گزارش یک مورد کراسینگ اوردرآنتی ژنهای سیستم HLA

(۱)دکترمینوادیب

خلاصه :

درحین انجام آزمایشهای HLA Typing برروی کلیه افراد ۱۰۲ خانواده‌ای که برای پیوند مغز استخوان و یا پیوند کلیه به آزمایشگاه ایمونوژنتیک دربیمارستان حضرت علی اصغر اصفهان مراجعه نمودند . یک مورد کراسینگ اور درسیستم HLA مشخص گردید .(بین سالهای ۱۳۷۱ تا پایان ۱۳۷۵).

چهارمین فرزند این خانواده وجود یک کراسینگ اور بین ژنهای لکوس AوBسیستم HLA رانشان میداد.

پس ازتعیین فنوتیپ وهاپلوتایپ های HLA درتک تک اعضاء این خانواده مشخص گردید که این کراسینگ اور ، درهنگام تقسیمات میوزدرکروموزم پدری اتفاق افتاده است .

مقدمه :

ژنهای سیستم HLA برروی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ مواضع ژنی (Locous) متعددی دارد.این مواضع دریک منطقه ژنتیکی بنام منطقه HLA(HLA region) قرار دارند . که داری سه بخش است (۱) .

- بخش اول شامل مواضع ژنهای گروه یک HLAبنامهای HLA,A,B,C,E,F,G,... می باشد . محصولات این ژنها،آنتی‌ژنهای گروه یک HLA در سطح کلیه سلولهای بدن است .
- بخش دوم ، شامل مواضع ژنهای گروه دو HLA بنامهای HLA,D,DP,DQ, DR,DO,DN, ... می باشد.

محصولات این ژنها ،آنتی ژنهای‌گروه دو HLA درسطح سلولهای مسئول ایمنی است .

- بخش سوم شامل مواضع ژنهائی ازمشتقات کمپلمان TNFα&β(Tumor necrosis factor α&β) وژنهای متعددیگریست که درحقیقت ارتباطی با ژنهای HLAوفرآورده‌های آن ندارد(۱).

لکوسهای ژنتیکی سیستم HLA درمنطقه HLA بصورت‌بسیارنزدیک به یکدیگر (Closely linked)قراردارند و امکان کراسینگ اور دربین آنهابسیارکم است (۲).

اما باوجود این موارد متعددی از کراسینگ اور دربین لکوسهای مختلف سیستم HLA مشاهده گردیده است(۲ و ۳).

شیوع کراسینگ اوربین ژنهایHLA,A,HLA,B یک درصد گزارش شده است (۳).

امکان تشخیص کراسینک اور تنها زمانی وجود دارد که آزمایش HLA Typing بطور کامل برروی کلیه

۱ - دانشیارایمنی شناسی - دانشگاه علوم پزشکی‌وخدمات بهداشتی درمانی اصفهان - دانشکده پزشکی

افراد خانواده انجام شود . پس از انجام آزمایش ها، فنوتیپ هریک ازاعضاء خانواده بااستفاده از پاسخ آزمایشها مشخص می شود ، ازروی نحوه بهارث رسیدن آنتی ژنهای HLA به فرزندان ، هالوتایپ پدرومادر بدست می آید و سپس هاپلوتایپ‌های به ارث رسیده به هریک از فرزندان مشخص می گردد(بااستفاده ازاطلاعات تئوری). درهنگام رسم هاپلو تایپ ها چنانچه کراسینگ اوروجود داشته باشد مشخص می شود .

روشها:

ازسال ۱۳۷۰تاکنون تعداد یکصدو بیست خانواده جهت یافتن مغز استخوان سازگار برای یکی ازفرزندان بیمارخود ویابرای ردأبوت به آزمایشگاه ایمونوژنتیک واقع دربیمارستان حضرت علی اصغر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه نموده‌اند .
تعیین آنتی ژنهای گروه یک ودو HLA برای کلیه اعضاء این خانواده هاانجام گردید و نتایج آن موردتفسیرقرارگرفت . درسال ۱۳۷۴ خانواده‌ای جهت اهداء مغز استخوان سازگار به فرزند ۹ ساله شان که ازتالاسمی ماژور رنج می برد به این آزمایشگاه مراجعه نمودند . پس ازانجام آزمایش HLA Typing کامل برای کلیه اعضاء این خانواده و تعیین فنوتیپ آنها و درهنگام رسم هاپلوتایپ ها و تفسیر نتایج موجود کراسینگ اور در یکی ازفرزندان این خانواده مشخص گردید (جهت اعتماد کامل به نتایج شش ماه بعد مجددا" آزمایش تعیین آنتی ژنهای HLA مجددا" برروی کلیه اعضاء خانواده تکرارگردید).

روش تشخیص آنتی ژنهای HLA:

الف - جداسازی لنفوسیت هااز خون محیطی

۲۵سی سی خون دفیبرینه از هریک ازاعضاء خانواده تهیه شد و لنفوسیت آن بااستفاده از فایکول هایپاک جداگردید (۴).
برای جداسازی لنفوسیت های Tازو Bنیز ازروش نایلون وول استفاده شد(۵).
درجه خلوص لنفوسیت های Bبدست آمده در این روش بین ۸۰ الی ۹۰ درصد استکه برای انجام آزمایش HLA DR,DQکافی میباشد .
لنفوسیت های B خالص برای آزمایش DQوDR HLA و مخلوط لنفوسیتهای T و B برای آزمایش HLA,A,B,C مورد استفاده قرارگرفت .

ب - روش HLA Typing:

کلیه آزمایشهابااستفاده از روش میکروسیتوتوکسیستی NIH انجام گردید(۶). آنتی سرمهای HLA,A,B,Cوآنتی سرمهای HLA,DR,DQ ازکارخانه های بهرینگ و بیوتست آلمان ، دراین مطالعه مورد استفاده قرارگرفت .
که برخی منواسپسفیک و برخی مولتی اسپسفیک بودند . همراه باهر آزمایش تعداد دو عدد کنترل منفی و دو عدد کنترل مثبت نیز استفاده شد .(درمورد تعیین آنتی ژنهای DQ,DR یکعددسرم کنترل مثبت DRویکعددسرم لنفوسیت انسانی استفاده شد که باین ترتیب درجه خلوص لنفوسیت های B نیز سنجیده می شود).

نتایج :

نتایج فنوتیپ و ژنوتیپ آنتی ژنهای HLA درمورد هریک ازاعضاء خانواده نامبرده در جدول شماره یک مشاهده می شود . فرزند

شماره ۴ که تفسیر ژنوتیپ HLA او درکادر قراردارد . موردی است که کراسنیگ اور، دراو مشخص گردید . درهمین جدول نامگذاری هاپلوتایپ‌های استنباط شده از فنوتیپ و چگونگی بارث رسیدن هاپلوتایپ ها به هریک از فرزندان نیز مشخص شده است .

همچنین محل بروز کراسینگ اور درفرزند چهارم درجدول یک ملاحظه می شود . شکل یک ، نیز حاکی ازآنست که کراسینگ اور درکروموزوم پدری و بین لکوسهای HLA B,A اتفاق افتاده‌است . ضمنا" تعیین گروههای خونی اصلی و همچنین مشاهده شناسنامه هریک از اعضاء خانواده و پرسش ازتک تک آنها نشان دهنده تنی بودن اعضاء این خانواده بود .

A2; B16;CW7;DR7,DRW53,DQw2

A24; B8;CW7;DR11,DRW52,DQw3

شکل یک : محل بروز کراسینگ اور بین هاپلوتپ های cوd پدری و چگونگی انتقال به فرزند چهارم .

تفسیر :

اولین مورد کراسینگ اور درژنهای سیستم HLA توسط Kissmeyer-Nielsen و همکارانش بین لکوسهای AوB گزارش گردید (۷). سپس انواع کراسینگ اور ، دربین لکوسهای مختلف سیستم HLA مشخص گردید (۲) .

کشف انواع مختلف کراسینگ اور دربین لکوسهای مختلف‌این سیستم منجر به ترسیم نقشه ژنتیکی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ وارزیابی فواصل ژنهای آن ازیکدیگر شد(۸).

میزان بروز کراسینگ اور بین لکوسهای مختلف HLAمتفاوت امابین لکوس AوB یک درصد گزارش شده است (۳).

درحین تفسیر آزمایشهای HLAوترسیم هاپلوتایپ ها درخانواده‌ای دراین مقاله معرفی می گردد ، بروز کراسینگ اور درفرزند چهارم آنها مشخص گردید .

فنوتیپ HLA پدرومادراین خانواده درجدول شماره یک مشخص شده است . ازفنوتیپ سه فرزند اول نتیجه می گیریم که به‌احتمال زیاد مادر ، در لکوسهای $HLA\ B_8$ و $HLA\text{-}DR_3$ هموزیگوت است .

همچنین پدرومادر هر دودرآنتی ژن CW7 هموزیگوت هستند (پدرومادرنسبت فامیلی داشتند).

باتوجه به نکات فوق و همچنین بااستفاده از فنوتیپ HLA سه فرزند اول ، ژنوتیپ پدر ومادر استنباط می شود، که در جدول شماره یک مشخص گردیده است .

باتوجه به فنوتیپ فرزند چهارم و هموزیگوت بودن او در لکوسهای $HLA\ B_8$ و $HLA\ CW_7$ ژنوتیپ اوبدست می‌آید که درجدول و شکل یک مشخص شده است .

این ژنوتیپ حاکی ازآنست که فرزند چهارم یک هاپلوتایپ از پدرش دریافت نموده‌است که در لکوسهای AوB دچار کراسینگ اورشده است .

درپایان لازم به توضیح است که هنگام تفسیر آزمایشهای HLAبخصوص درهنگام ردأبوت بایستی‌احتمال بروز کراسینگ اوررادرنظرداشت، تا از تفسیراشتباه این آزمایش سرنوشت ساز پیشگیری شود .

جدول شماره ۱ - ژنوتیپ و فنوتیپ HLA،نامگذاری هاپلوتایپ ها وچگونگی بهارث رسیدن آنهابه فرزندان در خانواده مورد مطالعه

	سن	جنس	گروه خونی	فنوتیپ HLA	ژنوتیپHLA(هاپلوتایپ)	نامگذاری هاپلوتایپ وچگونگی بارث رسیدن آنهابه فرزندان
مادر	۴۵	زن	O+	$A_{23,26};B_8;CW_7;$ DR_3,DRw_{52},DQW_2	$A_{26};B_8;CW_7;DR_3;DRw_{52};DQw_2$ $A_{23};B_8;CW_7;DR_3;DRw_{52};DQw_2$	a b
پدر	۵۸	مرد	B+	$A_{24,2};B_{8,16};CW_7;DR_7;DR_{11}$ $DRw_{52},DRw_{53},DQw_2,DQw_3$	$A_2;B_{16};CW_7;DR_7,DRw_{53};DQw_2$ $A_{24};B_8;CW_7;DR_{11};DRw_{52};DQw_3$	c d
فرزند شماره یک	۱۶	زن	B+	$A_{2,26};B_{8,16};CW_7;DR_{3,7};$ $DRW_{52},DRW_{53};DQW_2$	$A_2;B_{16};CW_7;DR_7,DRw_{53};DQw_2$ $A_{26};B_8;CW_7;DR_3,DRw_{52};DQw_2$	c a
فرزند شماره دو	۱۴	مرد	O+	$A_{2,9};B_{8,16};CW_7;DR_{3,7};$ DRW_{52},DRW_{53},DQW_2	$A_2;B_{16};CW_7;DR_7,DRw_{53};DQw_2$ $A_{23};B_8;CW_7;DR_3,DRw_{52};DQw_2$	c b
فرزند شماره سه	۹	زن	O+	$A_{2,9};B_{8,16};CW_7;DR_{3,7}$ $DRW_{52},DRW_{53};DQ_2$	$A_2;B_{16};CW_7;DR_7;DRw_{53};DQw_2$ $A_{23};B_8;CW_7;DR_3,DRw_{52};DQw_2$	c b
فرزند شماره چهار	۲	مرد	O+	$A2,26;B8;CW7;DR3,DR11$ $DRW52,DQW2,DQW3$	$A26;B8;CW7;DR3,DRw52;DQw2$ $A2;B8;CW7;DR11;DRw52;DQw3$	a Crossing over between c and d haplotyp father

REFERENCES:

1- Abbas .A.K.,Lichtman .A.H., Pober .D.S.,"Cellular and Molecular Immunolgy" .W.B. Saunders Company; London .P:96-114,1994 .

2- Martin .M.,Mann D.,Carrington .M.,RC.combination Rates across the HLA.Complex :use of microsatellites as a rapid screen for recombinant chromosomes.Hum .Mol.Genet .4(3): 423,1995.

3- Carouau .Rog,B., Bouissou,C., Sommer ,E., Analysis of HLA-A, B In Recombinant Families with New Polymophic Markers.Hum - Immunol .38(2):132-6,1993.

4- Boyum .A.,Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human .Scand .J.Clin . Lab .Invest .21(suppl.48):77-84, 1968.

5- Fotino .M ,Menon .AK; Nylon wool sepration of T and B Lymphocytes.In :zachary,AA, Braun WE,eds. AACHT laboratory manual .American Association for clinical Histocompatibility Testing .New York ,1981: 1(8) ,1-6.

6- Ray.,J.G., NIAID Manual of Tissue Typing Techniques. Betesda :NIH publication .1979 , N .80.545 .P: 39-41.

7- Kissmeyer_ Nielsen ,F., svejgaard,A.,S.Ahrons,S.and Staub Nielesen ,L."Crossing over within The HLA system Nature (Lond.)224,75,1969.

8- Robson .EB,Lamm.Lu,Report of the Committee on the Genetic Constituion of Chromosome 6.Human gene mapping 7. Cytogenet Cell Genet 37:47-70,1984.