

## بررسی جهش ژن *BTNL2* در بیماران مبتلا به سارکوئیدوز پوستی

دکتر کامبیز کامیاب حساری<sup>۱</sup>  
دکتر شایان دخت طالب<sup>۱</sup>  
دکتر لاله منتصر کوهساری<sup>۱</sup>  
دکتر علیرضا فیروز<sup>۲</sup>

۱. بیمارستان رازی  
۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های  
پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی  
تهران، تهران، ایران

نویسنده مسؤول:

دکتر کامبیز کامیاب حساری

تهران، میدان وحدت اسلامی، بیمارستان  
رازی، پست الکترونیک:

sh\_t256@yahoo.com

**زمینه و هدف:** سارکوئیدوز یک بیماری گرانولوماتوز غیرکازفیه با تظاهرات بالینی در بسیاری از اعضای بدن از جمله کلیه، کبد، ریه، قلب، پوست و سایر اندام‌ها است. بررسی‌ها نشان داده که ژن *BTNL2* در برخی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز سیستمیک دچار جهش شده است. با توجه به اینکه اولین تظاهر برخی بیماران مبتلا، به صورت سارکوئیدوز پوستی است، ما در این مطالعه به بررسی ژن *BTNL2* در این بیماران پرداختیم.

**روش اجرا:** در ۱۰ بیمار مبتلا به سارکوئیدوز پوستی، آلل rs2076530 در اگزون شماره ۵ ژن *BTNL2*، به روش (Single Strand Conformation Polymorphism) SSCP و PCR، جهش‌های موجود که با شیفت مثبت همراه هستند، مورد آنالیز تحلیل توالی قرار گرفت و نتایج حاصل از تعیین توالی از طریق برنامه‌ی کامپیوتری Chormas مورد ارزیابی و blust قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از ۱۰ بلوک بررسی‌شده از بیماران مبتلا به سارکوئیدوز پوستی، ۷ مورد دارای Transition G→A بودند و ۳ مورد نیز طبیعی بود و هیچ‌گونه جهش ژنی نداشت. **نتیجه‌گیری:** آلل rs2076530 در اگزون شماره ۵ ژن *BTNL2*، در ۷ بیمار با سارکوئیدوز پوستی دچار Transition G→A شده است که می‌تواند بیانگر ارتباط میان این ژن و سارکوئیدوز پوستی باشد، هرچند که مطالعات وسیع‌تری برای تأیید این یافته ضروری است.

**کلیدواژه‌ها:** ژن *BTNL2*، جهش، سارکوئیدوز پوستی

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۲۹ پذیرش مقاله: ۸۹/۴/۲۰

پوست و زیبایی؛ تابستان ۱۳۸۹، دوره ۱ (۲): ۶۵-۶۹

### مقدمه

و پوستی اشاره کرد. بر طبق آمار جهانی، این بیماری در ۱۰-۳۰ درصد مواقع به صورت ضایعه‌ی پوستی به‌تنهایی پیش از بروز مشکل سیستمیک یا تظاهرات ریوی بروز می‌کند.<sup>۳</sup> بررسی‌ها و مطالعات بسیاری روی نژادهای مختلف و هم‌چنین بروز بیشتر آن در برخی خانواده‌ها حاکی از تأثیر ژنتیک در رخداد این بیماری است.<sup>۴-۶</sup> برای مثال ژن *BTNL2* یکی از اعضای Immunoglobulin Gene Super Family است و با CD80 و CD86 ارتباط دارد. اخیراً بررسی‌های نقشه‌ی ژنی و HLA افراد مبتلا به این بیماری نشان داده است که ژن *BTNL2* نقش مهمی را در ایجاد این بیماری ایفا می‌کند.<sup>۷</sup> تاکنون علل و وضعیت جهش این ژن در بیماران مبتلا به سارکوئیدوز در ایران مورد بررسی قرار

سارکوئیدوز یک بیماری گرانولوماتوز با تظاهرات بالینی در بسیاری از اعضای بدن از جمله کلیه، کبد، ریه، قلب و سایر اندام‌ها است. در مورد سبب‌شناسی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز بررسی‌های بسیاری صورت گرفته است، اما تاکنون علت و منشأ دقیق این بیماری مشخص نشده است.<sup>۱،۲</sup>

در ایران از جمعیت ۶۷،۵۰۳،۲۰۵ نفری حدوداً میزان ۱۳،۵۰۰ نفر مبتلا به سارکوئیدوز می‌باشند. معمولاً اولین تظاهر این بیماری به صورت تظاهرات ریوی با نشانه‌های درگیری سیستم لنفاوی است. از جمله تظاهراتی که معمولاً به صورت ثانویه در بیماران مبتلا مشاهده می‌شود، می‌توان به علائم ادراری تناسلی

سپس با کمک روش PCR، آلل rs2076530 در اگزون شماره ۵ ژن *BTNL2* که روی کروموزوم ۶ انسان قرار دارد، با کمک دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf تکثیر شد و باند مورد نظر با کمک روش الکتروفورز با واسطه‌ی مارکر ۵۰bp ردیابی و تأیید شد. پس از تأیید محصول PCR، با روش Electrophoresis (Single Strand Conformation Polymorphism) SSCP در ژل اکریلامید ۱۰٪، جهش‌های موجود که با شیفت مثبت همراه هستند، مورد تحلیل توالی مستقیم قرار گرفت و نتایج حاصل از تعیین توالی از طریق برنامه‌ی کامپیوتری Chormas ارزیابی شد.

### یافته‌ها

از ۱۰ بلوک بررسی‌شده ۷ مورد  $G \rightarrow A$  Transition داشتند و ۳ مورد نیز طبیعی بوده و هیچ‌گونه جهشی یافت نشد (تصاویر ۱ و ۲).

### بحث

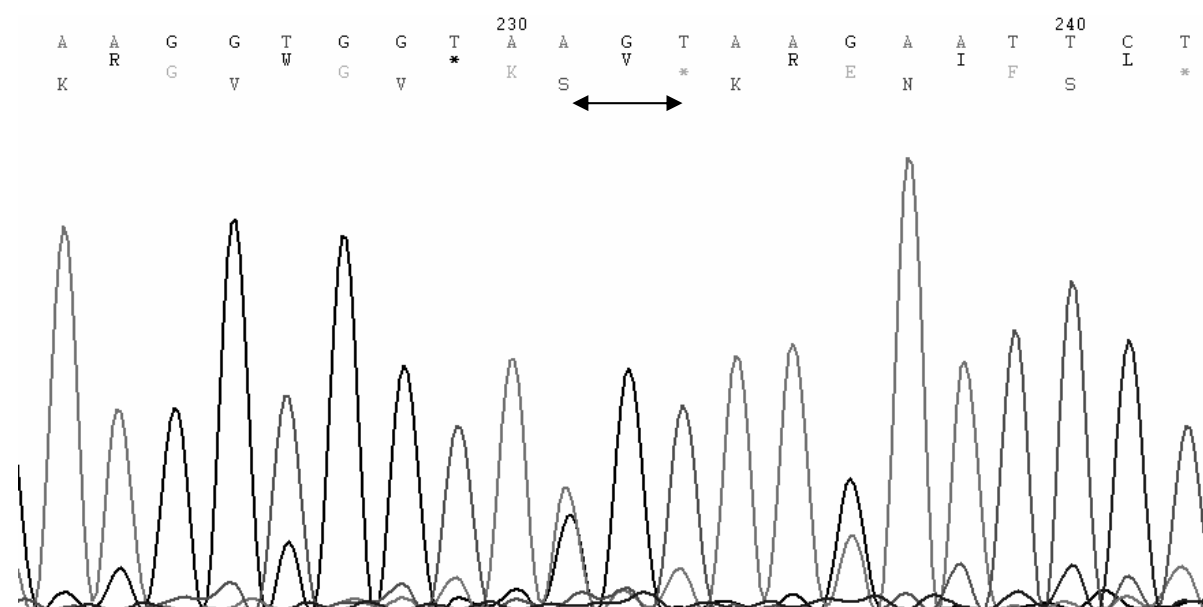
تشخیص به موقع و درمان بیماران مبتلا به سارکوئیدوز با توجه به احتمال پیشرفت این بیماری و

نگرفته است. با توجه به ارتباط میان ژن *BTNL2* و سارکوئیدوز و اهمیت تشخیص دقیق این بیماری، ما بر آن شدیم تا به بررسی نقش این ژن در بیماران مبتلا به سارکوئیدوز پوستی بپردازیم.

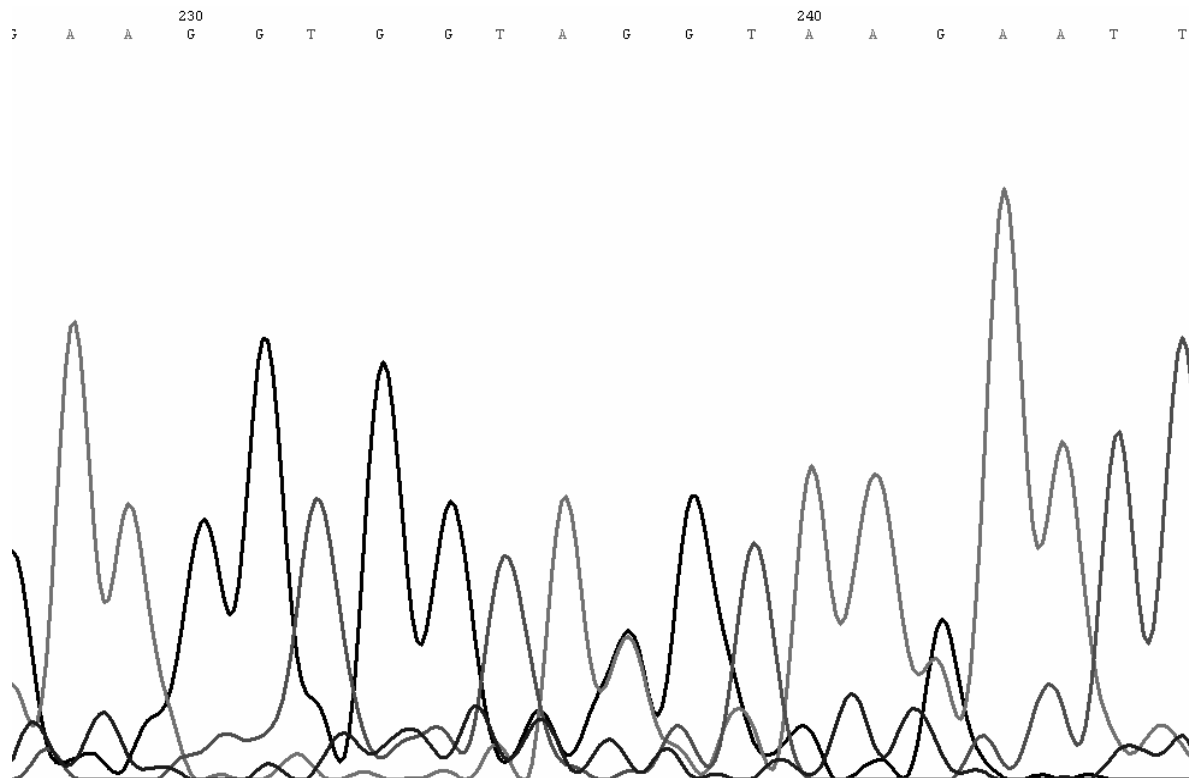
### روش اجرا

در این مطالعه، نمونه‌های بافتی ۱۰ نفر از بیماران ۳۰ تا ۵۰ ساله مبتلا به سارکوئیدوز پوستی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای استخراج کل DNA، با رعایت شرایط استاندارد و نکات کامل ایمنی با استفاده از کیت شرکت سیناژن، DNA از طریق روش Salting out و پروتئیناز K از block بافتی پوستی استخراج شد. پس از تأیید OD، جهت دستیابی به ژن و تکثیر آن، از یک جفت پرایمر که از قبل از طریق برنامه‌ی Primer3 در برنامه‌ی انالین بیوانفورماتیک طراحی شده بود (و صحت آن در برنامه‌ی نرم‌افزاری UCSC بررسی شده بود) استفاده شد.

Forward 1: 5' tgtctaccaggaggccagtt 3'  
Reverse 1: 5' ttcttaatgcttattcatcatcaa 3'  
Forward 2: 5' tctaccaggaggccagtttg 3'  
Reverse 2: 5' tccacaaactcaatggatga 3'



تصویر ۱: Transition  $G \rightarrow A$  در آلل rs2076530 از ژن *BTNL2* در یک بیمار مبتلا به سارکوئیدوز پوستی



تصویر ۲: عدم وجود هر گونه جهش در ژن *BTNL2* در یک بیمار مبتلا به سارکوئیدوز پوستی

*BTNL2* یکی از مهم‌ترین ژن‌ها در کلاس II گروه MHC (کمپلکس ناسازگاری نسجی) است.<sup>۹</sup> *BTNL2* وابسته به خانواده‌ی رسیپتور B7 1, 2 است که احتمالاً نقش کمک محرک در T-Cell‌ها را دارا است.<sup>۱۰</sup> این ژن در موقعیت کروموزومی 6p21.3 قرار گرفته است و دارای ۶ اگزون می‌باشد. در اگزون شماره ۵ این ژن آللی به نام rs2076530 قرار گرفته است<sup>۱۱</sup> که مطالعات Rybicki و همکارانش در سال ۲۰۰۵، آن را به‌عنوان یک عامل خطر (ریسک‌فاکتور) در این بیماری به اثبات رسانده است.<sup>۱۱</sup>

جهش نوع Transition سبب تبدیل G به A در این آلل و منجر به ایجاد کدون اختتام زودهنگام در ژن شده و در نتیجه‌ی آن یک پروتئین ناقص با عملکرد غیرطبیعی تولید می‌شود.

هم‌چنین مطالعاتی که در سال ۲۰۰۶ صورت گرفته، نشان داده‌اند که ژن *BTNL2* به مقدار زیادی در روده و بافت‌های لنفاوی بیان می‌شود. این ژن سبب

تبدیل آن به فرم سیستمیک بسیار حائز اهمیت است. در ۵۰٪ موارد پوست، در ۱۰-۵٪ موارد قلب و سیستم اعصاب مرکزی و در ۶-۴٪ موارد غده پاروتید درگیر می‌شود.<sup>۱۲</sup> از جمله علایم پوستی این بیماران می‌توان به پلاک‌های سفت و ارغوانی و اریتم ندوزوم اشاره کرد که معمولاً به عنوان دومین علامت بیماری بروز می‌کند.

تاکنون برای تشخیص این بیماری، از بررسی‌ها و مشاهدات بالینی، نتایج آزمایشگاهی و بررسی‌های پاتولوژیک ضایعه استفاده شده است. اما بررسی‌ها نشان داده‌اند که در مواردی که بیمار با تظاهرات غیرطبیعی یا در مکان‌های غیرمعمول مراجعه می‌کند، تشخیص با دشواری‌های بسیاری روبه‌رو است.<sup>۱۳</sup>

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که یک پلی‌مرفیسم (SNP) در اگزون ۵ *BTNL2* (rs2070530) با ریسک ایجاد سارکوئیدوز ارتباط تنگاتنگی دارد. علاوه بر آن، عملکرد آنتی‌ژن‌های لوکوسیت انسانی (HLA) نقش مهمی در بروز و پیدایش سارکوئیدوز دارد. ژن

مبتلا به سارکوئیدوز بررسی شد. یافته‌های این مطالعه ارتباط میان *BTNL2* و سارکوئیدوز در بیماران سفیدپوست را تأیید کرد. بررسی‌ها نشان دادند که اثر ژن *BTNL2* در ایجاد سارکوئیدوز مستقل از HLA کلاس ۲ در سفیدپوستان است. اما شواهد حاکی از آن است که ارتباطی میان *BTNL2* و HLA کلاس ۲ در بیماران آفریقایی - امریکایی وجود ندارد.<sup>۱۱</sup>

یافته‌های ما در این مطالعه نشان داد که ژن *BTNL2* نقش مهمی در بیماران مبتلا به سارکوئیدوز با تظاهرات اولیه‌ی پوستی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک مارکر مهم برای تشخیص الگوی ژنتیکی و نهایتاً درمان مطلوب از دیدگاه مولکولی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز پوستی مورد استفاده قرار گیرد، هرچند که مطالعات وسیع‌تری برای بررسی دقیق‌تر ارتباط میان این ژن و سارکوئیدوز پوستی الزامی می‌نماید.

### تشکر و قدردانی

هزینه‌های این پژوهش توسط مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جدام تأمین شده است.

تنظیم میزان فعال شدن سلول‌های لنفوسیت T می‌شود که نقش مهمی در بیماری‌های سیستم ایمنی، سارکوئیدوز و میوزیت دارد.<sup>۱۲</sup>

در مطالعات صورت گرفته روی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز هلندی و بریتانیایی در انگلستان، آلل‌های ذیل مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند:

۱. rs3763309 (C/A Intron 1)

۲. rs2076523 (A/G Intron 3)

۳. rs2076524 (T/C Intron 4)

۴. rs3117099 (T/C 3' untranslated region)

نتایج نشان داد که فراوانی آلل rs2294878 G (65.6/55.3) در بیماران بیشتر بود. هم‌چنین در بیماران بریتانیایی مبتلا، فراوانی آلل rs2076530 A بیشتر بود (66.8/57.4). علاوه بر آن سایر آلل‌ها هیچ ارتباط معناداری با سارکوئیدوز نداشت. هم‌چنین میان آلل‌های DRB<sub>1</sub> \*14، DRB<sub>1</sub> \*01، DRB<sub>1</sub> \*12، DRB<sub>1</sub> \*10، DRB<sub>1</sub> \*04 و HLA کلاس ۲ با سارکوئیدوز ارتباط واضحی یافت شد.<sup>۱۳</sup>

در یک مطالعه‌ی مورد - شاهد، نقش ژن *BTNL2* در سارکوئیدوز در خانواده‌های امریکایی - آفریقایی

### References

1. Hanno, R., Needelman A, Eiferman RA, Callen JP, Cutaneous sarcoidal granulomas and the development of systemic sarcoidosis. Arch Dermatol 1981;117:203-07
2. Costabel, U, Hunninghake GW. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Eur Respir J 1999;14:735-37.
3. Rybicki, BA, Iannuzzi MC, Epidemiology of sarcoidosis: recent advances and future prospects. Semin Respir Crit Care Med 2007;28:22-35.
4. Luisetti, M, Beretta A, Casali L. Genetic aspects in sarcoidosis. Eur Respir J 2000;16:768-80.
5. McGrath DS, Daniil Z, Foley P, et al. Epidemiology of familial sarcoidosis in the UK. Thorax 2000;55:751-54.
6. Brennan NJ, Crean P, Long JP, Fitzgerald MX. High prevalence of familial sarcoidosis in an Irish population. Thorax 1984;39:14-18.

7. Stammers M, Rowen L, Rhodes D, et al. BTL-II: a polymorphic locus with homology to the butyrophilin gene family, located at the border of the major histocompatibility complex class II and class III regions in human and mouse. *Immunogenetics* 2000;51:373-82.
8. Newman LS, Rose CS, Maier LA. Sarcoidosis. *N Engl J Med* 1997;336: 1224-34.
9. Iannuzzi, MC. Genetics of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28:15-21.
10. Krinzman SJ, De Sanctis GT, Cernadas M, et al. Inhibition of T cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in a murine model. *J Clin Invest* 1996;98:2693-99.
11. Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, et al. The *BTNL2* gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet* 2005;77:491-99.
12. Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, Dong C. *BTNL2*, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol* 2006;176:7354-60.
13. Spagnolo P, Sato H, Grutters JC, et al. Analysis of *BTNL2* genetic polymorphisms in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens* 2007;70:219-27.

## Detection and analysis of *BTNL2* gene mutations in patients diagnosed with skin sarcoidosis

Kambiz Kamyab Hesari, MD<sup>1</sup>  
Shayandokht Taleb, MD<sup>1</sup>  
Laleh Montaser-Kouhsari, MD<sup>1</sup>  
Alireza Firooz, MD<sup>2</sup>

1. Razi Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Background and Aim:** Sarcoidosis is a non-caseous granulomatous disease that can involve several organs such as lung, kidney, liver, heart and skin. In systemic sarcoidosis, skin lesions occur in 20-35% of patients. Cutaneous sarcoidosis with no systemic involvement was found in about 25% of patients. Mutation within Butyrophilin-like 2 (*BTNL2*) gene, rs2076530 was reported in systemic sarcoidosis. However, there is no report of evaluation of mutation in *BTNL2* gene with the diagnosis of skin sarcoidosis.

**Methods:** In this study ten patients with skin sarcoidosis were evaluated for the mutation of rs2076530 allele in exon 5 of *BTNL2* gene. This assessment was performed by the single strand conformation polymerase chain reaction (SSCP-PCR) in which the existing mutations with positive shift were detected using direct sequence analysis. Data from sequence analysis were evaluated and blusted by means of Choroms computer software.

**Results:** Our results showed the *BTNL2* G→A transition of rs2076530 in seven patients and three patients were normal.

**Conclusion:** This pilot study concludes the presence of a mutation at rs2076530 in exon 5 of *BTNL2* gene in patients with skin sarcoidosis. Larger studies are needed to evaluate the role of this finding.

**Key words:** sarcoidosis, skin, *BTNL2* gene, mutatio

### Corresponding Author

Kambiz Kamyab Hesari, MD

Department of pathology, Razi Hospital,  
Vahdat-e-Eslami Square, Tehran, Iran.  
Email: sh\_t256@yahoo.com