

پیوستگی بین چند شکلی ژن CD4 با دیابت نوع یک در جمعیت ایرانی

مهدی زمانی*، محمد امین طباطبایی فر^۱، آرزو صوابی اصفهانی^۱، فریدون مصطفوی^۱، آریاستوده^۱، باقر لاریجانی^۲

چکیده

مقدمه: دیابت نوع یک (T1DM)، یک بیماری خودایمنی است که در آن با واسطه سلول‌های T، سلول‌های بتای لوزالمعده بصورت گزینشی تخریب می‌شوند. نیمی از خطر ایجاد T1DM بوسیله منطقه ژنی HLA بوجود می‌آید. همچنین، نیمی از خطر بیماری T1DM توسط دیگر ژن‌های غیر از HLA و احتمالاً آنهایی که در کمپلکس میان‌کنش با آنتی ژن دخیل می‌باشند، ایجاد شود. محصول ژن CD4 (یکی از مهمترین گیرنده‌های سطح سلول T که نقش کلیدی در ارائه آنتی ژن دارد) می‌تواند عاملی از این دست می‌باشد.

روش‌ها: ما در این مطالعه با بهره‌گیری از رویکرد ژن کاندید، ارتباط احتمالی چندشکلی ژن CD4 را با T1DM در جمعیت ایرانی بررسی نموده ایم. چندشکلی ناشی از تکرار پنج نوکلئوتیدی غنی از بازهای پیریمیدینی که در پروموتور ژن مربوطه واقع شده است، مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد ۹۲ بیمار T1DM و ۱۰۸ فرد شاهد سالم با استفاده از شیوه PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل نتایج بدست آمده، ارتباط حمایتی آلل CD4*A3 در مقابل بیماری T1DM ($RR=۰/۱۵۹$ ، $Pc=۰/۰۲۵$)؛ $RR=۷/۳۹۷$ ، $Pc=۰/۰۱۰$ برای بیماری T1DM و مستعد کنندگی آلل CD4*A5 ($CI: ۰/۰۳۶-۰/۷۰۷$ ، $CI: ۱/۶۳۰-۳۳/۴۱۴$) را نشان داد.

نتیجه‌گیری: این نتایج حاکی از آن است که چند شکلی‌های خاص ژن CD4 دارای پیوستگی مثبت و منفی با بیماری T1DM در جمعیت ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع یک، چند شکلی، ژن CD4، بیماری خود ایمن، ایران

۱- گروه ژنتیک پزشکی، مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، انتهای بلوار کشاورز، خیابان دکتر قریب، مرکز طبی کودکان، بخش ژنتیک پزشکی؛ تلفن: ۶۶۹۰۵۵۵۳-۰۲۱؛ پست

الکترونیک: mzamani@exicte.com

مقدمه

دیابت نوع ۱ (T1DM) یک بیماری با توارث چند عاملی بوده که از تخریب سلول‌های بتای لوزالمعده به واسطه سلول‌های T در افراد مستعد از لحاظ ژنتیکی ناشی می‌شود [۱، ۲]. منطقه ژنی کمپلکس اصلی سازگاری نسجی انسان (MHC) مسؤول ایجاد حدود ۵۰٪ خطر ژنتیکی در این بیماری می‌باشد [۳، ۴]. مطالعات ارتباط چند شکلی‌های HLA کلاس II و T1DM اثبات کرده‌اند که آل‌های خاصی از آن مثل DRB1*0401 و DQB1*0302 و به ویژه DRB1* lys71⁺ رابطه خیلی قوی با T1DM دارند [۵، ۷]. مشارکت ژن‌های غیر HLA در ایجاد بیماری T1DM نیز گزارش شده است [۶]. این گونه‌های ژنی غیر HLA که در ایجاد T1DM نقش دارند را می‌توان از طریق مطالعه ژن‌های کاندید شناسایی کرد [۸].

سلول‌های T دارای گیرنده CD4⁺، نقش مهمی در بیماری زایی دیابت نوع یک ایفا می‌کنند [۹]؛ بنابراین چند شکلی‌های ژنی که در فرایند پاسخ ایمنی سلول CD4⁺ T به آنتی ژن ارائه شده تغییر ایجاد می‌کنند، ممکن است بر استعداد ابتلا به T1DM تأثیر بگذارند. پروتیین CD4 (بنام p55) به مولکول‌های HLA کلاس II واقع بر روی سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن و نیز با گیرنده سلول T (TCR) متصل می‌شود و پاسخ گیرنده لنفوسیت T (TCR) را به آنتی ژن ارائه شده تشدید می‌کند. مولکول CD4 دامنه^۱ دوم مولکول HLA کلاس II را شناسایی کرده و به آن متصل می‌شود. اگر به دلایلی این شناسایی صورت نگیرد، پاسخ لنفوسیت T به آنتی ژن صورت نمی‌گیرد [۱۰، ۱۱]. پروتیین CD4 می‌تواند همچنین از طریق آنزیم تیروزین پروتیین کیناز P56^{lck} پاسخ به آنتی ژن را تشدید نماید [۱۲]. در انسان ژن گیرنده CD4 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۲ (۱۲p۱۲) قرار گرفته و در موش بر روی کروموزوم ۶ واقع است [۱۳، ۱۴]. در موش آزمایشگاهی NOD در نزدیکی لوکوس Idd6 قرار گرفته است [۱۵]. این داده‌ها نه تنها اهمیت مولکول CD4 را در پاسخ ایمنی نشان می‌دهند، بلکه آن را کاندید مناسب در ایجاد بیماری T1DM می‌نمایند.

مطالعات اولیه ژنومی بر روی انسان با DNA های نشانگر، ارتباط لوکوس‌های موجود بر روی ۱۲p را با T1DM مشخص نساخته بودند [۱۶، ۱۷] اما در مطالعه مورد-شاهدی که ما در جمعیت اروپایی (بلژیکی) انجام دادیم، نشان داد که چند شکلی ژن CD4 ناشی از تکرارهای پتنا نوکلئوتیدی با دیابت نوع یک ارتباط دارد و فراوانی ژنوتیپ CD4*A4/A4 در مقایسه با افراد شاهد بطور معنی داری افزایش یافته بود و چنین نتیجه گیری شد که احتمالاً ژن CD4 و یا ژن پیوسته به آن در ایجاد بیماری T1DM نقش دارد [۱۸]. این موضوع بعداً توسط مطالعه دیگری در جمعیت دانمارکی تأیید گردید [۱۹]. از طرف دیگر در سال‌های اخیر، مطالعه مدل‌های حیوانات جونده و هم‌چنین انسان برای بیماری‌های پیچیده خودایمنی حاکی از آن است که منطقه دربردارنده ژن CD4 با T1DM مرتبط است [۲۰].

بدین ترتیب شواهد متعددی، ژن CD4 را به‌عنوان ژن کاندید برای ایجاد T1DM مطرح می‌کنند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط ژن CD4 با T1DM در جمعیت ایرانی است که بر این اساس چند شکلی پتنا نوکلئوتیدی CD4 در جمعیت بیماران T1DM و جمعیت کنترل سالم تجزیه و تحلیل شد. نتایج در جمعیت کشورمان نیز پیوستگی چند شکلی CD4 را با T1DM نشان داد که این آل‌های پیوسته به T1DM با جمعیت اروپایی متفاوت بود.

روش‌ها

الف) افراد مورد مطالعه

۹۲ بیمار T1DM وارد مطالعه شدند. همه بیماران غیرخویشاوند و ایرانی بودند که از نقاط مختلف کشور به بیمارستان مرکز طبی کودکان دانشگاه علوم پزشکی تهران و بیمارستان حضرت علی اصغر دانشگاه علوم پزشکی ایران ارجاع داده شده بودند. پس از کسب رضایت آگاهانه، نمونه برداری صورت گرفت. گروه شاهد شامل ۱۰۸ فرد سالم بدون سابقه بیماری خود ایمنی و از افرادی با سن بالای ۳۵ سال بود تا احتمال ابتلا به T1DM را نداشته

¹ Domain

ج) تجزیه و تحلیل آماری

تست Fisher's exact برای محاسبه معنی دار بودن تفاوت‌ها در فراوانی آلی یا ژنوتیپی در دو گروه مورد مطالعه به کار گرفته شد (گروه T1DM و گروه شاهد) [۲۳]. ارزش‌های P با استفاده از روش Bonferroni تصحیح گردید [۲۴، ۲۵]. خطر نسبی (RR) با روش Woolf و با فرمول زیر محاسبه گردید:

تعداد بیماران دارای آلی خاص / تعداد بیماران بدون این آلی / تعداد افراد شاهد دارای آلی مربوطه / تعداد افراد شاهد بدون آلی مربوطه [۲۶]. خطر نسبی تنها برای آلی‌ها یا ژنوتیپ‌های دارای ارزش P کمتر از ۰/۰۵ محاسبه گردید.

یافته‌ها

الف) توزیع آلی‌های ژن CD4

آلی‌های A₉, A₈, A₇, A₆, A₅, A₄, A₃, A₂ [۲۱] در این دو گروه مشاهده شدند (جدول ۱). با آزمون Fisher's exact اختلاف معنی‌داری بین دو گروه بررسی شد (جدول ۱). آزمون Fisher's exact اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه از نظر آلی CD4*A3 مشخص ساخت (P=۰/۰۰۵) و پس از تصحیح Bonferroni ارزش تصحیح شده P بدست آمد (P_c=۰/۰۲۵) که نشانگر ارتباط منفی این آلی با بیماری دیابت است و حاکی از اثر «حمایت‌کنندگی» آن در برابر دیابت می‌باشد (RR=۰/۱۵۹، CI ۰/۰۳۶-۰/۷۰۷، P=۰/۰۹۵). همچنین آلی CD4*A5 از لحاظ آماری بطور معنی‌داری در جمعیت بیماران نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود (P_c=۰/۰۱۰) که به‌عنوان آلی مستعد کننده مطرح می‌شود و بدین معنی است که شانس ابتلا به T1DM در افراد حامل آلی CD4*A5 نسبت به افرادی که این آلی را ندارند بیش از ۷ برابر می‌باشد (RR=۷/۳۷۹، CI ۱/۶۳۰-۳۳/۴۱۴، P=۰/۰۹۵).

ب) توزیع ژنوتیپ‌های ژن CD4

در مجموع ۱۷ ژنوتیپ در دو جمعیت بیمار و شاهد یافت شد که از آن میان ۱۳ ژنوتیپ به جمعیت بیمار و ۱۴ ژنوتیپ به جمعیت سالم تعلق داشت (جدول ۲). با وجود

باشند. هر دو گروه از نظر پراکندگی جمعیتی در کشور قابل مقایسه و تطبیق بودند.

ب) تعیین نوع آلی‌های چند شکلی

پتانوکلوتیدی

DNA ژنومی از لئوسیت‌های خون محیطی با روش لیز سلولی استخراج گردید [۲۱]. پرایمرهای زیر برای تکثیر قطعه حاوی تکرارهای پتانوکلوتیدی CTTTT انتخاب گردید که در پروموتور ژن CD4 قرار دارد [۱۸، ۲۲]:

5'-TTGGAGTCGCAAGCTGAAGTAGC-3'

5'-GCCTGAGTGACAGAGTGAGAACC-3'

برای انجام واکنش PCR، مقدار ۲۵ ng از DNA ژنومی و ۱۰ pmol از هر پرایمر در حجم نهایی ۲۵ μl که محتوی ۱۶/۶ mM MgCl₂، ۱۰ mM بتامرکاپتواتانول، ۶/۷ μM (NH₄)₂ SO₄، ۶۷ mM Tris-HCl (pH=۸/۸)، ۲۰۰ μM EDTA، ۱۷۰ μg/ml آلبومین سرم گاو (BSA)، از هر dNTP (Roche Applied Science) ۱/۲۵U، از پلی‌مراز (Roche Applied Science) و دی‌اتیل سولفوکساید (DMSO) ۲٪ بود، به کار رفت.

فرایند PCR در دستگاه ترمال سائیکلر (Applied Biosystem 2720) انجام شد. شرایط PCR به صورت زیر بود: در مرحله اول ۱ دقیقه در ۹۴ °C؛ سپس برای ۳۲ چرخه در شرایط زیر قرار گرفت: ۱ دقیقه در ۹۴ °C، ۱ دقیقه در ۵۶ °C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C. آلی‌ها توسط الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل پلی‌آکرلامید (PAGE) ۸٪ پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آنالیز شدند و ژنوتیپ آن‌ها بر حسب طول قطعه مشخص گردید [۱۸] (شکل ۱).

تکرارپذیری^۱ شیوه تعیین آلی‌های CD4 بدین صورت کنترل شد که ژنوتیپ ۲۰ نمونه دو بار در دو آزمایش مستقل تعیین شد و نتایج یکسان بدست آمد. از نشانگر مولکولی شماره ۹ (Roche Applied Science) برای تعیین ژنوتیپ‌های مربوطه استفاده گردید.

¹ Reproducibility

جدول ۱ - توزیع آل‌های ژن CD4 در ۹۲ بیمار T1DM و ۱۰۸ فرد شاهد سالم.

RR	Pc	P	شاهد n=۲۱۶		بیماران n=۱۸۴		آل‌ها
			تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	
		۰/۵۶۰	۲	۰/۰۰۹	۱	۰/۰۰۵	A2
۰/۱۵۹	۰/۰۲۵	۰/۰۰۵	۱۴	۰/۰۶۵	۲	۰/۰۱۱	A3
		۰/۸۳۶	۶۴	۰/۲۹۶	۶۲	۰/۳۳۷	A4
۷/۴۶۵	۰/۰۱۰	۰/۰۰۲	۲	۰/۰۰۹	۱۲	۰/۰۶۵	A5
			۱	۰/۰۰۵	۰		A6
		۰/۶۹۱	۳۸	۰/۱۷۶	۳۵	۰/۱۹۰	A7
		۰/۲۴۴	۹۳	۰/۴۳۱	۷۲	۰/۳۹۱	A8
		۰/۲۹۱	۲	۰/۰۰۹	۰		A9

ارزش P تنها برای آن دسته از آل‌هایی محاسبه شده اند که مجموع موارد مشاهده شده در گروه بیمار و شاهد بیش از ۱۰ مورد بوده است. n نشانگر تعداد کروموزم‌ها، P نشانگر ارزش‌های P محاسبه شده و Pc ارزش‌های P تصحیح شده (ارزش P محاسبه شده × تعداد آل‌ها) می‌باشند.

جدول ۲ - توزیع ژنوتیپ‌های ژن CD4 در ۹۲ بیمار T1DM و ۱۰۸ فرد شاهد سالم

Pc	P	شاهد N=۱۰۸		بیماران N=۹۲		ژنوتیپ‌ها
		تعداد	فراوانی	تعداد	فراوانی	
	۰/۷۹۰	۱	۰/۰۰۹	۱	۰/۰۱۱	A2/A7
	۰/۵۴۰	۱	۰/۰۰۹	۰	۰/۰۰۰	A2/A8
	۰/۰۸۹	۶	۰/۰۵۶	۱	۰/۰۱۱	A3/A4
	۰/۵۴۰	۱	۰/۰۰۹	۰	۰/۰۰۰	A3/A7
	۰/۰۵۳	۷	۰/۰۶۵	۱	۰/۰۱۱	A3/A8
	۰/۳۲۹	۱۰	۰/۰۹۳	۶	۰/۰۶۵	A4/A4
	۰/۰۹۶	۰	۰/۰۰۰	۳	۰/۰۳۳	A4/A5
	۰/۵۴۰	۱	۰/۰۰۹	۰	۰/۰۰۰	A4/A6
	۰/۷۳۱	۱۰	۰/۰۹۳	۱۰	۰/۱۰۹	A4/A7
۰/۱۱۵	۰/۰۲۳	۲۷	۰/۲۵۰	۳۶	۰/۳۹۱	A4/A8
	۰/۲۱۰	۰	۰/۰۰۰	۲	۰/۰۲۲	A5/A5
	۰/۸۶۲	۲	۰/۰۱۹	۳	۰/۰۳۳	A5/A8
	۰/۲۱۰	۰	۰/۰۰۰	۲	۰/۰۲۲	A5/A7
	۰/۷۲۴	۴	۰/۰۳۷	۴	۰/۰۴۳	A7/A7
	۰/۴۶۷	۱۸	۰/۱۶۷	۱۴	۰/۱۵۲	A7/A8
	۰/۱۱۲	۱۸	۰/۱۶۷	۹	۰/۰۹۸	A8/A8
	۰/۲۹۰	۲	۰/۰۱۹	۰	۰/۰۰۰	A8/A9

ارزش p تنها برای آن دسته از آل‌هایی محاسبه شده اند که مجموع موارد مشاهده شده در گروه بیمار و شاهد بیش از ۱۰ مورد بوده است. n نشانگر تعداد کل افراد در هر گروه، p نشانگر ارزش‌های P محاسبه شده و Pc ارزش‌های P تصحیح شده (ارزش p محاسبه شده × تعداد آل‌ها) می‌باشند.

بحث

در حالی که ژنوتیپ های خاص در منطقه ژنی HLA، استعداد پذیری قوی به T1DM فراهم می کنند، دیگر ژن ها (ژن های غیر منطقه HLA) هم می توانند به سهم خود چنین نقشی را در استعداد افراد به T1DM و یا ممانعت از آن ایفا کنند. در این مطالعه فراوانی آلل CD4* A3 و CD4* A5 مربوط به پروموتور ژن CD4 به طور معنی داری در بیماران T1DM در مقایسه با گروه شاهد به ترتیب کاهش و افزایش یافته است. این چند شکلی برخلاف چند شکلی های HLA، در توالی های غیر کد کننده (تنظیمی) واقع است و در بررسی توالی های اگزونی نیز در دو آلل CD4* A3 و CD4* A5 با دیگر آلل های این چند شکلی تفاوتی یافت نشد (داده های منتشر نشده). از سوی دیگر وجود این چند شکلی در منطقه پروموتور [۱۹] این ایده را بر می انگیزد که ممکن است در تنظیم بیان پروتیین CD4 (p55) نقش داشته باشد که در این صورت احتمالاً در برهمکنش با TCR و HLA کلاس II نقشی را ایفا خواهد کرد. در هر حال، تغییر بیان پروتیین CD4 و یا وجود چند شکلی خاص در آن که در تماس با HLA کلاس II قرار می گیرد، ممکن است برهمکنش بین HLA کلاس II و سلول های T را تغییر دهد و ممکن است شانس سلول های T برای فرار از گزینش منفی ممکن است تغییر کند و یا می تواند در سطح گزینش مثبت عمل کند. نتایج تحقیقات سایرین پیشنهاد می کند که بروز کم ژن CD4 در سطح سلول به نقص پاسخ TCR به تحریکات اندک آنتی ژنی منجر می شود [۲۷]. با این شرایط، پروموتور ژن مربوطه نقش اساسی خواهد داشت و این در حالی است که تکرار پنتانوکلئوتیدی مورد مطالعه ما در همان جا قرار دارد. سلول های T نابالغ زمانی گزینش مثبت می شوند که گیرنده های آن ها با لیگاندهای HLA به علاوه پپتید در تیموس با تمایل اندکی برهمکنش کند در حالی که برهمکنش قوی تر ایجاد گزینش منفی خواهد کرد [۲۹، ۲۸]. به ویژه در این رابطه دخالت احتمالی ژن CD4 حائز اهمیت است؛ زیرا سلول های T که با اتو آنتی ژن ها (آنتی ژن های خودی) واکنش می دهند، کاهش (در مورد آلل های

مستعدساز) می یابند؛ این مفهوم با واکنش خود ایمنی این بیماری مطابق است و اصولاً "تراکم و ترکیب مولکولی کمپلکس HLA کلاس II - پپتید که در دسترس TCR قرار می گیرد، در میان کنش با سلول های T و گزینش آنها مهم بوده و منطقی است که این دامنه ها و نیز مولکول های مرتبط مثل CD4، مورد بررسی قرار گیرند.

نتایج ما، مطالعه پیوستگی و ارتباط بین لوکوس CD4 و T1DM در جمعیت دانمارک و مطالعه ارتباط آن در جمعیت بلژیک را تأیید می نماید [۹، ۱۰]؛ اما فرقی که وجود دارد این است که بر طبق مطالعات، در جمعیت اروپایی آلل CD4* A4 به عنوان عامل خطر برای T1DM در نظر گرفته شده است و این در حالی است که نتایج ما در جمعیت ایران اختلاف معنی داری را در سطح CD4* A4 نشان نمی دهد و بجای آن آلل CD4* A5 را به عنوان آلل مستعد کننده نشان می دهد. به علاوه، آلل CD4* A3 به عنوان آلل مقاومت شناسایی شد.

همان گونه که قبلاً ذکر شد این تغییر برهمکنش می تواند ناشی از خود چندشکلی پنتانوکلئوتیدی بررسی شده باشد؛ تکرار مربوطه (CTTTT) جزو توالی های پلی پیریمیدینی است و پیشنهاد شده که تکرارهای پلی پیریمیدینی در برخی فرایندهای تنظیمی و جذب عوامل رونویسی خاص دخالت دارند. همچنین ساختارهای ویژه DNA سه رشته ای^۱ در آنها ثابت شده است [۳۰]؛ که احتمالاً این نوع پلی مورفیسیم ها (که در مطالعه حاضر نیز پلی مورفیسیم CD4 از همین نوع می باشد)، می توانند مستقیماً در بیماری زایی سهم داشته باشند. اختلاف نتیجه ما با مطالعات قبلی [۱۸، ۱۹] بر اساس این فرضیه، بدین صورت تفسیر می شود که نخست آلل CD4* A۳ در جمعیت اروپایی مورد مطالعه نسبت به جمعیت ما نادر بوده و بدین ترتیب ممکن است تعداد نمونه های آنها برای اطلاق این آلل به عنوان آلل حمایتی کافی نبوده و آلل CD4* A5 نیز در آن جمعیت یافته نشده است. از سوی دیگر تعداد نمونه های ما نیز ممکن است برای اطلاق آلل CD4* A4 به عنوان مستعد کننده کافی نباشد؛ در این ارتباط توسعه

¹ Triplex

هنوز ناشناخته باقی مانده است [۳۴]. ژن LAG3 (ژن فعال سازی لنفوسیتی) که ۱۰ kb فرادست CD4 قرار دارد [۳۵]، کاندید دیگری می تواند باشد. جالب این که وجود یک SNP (G/A) در ایترون شماره پنج و نیز واریانت های پروموتری در ژن تریوز فسفات ایزومراز (TPI) که ۸۰ kb فرودست پروموتر CD4 قرار دارد [۳۴]، پیوستگی شدیدی^۲ را با آلل های پتانوکلئوتیدی مورد مطالعه ما نشان می دهد [۳۶].

در جمع بندی کلی، یافته های ما نشان می دهد که آلل CD4*A5، مستعد کننده برای بیماری T1DM و آلل CD4*A3 مقاوم کننده در مقابل بروز این بیماری می باشد و با توجه به مطالب فوق، پلی مورفیسم پتانوکلئوتیدی ژن CD4 خود یا پیوسته به SNP های خاص در پروموتر ژن CD4، عامل بیماری T1DM و یا مقاومت در برابر آن است و یا این که آلل های مشاهده شده در پلی مورفیسم CD4 پیوسته به یک عده آلل های خاص ژن هایی است که در همسایگی ژن CD4 قرار دارند و باعث T1DM یا مقاومت در برابر آن می شوند. از آنجایی که ژن CD4 روی کروموزوم ۱۲p قرار دارد [۱۳] و ژن های HLA کلاس II نیز بر روی کروموزوم ۶p واقع اند [۳۷]، بنابراین مستقل از یکدیگر به ارث می رسند و پلی مورفیسم CD4 به عامل خطر مستقل از HLA پیوسته است و بصورت مستقل عمل می کند. هم چنین نتایج حاضر، یافته های قبلی ما را در رابطه با پیوستگی CD4 به T1DM در جمعیت اروپایی [۱۸، ۱۹] را تأیید می کند.

نمونه های ما ممکن است به روشن سازی بهتر این مسأله کمک کند.

بررسی جمعیتی توزیع آللی ژن CD4 در جمعیت ما و مقایسه آن با نتایجی که ما قبلاً^۱ در جمعیت اروپایی یافتیم [۱۸] نشان داد که در ۲۱۲ نفر افراد گروه شاهد جمعیت اروپایی، تنها ۴ آلل و ۹ ژنوتیپ متفاوت مشاهده گردید در حالی که در مطالعه ما از ۱۰۸ فرد سالم مورد مطالعه، ۸ آلل و ۱۴ ژنوتیپ مختلف ردیابی شد. هم چنین مقایسه فراوانی آللی دو جمعیت با آزمون Fisher's exact نشان می دهد که توزیع آللی به جز در مورد آلل CD4*A4 که در جمعیت ما اندکی فراوانی نسبی بیشتری دارد (۰/۲۳۶) در برابر ۰/۲۳۱، ۰/۴۶، و $P=0/184$ در سایر موارد تفاوت چندانی نمی کند و تفاوت عمده در تنوع آللی می باشد. این تنوع بیشتر آللی می تواند بر قدمت جمعیت ما دلالت کند که بدین ترتیب می تواند به عنوان یک منشاء برای دیگر جمعیت ها مطرح باشد [۳۲، ۳۱].

اخیراً بر طبق مطالعه ای بر روی پروموتر ژن CD4، پیوستگی آلل های خاص چندشکلی مورد بررسی در مطالعه ما با چندشکلی های نوکلئوتیدی منفرد^۱ (SNPs) اثبات شده است، به نحوی که تشکیل هاپلوتیپ های معین می دهند [۳۳]. در این راستا، این SNP ها می توانند عامل اصلی تغییر بیان احتمالی ژن CD4 محسوب شوند و اختلاف اثر آللهای مربوط به چندشکلی مورد مطالعه ما با یکدیگر در میزان استعداد پذیری افراد نسبت به T1DM (وجود آلل های مستعد کننده، آلل های بی اثر و آلل های مقاوم) به دلیل پیوستگی شدید آلل های CD4 با SNP های معین، توجیه گردد. هم چنین، اختلاف نتیجه ما در جمعیت ایرانی نسبت به جمعیت اروپایی می تواند به تفاوت آللی در پیوستگی با SNP خاص در پروموتر ژن CD4 مربوط باشد.

در نهایت این که ژن های پیوسته به این چند شکلی ممکن است دلیل حقیقی تعبیر ملاحظه شده در استعداد پذیری T1DM باشد. منطقه ۱۳p۱۲ بین ژن های CD4 و ژن تریوز فسفات ایزومراز (TPI) یک منطقه غنی از ژن بوده که پنج ژن را در بر گرفته است و عمل سه ژن از پنج ژن

² Linkage Disequilibrium

¹ Single Nucleotide Polymorphisms

مآخذ

1. Deschamps I, Lestrade H, Busson M, Hors J. Evaluation of recurrence risk in siblings of diabetic children: importance of age and birth order in relation to HLA genotypes. *Diabetes Res*, 1984;1:125-30.
2. Atkinson MA, Maclaren N. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1994; 331: 1428-36.
3. Noble JA, Valdes AM, Cook M et al. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet*, 1996; 59: 1134-48.
4. Zamani M, Cassiman JJ. Reevaluation of the importance of polymorphic HLA class II alleles and aminoacids in the susceptibility of individuals of different populations to type I diabetes. *Am J Med Genet*, 1998; 76: 183-94.
5. Zamani M, Flemming P, Spaepen M, Raeymaekers P, Nerup J, Cassiman JJ. Linkage and association of the HLA gene complex with T1DM in 81 Danish families: Strong linkage between DRB1Lys71+ and T1DM. *J Med Genet*, 1996; 33:899-905.
6. Zamani M, Flemming P, Raeymaekers P, Nerup J, Cassiman JJ. Linkage of type I diabetes to 15q26 (T1DM3) in the Danish population. *Hum Genet*, 1996; 98:491-496.
7. Zamani M, Spaepen M, Buyse I, Marynen P, Bex M, Bouillon R, Cassiman JJ. Improved risk assessment for T1DM by analysis of amino acids in HLA-DQ and DRb1 loci. *Eur J Hum Genet*, 1994; 2:177-184.
8. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 1996;273:1516-7.
9. Haskins K, Wegmann D. Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes*, 1996; 45:1299-1305.
10. Wang JH, Meijers R, Xiong Y et al. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II HLA molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10799-804.
11. Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 2002;419:845-9.
12. Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL. Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, HLA class II and TCR molecules. *Immunol Today*, 1995; 16:581-587.
13. Isobe M, Huebner K, Maddon PJ, Littman DR, Axel R, Croce CM. The gene encoding the T-cell surface protein T4 is located on human chromosome 12. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83:4399-4402.
14. Seldin MF, D'Hoostelaere LA, Huppi K, Mock BA, Steinberg AD, Parnes JP, Morse HC III. Mapping of the Ly-4 (L3T4) T-cell differentiation antigen on mouse chromosome 6 by the use of RFLPs in an interspecific cross. *Immunogenetics*, 1988; 27:396-398.
15. Ghosh S, Palmer SM, Rodrigues NR, Cordell HJ, Hearne CM, Cornall RJ, Prins J-B, McShane P, Lathrop GM, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA. Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Genet*, 1993; 4:404-409.
16. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SCL, Jenkins SC, Palmer SM, Balfour KM, Rowe BR, Farrall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. A genome-wide search for human susceptibility genes. *Nature*, 1994; 371:130-136.
17. Hashimoto L, Habita C, Beressi J, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Rotter J, Djoulah S, James M, Froguel P, Weissenbach J, Lathrop GM, Julier C. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent mellitus on chromosome 11q. *Nature*, 1994; 371:161-164.
18. Zamani M, Buyse I, Legius E, Decorte R, Marynen P, Bouillon R, Cassiman J-J. Possible association of CD3 and CD4 polymorphisms with insulin-dependent diabetes mellitus (T1DM). *Clin Exp Immunol*, 1994; 97:517-521.
19. Kristiansen OP, Zamani M, Johannesen J, Mandrup-Poulsen T. Linkage and association between a CD4 gene polymorphism and T1DM in Danish T1DM patients. *Diabetes*, 1998;47:281-282.
20. Wanstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-HLA susceptibility genes. *Nat Immun* 2001;2: 802-9.
21. Higuchi R. PCR technology. In: Erlich HA, ed. Principles and applications for DNA amplification. New York:Stockton Press, 1989:30-38.
22. Edwards MC, Clemens PR, Tristan M, Pizzuti A, Gibbs RA. Pentanucleotide repeat length polymorphism at the human CD4 locus. *Nucleic Acids Res*, 1991;19:4791.
23. Fisher RA. The design of experiments. Edinburgh:Oliver & Boyd,1960:258.
24. Dunn OJ. Estimation of the means of dependent variables. *Ann Math Stat*, 1958;29:1095-1111.
25. Dunn OJ. Multiple comparisons among means. *Am J stat Assoc*, 1961; 56:52-64.

26. Woof B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*, 1955;19:251-3.
27. Feito MJ, Ballester S, Diez-Orejas R et al. CD4 dependence of activation threshold and TCR signalling in mouse T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 1997;45:166-74.
28. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Kaer LV, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S. Evidence for differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*, 1994; 76:651-663.
29. Marrack P, Parker DC. A little of what you fancy. *Nature*, 1994; 368:397-398.
30. Norton PA. Polypyrimidine tract sequences direct selection of alternative branch sites and influence protein binding. *Nuc Acids Res*, 2003; 22:3854-60.
31. Tishkoff SA, Dietzsch E, Speed W, Pakstis AJ, Kidd JR, et al. Global patterns of linkage disequilibrium at the CD4 locus and modern human origins. *Science*, 1996;271:1380-7.
32. Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Rev Genet*, 2003;4:587-97.
33. Kristiansen OP, Karlsen AE, Larsen ZM, Johannesen J, Pociot F, Mandrup-Poulsen T. Identification of a Type 1 Diabetes-Associated CD4 Promoter Haplotype with High Constitutive Activity. *Scand J Immunol*, 2004; 59:582-591.
34. Ansari-Lari MA, Muzny DM, Lu J et al. A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. *Genome Res*, 1996;6:314-26.
35. Bruniquel D, Borie N, Triebel F. Genomic organization of the human LAG-3/CD4 locus. *Immunogenetics* 1997;47:96-8.
36. Humphries A, Ationu A, Lalloz MR, Layton DM. Ancestral origin of variation in the triosephosphate isomerase gene promoter. *Hum Genet*, 1999;104:486-91.
37. Kappes D, Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Ann Rev Biochem*, 1988; 57:991-1028.