID

ژن	واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد	اتصال	بسط	واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد	چرخه ها	آخرین مرحله سنتز در ۷۲ درجه سانتی‌گراد
بتا اکتین	۳ دقیقه	۲ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد	۹۰ ثانیه	۲۸	۷ دقیقه
AID	۵ دقیقه	۲ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد	۶۰ ثانیه	۴۰	۷ دقیقه

آزمایش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Thermal Cycler) (Biorad، آمریکا) انجام شد. مراحل انجام PCR برای ژن‌های مورد نظر در جدول ۳ آمده است.

الکتروفورز محصولات PCR

برای مشاهده محصولات PCR از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد و اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) انجام گرفت. قطعه تکثیر شده زیر لامپ ماورای بنفش با طول موج ۲۳۰ نانومتر مشاهده شد و عکسبرداری توسط دستگاه ژل داکیومنت (Gel Document System) (Uvitec، آلمان) صورت گرفت.

نتایج

مشخصات بیماران و افراد کنترل

از بین بیماران CVID مراجعه کننده به مرکز طبی کودکان (تهران) تعداد ۲۱ بیمار (۱۷ مرد و ۴ زن، با سن ۵ تا ۵۱ سال و

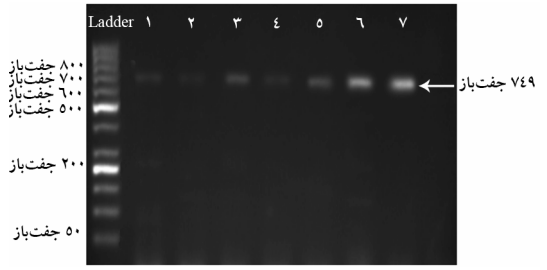
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

میانگین سنی ۱۸ سال) وارد مطالعه شدند. برای مقایسه داده‌های بیماران با افراد سالم ۲۱ نمونه خون از افراد سالم گرفته شد. این افراد از نظر سن و جنس با بیماران یکسان بودند. مشخصات بیماران در جدول ٤ آمده است.

جدول ٤ مشخصات بیماران مورد مطالعه

بیمار	جنس	سن (سال)	RT-PCR (AID)	RT-PCR (اکتین)
P۱	M	۱۸	+	+
P۲	M	۱٤	+	+
P۳	F	۱۷	+	+
P٤	M	۱۳	+	+
P٥	M	۲۱	+	+
P٦	M	۱۰	+	+
P۷	F	۷	+	+
P۸	F	٥	+	+
P۹	M	۱٥	+	+
P۱۰	M	۱٤	+	+
P۱۱	M	۲۱	+	+
P۱۲	M	۲۰	+	+
P۱۳	M	۲٤	+	+
P۱٤	M	۱۳	+	+
P۱٥	M	۱۷	+	+
P۱٦	M	۲۹	+	+
P۱۷	M	۲۳	+	+
P۱۸	M	۲۷	+	+
P۱۹	M	٥۱	+	+
P۲۰	F	۱۱	+	+
P۲۱	M	۸	+	+

F: زن، M: مرد



شکل ۱ الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ژن AID (اندازه محصول ۷٤۹ جفت‌باز). PBMC بیماران و افراد کنترل بعد از تحریک توسط CD40L و IL-4 از نظر بیان mRNA ژن AID مطالعه شد. چاهک‌های ۱–٤ مربوط به بیماران و ٥–۷ مربوط به نمونه‌های کنترل است.

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ژن AID

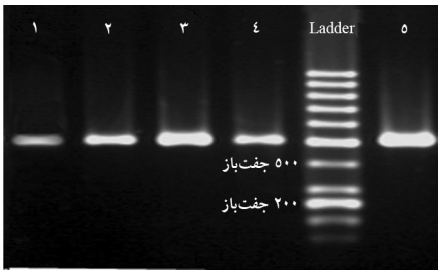
نتایج حاصل از انجام RT-PCR برای ژن AID در ۲۱ نمونه بیمار و ۲۱ نمونه کنترل نشان داد که همه نمونه‌ها از نظر بیان mRNA ژن AID مثبت بود. نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ژن AID در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ژن بتا اکتین

به عنوان کنترل داخلی از یک جفت آغازگر برای ژن بتا اکتین استفاده شد که به صورت دایمی در همه سلول‌ها بیان می‌شود تا درستی استخراج و سنتز cDNA کنترل شود. نتایج حاصل از RT-PCR برای ژن بتا اکتین نشان داد که همه نمونه‌های کنترل و بیمار از نظر بیان mRNA ژن بتا اکتین مثبت است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استخراج RNA و سنتز cDNA به درستی انجام

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

شده است. نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ژن بتا اکتین در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲ الکتروفورز محصولات RT-PCR برای ژن اکتین (اندازه محصول ۵۱۰ جفت‌باز). برای کنترل داخلی از ژن بتا اکتین استفاده شده که به طور دایمی در سلول‌ها بیان می‌شود و بدین‌وسیله کیفیت استخراج و سنتز DNA کنترل شد. چاهک‌های ۱ و ۲ مربوط به نمونه‌های کنترل و ۳، ٤ و ٥ مربوط به نمونه‌های بیماران است.

بحث

مکانیسم‌های مولکولی درگیر در بیماران CVID هنوز به طور کامل مشخص نشده است. به هر صورت هتروژن بودن تظاهرات بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی این احتمال را ایجاد می‌کند که چندین نوع نقص ژنتیکی متفاوت در ایجاد این بیماری دخالت داشته باشد. مطالعاتی که طی سال‌های اخیر صورت گرفته، نشان داده است که یکی از مشکلات اصلی در بیماران CVID عدم تمایز کامل لنفوسیت B و تولید پلاسماسل (Plasma Cell) است [٢٤]. در بسیاری از بیماران به دنبال برخورد لنفوسیت B با آنتی‌ژن، واکنش‌های مراکز زایا به صورت ناقص انجام می‌گیرد که باعث کاهش فراوانی پدیده تعویض کلاس آنتی‌بادی و در نتیجه تعداد لنفوسیت‌های B بیان کننده سایر کلاس‌های آنتی‌بادی به جز IgM و IgD می‌شود [۱۷، ۱۸، ۲۵-۲۷].

علاوه بر این اختلال در بروز SHM و در نتیجه بلوغ میل پیوندی آنتی‌بادی در گروهی از این بیماران گزارش شده است [۲٦، ۲۷]. بنابراین یکی از گزینه‌های احتمالی در مورد علت بروز این بیماری، اختلال در مولکول‌های درگیر در واکنش‌های مراکز زایا از جمله AID است.

آنزیم AID در تمایز نهایی لنفوسیت‌های B نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند؛ این مولکول به دنبال اتصال CD40L به CD40 القا می‌شود [۲۸]. از جمله عملکردهای آنزیم AID دخالت آن در پدیده تبدیل کلاس ایمونوگلوبولین و بروز SHM و در نتیجه بلوغ میل پیوندی آنتی‌بادی است. بنابراین نقص در AID نه تنها منجر به نقص عمیق در پدیده تبدیل کلاس، بلکه باعث نقص در بلوغ میل پیوندی آنتی‌بادی می‌شود. وجود نقص در آنزیم AID در بیماران Hyper-IgM-II گزارش شده است [۲۰].

با توجه به هتروژن بودن بیماری CVID و با توجه به این‌که در بعضی از مبتلایان به این بیماری میزان IgM طبیعی یا افزایش یافته است، احتمال دارد که در این بیماران نیز همانند نشانگان Hyper-IgM-II، یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری نقص در AID باشد. بنابراین بررسی بیان ژن AID می‌تواند در دسته‌بندی بیماران CVID ما را یاری نماید.

در مطالعه حاضر هیچ یک از بیماران CVID مورد مطالعه نقصی در بیان mRNA ژن AID نداشتند. مینه‌گیشی (Minegishi) و همکارانش نیز که برای نمونه کنترل در مقایسه با بیماران Hyper-IgM-II از ۲۳ بیمار CVID استفاده کردند، هیچ نوع جهشی در ژن AID پیدا نکردند که با بررسی حاظر مطابقت دارد [۲۹]. همچنین در مطالعه‌ای که اهم‌لارسن (Ohm-Laursen) و همکارانش انجام دادند، ٣٤ بیمار CVID از نظر وجود جهش در ژن AID بررسی شدند که هیچ نوع جهش ایجاد کننده بیماری CVID پیدا نشد [۳۰]. دو مطالعه قبلی که تنها مطالعات صورت گرفته در مورد آنزیم AID در مبتلایان به CVID است، هر دو در سطح DNA ژنومی و بررسی بروز جهش یا حذف در ژن AID انجام شده است. در مطالعه که توسط یو (Yu) و همکاران انجام شد به دنبال تحریک TLR7 (Toll-Like Receptor 7) و TLR9 اختلال در بیان ژن AID در لنفوسیت‌های B مبتلایان به CVID گزارش شده است [۳۱]. در حالی‌که بیان mRNA ژن AID به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

دنبال تحریک با IL-4 و CD40L در بیماران CVID تاکنون بررسی نشده و مطالعه حاضر اولین گزارش در این مورد است. در بررسی حاضر نشان داده شد که نقص در بیان mRNA ژن AID در هیچ‌یک از بیماران CVID مورد مطالعه، دلیل ایجاد این بیماری نیست. اختلاف در نتایج به‌دست آمده توسط محققان حاضر و گروه یو (Yu) احتمالاً به شیوه تحریک لنفوسیت‌های B بیماران و مسیر انتقال پیام و قدرت آن مربوط است.

با وجود این‌که مطالعات اندکی که تاکنون در مورد ژن AID در بیماران CVID صورت گرفته، غالباً نشان دهنده عدم نقص این مولکول است، باید توجه داشت که CVID بیماری بسیار هتروژنی است و امکان وجود نقص در آنزیم AID و دیگر آنزیم‌های درگیر در پدیده تعویض کلاس و تمایز نهایی لنفوسیت‌های B، در دسته‌ای از مبتلایان وجود دارد. بنابراین بررسی‌های مولکولی در بیماری‌های پیچیده‌ای مانند CVID از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به این‌که تمام بیماران مطالعه حاضر از نظر بیان mRNA ژن AID طبیعی بودند و با توجه به نتایج مطالعات سال‌های اخیر که نشان داده است که یکی از مشکلات اصلی در بیماران CVID عدم تمایز کامل لنفوسیت B و تولید پلاسماسل است [۲۴]، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً سایر مولکول‌های درگیر در پدیده تعویض کلاس که در فرادست آنزیم AID قرار دارند، حداقل در گروهی از بیماران عامل ایجاد کننده بیماری است. برای مثال می‌توان به مولکول‌های درگیر در فرایند ترمیم شکست‌های DNA بعد از عمل آنزیم AID اشاره کرد. البته باید توجه داشته باشیم که در تحقیق حاضر تنها بیان mRNA ژن AID بررسی شده که نشان دهنده انجام پدیده نسخه‌برداری از این ژن است، لیکن برای تأیید نهایی عملکرد طبیعی آنزیم AID، تعیین توالی mRNA تولید شده و کارآیی پروتئین تولید شده نیز باید مطالعه شود.

شناخت نقص‌های ژنتیکی متنوع مسئول ایجاد این بیماری هتروژن می‌تواند به دسته‌بندی بیماران در زیرگروه‌های مختلف ولی هموژن بیانجامد تا به وسیله اتخاذ استراتژی‌های درمانی مناسب و اختصاصی هر زیرگروه به درمان بهتر مبتلایان کمک شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و طرح مصوب مرکز تحقیقات نقص ایمنی است. نگارندگان بدین‌وسیله از حمایت‌های دانشگاه و نیز پرسنل آزمایشگاه گروه ایمنی‌شناسی و مرکز تحقیقات نقص ایمنی بیمارستان امام خمینی که مساعدت‌های لازم را مبذول داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. Q J Med. 1993; 86(1): 31-42.

[2] Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. Clin Immunol. 1999; 92(1): 34-48.

[3] Aghamohammadi A, Farhoudi A, Moin M, Rezaei N, Kouhi A, Pourpak Z, Yaseri N, Movahedi M, Gharagozlou M, Zandieh F, Yazadni F, Arshi S, Mohammadzadeh I, Ghazi BM, Mahmoudi M, Tahaei S, Isaeian A. Clinical and immunological features of 65 Iranian patients with common variable immunodeficiency. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(7): 825-32.

[4] Kokron CM, Errante PR, Barros MT, Baracho

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

GV, Camargo MM, Kalil J, Rizzo LV. Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. An Acad Bras Cienc 2004; 76(4): 707-26.

[5] Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. Clin Exp Med 2004; 3(4): 211-7.

[6] Schäffer AA, Salzer U, Hammarström L, Grimbacher B. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis. Curr Opin Genet Dev 2007; 17(3): 201-12.

[7] Giannouli S, Anagnostou D, Soliotis F, Voulgarelis M. Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. Clin Rheumatol 2004; 23(5): 449-52.

[8] Spickett GP. Current perspectives on common variable immunodeficiency (CVID). Clin Exp Allergy 2001; 31(4): 536-42.

[9] Mellemkjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, Bjorkander J, Olsen JH. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. Clin Exp Immunol 2002; 130(3): 495-500.

[10] Schroeder HW Jr, Schroeder HW 3rd, Sheikh SM. The complex genetics of common variable immunodeficiency. J Investig Med 2004; 52(2): 90-103.

[11] Farrant J, Spickett G, Matamoros N, Copas D, Hernandez M, North M, Chapel H, Webster AD. Study of B and T cell phenotypes in blood from patients with common variable immunodeficiency (CVID). Immunodeficiency 1994; 5(2): 159-69.

[12] Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, Lévy Y, Eibl MM, Oksenhendler E, Hermine O, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. Blood 2004; 104(8): 2441-3.

[13] Guazzi V, Aiuti F, Mezzaroma I, Mazzetta F, Andolfi G, Mortellaro A, Pierdominici M, Fantini R, Marziali M, Aiuti A. Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles. Clin Exp Immunol 2002; 129(2): 346-53.

[14] Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. J Clin Immunol 2003; 23(5): 385-400.

[15] Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. Blood 2002; 99(5): 1544-51.

[16] Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, Suzuki H, Koyasu S, Miyawaki T, Sugane K, Komiyama A, Ochs HD. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. Clin Immunol 2002; 103(1): 34-42.

[17] Andersen P, Permin H, Andersen V, Schejbel

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. Science 2002; 295(5558): 1301-6.

[23] He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. J Immunol 2004; 173(7): 4479-91.

[24] Durandy A, Taubenheim N, Peron S, Fischer A. Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. Adv Immunol 2007; 94: 275-306.

[25] Schejbel L, Marquart H, Andersen V, Permin H, Andersen P, Svejgaard A, Barington T. Deficiency of somatic hypermutation of immunoglobulin G transcripts is a better predictor of severe respiratory tract infections than lack of memory B cells in common variable immunodeficiency. J Clin Immunol 2005; 25(4): 392-403.

[26] Duvvuri B, Duvvuri VR, Grigull J, Martin A, Pan-Hammarström Q, Wu GE, Larijani M. Altered spectrum of somatic hypermutation in common variable immunodeficiency disease characteristic of defective repair of mutations. Immunogenetics 2011; 63(1): 1-11.

[27] Levy Y, Gupta N, Le Deist F, Garcia C, Fischer A, Weill JC, Reynaud CA. Defect in IgV gene somatic hypermutation in common variable immuno-deficiency syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(22): 13135-40.

[28] Notarangelo LD, Lanzi G, Peron S, Durandy A. Defects of class-switch recombination. J Allergy Clin Immunol 2006; 117(4): 855-64.

[29] Minegishi Y, Lavoie A, Cunningham-Rundles L, Garred P, Svejgaard A, Barington T. Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immuno-deficiency. Blood 2005; 105(2): 511-7.

[18] Bonhomme D, Hammarström L, Webster D, Chapel H, Hermine O, Le Deist F, Lepage E, Romeo PH, Levy Y. Impaired antibody affinity maturation process characterizes a subset of patients with common variable immuno-deficiency. J Immunol 2000; 165(8): 4725-30.

[19] Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Cell 2000; 102(5): 553-63.

[20] Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labelouse R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). Cell 2000; 102(5): 565-75.

[21] Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. J Biol Chem 1999; 274(26): 18470-6.

[22] Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]

C, Bédard PM, Hébert J, Côté L, Dan K, Sedlak D, Buckley RH, Fischer A, Durandy A, Conley ME. Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. Clin Immunol 2000; 97(3): 203-10.

[30] Ohm-Laursen L, Schjebel L, Jacobsen K, Permin H, Svejgaard A, Barington T. Normal ICOS, ICOSL and AID alleles in Danish patients with common variable immuno-deficiency. Scand J Immunol 2005; 61(6): 566-74.

[31] Yu JE, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramón S, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2009; 124(2): 349-56, 356.e1-3.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-16]