

بررسی تنوع ژنتیکی موجود در مولکول‌های کلیدی سیستم تشخیص الگو (گیرنده‌های شبه‌تول دو و چهار) در نمونه‌های سرطان معده

سعید زرگری^۱، عباس بهاری^{۲*}، محمد تقی گودرزی^۳، مینو محمودی^۴، رضا ولدان^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده فناوری نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- استاد، گروه بیوشیمی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

۵- استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران

یافته / دوره ۲۳ / شماره ۵ / زمستان ۱۴۰۰ / مسلسل ۹۰

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۵

مقدمه: سرطان معده دومین بدخیمی شایع و عامل اصلی مرگ و میر در کشور است. با در نظر گرفتن آمار جهانی این ارقام بسیار نگران کننده بوده و اهمیت مطالعات در حوزه سرطان معده را برجسته می‌کند. از آنجایی که سال‌هاست نقش التهاب مزمن در ایجاد سرطان به خصوص سرطان‌های مرتبط با عفونت مانند سرطان معده مشخص شده است، تمرکز بر مولکول‌های دخیل در این فرآیندها می‌تواند راهگشا باشد. در این میان Toll-like-receptors (TLRs) بزرگترین خانواده گیرنده الگوهای مولکولی مرتبط با التهاب بوده و تاثیر جهش‌های ایجاد شده در TLR2 و TLR4 در پاتولوژی سرطان معده مشخص شده است. با در نظر گرفتن مطالعات پیشین و نقش عمده TLR2 و TLR4 در فرآیندهای التهابی پیش بدخیمی، در این مطالعه نیز در دو مرحله‌ی آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی به بررسی جهش موجود در توالی ژن‌های مذکور و ارتباط آن با سرطان معده پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۳۰ نمونه بافت سرطان معده آلوده به هلیکوباکتر پیلوری جمع آوری شد و پس از استخراج DNA، با استفاده از روش‌های تعیین توالی سنجر و پیش بینی بیماری توسط PolyPhen SIFT وضعیت پاتوژنی آنها بررسی شد. همچنین توسط PyMOL مدل سازی سه بعدی رسپتور - لیگاند (قبل و بعد از جهش) انجام شد.

یافته‌ها: داده‌ها جهش هتروزیگوت c.1061A>G در اگزون سوم ژن کد کننده‌ی TLR4 را نشان دادند. با مدل سازی سه بعدی پروتئین مربوطه دارای این جهش نیز مشخص شد که ناحیه‌ی متأثر از جهش خارج از منطقه‌ی میانکشی گیرنده مورد بررسی با LPS بوده و بنابراین پاتوژن نمی‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که جهش‌های اتفاق افتاده بر روی دو ژن مهم سیستم تشخیص الگو در نمونه‌های سرطانی ایران ارتباط عملکردی با این دو پروتئین نداشته است.

واژه‌های کلیدی: سرطان معده، التهاب، هلیکوباکتر پیلوری، پلی مورفیسم، TLRs.

*آدرس مکاتبه: زنجان، پژوهشکده فناوری نوین زیستی، دانشگاه زنجان.

پست الکترونیک: bahari@znu.ac.ir

مقدمه

Retinoic acid-4 lectin-receptors, CLR
 -5 inducible gene (RIG)-I-like receptors, RLRs
 Absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors,
 ALRs طبقه بندی می شوند (۱۰). TLRها به عنوان
 گلیکوپروتئین‌های سرتاسری (Integral glycoproteins)
 که بزرگترین و گسترده‌ترین کلاس PRRs محسوب می
 شوند، از نظر ساختاری در بخش خارج سلولی از تکرارهای
 غنی از لوسین (Leucine-rich repeat, LRR) و در
 بخش سیتوپلاسمی از دمین (IL-1 Toll/interleukin-1
 receptor, TIR) تشکیل شده‌اند.

حدود ۱۰ نوع TLRs در انسان شناسایی شده است که
 هر کدام از آن‌ها بصورت اختصاصی ساختارهای میکروبی
 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)
 مشتق شده از ویروس، باکتری، قارچ و پروتوزا را شناسایی
 می‌کنند (۱۱). مطالعات متعددی نقش TLR2 و TLR4 در
 پاسخ‌های ایمنی اولیه در برابر عفونت هلیکوباکتریلوری را
 گزارش کرده‌اند (۱۲، ۱۳).

ژن TLR4 بر روی بازوی بلند کروموزوم ۹ (9q33.1)
 قرار داشته و دارای ۴ اگزون است که پروتئین کاملاً
 حفاظت شده‌ای را کد می‌کند. رسپتور TLR4 به همراه
 کمپلکس (CD14, LBP و LPS) ناشی از باکتری‌های
 گرم منفی سبب القای مسیر وابسته به MYD88 و فعال-
 سازی NF-κB و ترشح سایتوکین‌ها از قبیل TNF-α،
 IL-1β، IL-12 و IL-6 می‌شود، از طرفی تحریک TLR4
 توسط لیپوپلی‌ساکارید باکتری سبب القای مسیر مستقل
 از MYD-88 و فعال‌سازی فاکتور تنظیمی اینترفرون
 (IRF3) و بیان ژن‌های IFN می‌شود، سایتوکین‌های
 پیش‌التهابی ترشح شده نقش مهمی در ایجاد درد، التهاب
 و تخریب بافتی در بدن انسان دارند (۱۴).

TLR2 نیز قادر به شناسایی اجزای مختلف باکتری-
 های گرم مثبت از قبیل لیپوپپتیدها، پپتیدوگلیکان،
 لیپوتایکوئیک اسید و همچنین LPS موجود در
 هلیکوباکتریلوری می‌باشد (۵). در مطالعه انجام شده توسط

سرطان معده از نظر شیوع در رده چهارم قرار داشته
 و به عنوان دومین بدخیمی منجر شونده به مرگ در
 سراسر جهان تعریف می‌شود که این میزان به دلیل
 تشخیص دیر هنگام، افزایش چشمگیری نشان می‌دهد.
 این نرخ در کشورهای پیشرفته اروپایی نسبت به
 کشورهای در حال پیشرفت آسیایی کمتر است که این امر
 خود نقشه جغرافیایی را برای مبتلایان در کشورهای
 مختلف ترسیم می‌کند (۱).

عوامل مختلف محیطی همچون ابتلا به هلیکوباکتر
 پیلوری و عوامل ژنتیکی در ایجاد استعداد به بدخیمی
 مذکور نقش ایفا می‌کنند. آتروفی معده و هیپوکلریدری
 (Hypochlorhydria) ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری
 به عنوان پیش‌ساز تغییرات پاتوفیزیولوژیک سرطان معده
 در نظر گرفته شده در صورتی که ۱ تا ۳ درصد افراد به
 سرطان معده مبتلا می‌شوند (۲).

بنابراین سهم بیشتر این موضوع مربوط به جهش‌های
 پاتوژن در ژن‌های وابسته به این بدخیمی در میزبان و
 تنوع در فاکتورهای ویروالانس باکتری تعریف شده است،
 عوامل ژنتیکی میزبان با پلی‌مورفیسم در ژن‌های سیستم
 ایمنی و تغییر در میزان تولید سایتوکین‌ها ارتباط دارد
 (۳، ۴). از این رو بسیاری از مطالعات بر روی آنالیز پلی-
 مورفیسم در ژن‌های مرتبط با پاسخ‌های التهابی در معده و
 خطر ابتلا به سرطان متمرکز شده‌اند (۵، ۶).

مطالعات پیشین تأیید کننده ارتباط مولکول‌های
 درگیر در التهاب با سرطان‌های مختلف است (۷، ۸، ۹).
 خانواده بزرگی که در سیستم ایمنی ذاتی و به تبع آن در
 التهاب نقش ایفا می‌کند، گیرنده‌های تشخیص الگو
 (Pattern-recognition-receptors, PRRs) هستند که
 از نظر ژنتیکی به پنج دسته عملکردی ۱- Toll-like-
 2 receptors, TLRs Nucleotide-binding
 3- leucine-rich repeat receptors, NLRs C-type

K) به هر نمونه اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (دمای ۵۵ درجه) قرار داده شد. در مرحله بعد، هم حجم بافر به میکروتیوب‌ها فنل اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ rpm ۱۴۰۰۰ شد. سپس فاز آبی به میکروتیوب جدیدی منتقل شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شد و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۴ هزار دور در دقیقه انجام شد (این مرحله فنل باقی‌مانده را کاهش داده و سبب تسهیل ایجاد لایه آبی می‌شود).

لایه‌ی رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و RNase A با غلظت ۱۰۰ µg/ml جهت حذف RNA به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه به میکروتیوب‌ها افزوده شد. همچنین مرحله ۱ تا ۴ جهت حذف RNase تکرار شد. برای رسوب DNA، ۱۰۰ میکرولیتر استات سدیم و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به میکروتیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۲۰- در فریزر نگهداری شدند.

در مرحله بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (rpm ۱۴۰۰۰). مایع رویی دور ریخته شده و میکروتیوب‌ها با اتانول ۷۰ درصد جهت حذف نمک‌های ناخواسته شستشو شدند و در نهایت به هر میکروتیوب ۳۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد (۱۶). پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA توسط نانودراپ و الکتروفورز، پرایمر برای مناطق مورد نظر بر مبنای منطقه میانکنش گیرنده و لیگاند اختصاصی آن با استفاده از نرم افزار 21 genomics Work bench CLC طراحی شد.

طراحی پرایمر بر اساس مدل (3D) MD2 و

TLR4

ابتدا از بانک داده پروتئین (Protein Data Bank, PDB)، ساختار پروتئینی TLR4 به شماره ثبت (4G8A) دانلود شد. برای طراحی دقیق‌تر پرایمر، در نرم افزار ICM-pro عوامل غیر ضروری مانند مولکول‌های آب و یکی از دایمرهای TLR4 (شامل MD2 و TLR4)

Rodríguez و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد پلی مورفیسیم Asp299Gly در TLR4 یک عامل خطر قطعی در ایجاد سرطان معده است. همچنین حذف ۲۲ نوکلئوتید (۱۷۴- تا ۱۹۷-) از ژن TLR2 در افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری خطر ابتلا به سرطان معده را افزایش می‌دهد (۱۵). بنابراین بررسی جهش‌های ژن‌های مذکور و به تبع آن مدل کردن ارتباط مولکولی این گیرنده‌ها با پروتئین‌های هدف چون LPS می‌تواند نقش مهمی در تعیین جهش‌های بیماری‌زای وابسته به این ژن‌ها، پیش بینی استعداد ابتلا و مدیریت، پیشگیری و نهایتاً درمان بیماری در مراحل مختلف بیماری داشته باشد.

در مطالعه حاضر واریانت‌های ژن‌های TLR2 و TLR4، پاتوژن بودن آنها و اثرات آنها در اتصال به مولکول‌های هدف مورد بررسی قرار گرفت که در دو مرحله محیط آزمایشگاهی و استفاده از نرم افزارهای پیش بینی کننده انجام شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه‌های مورد مطالعه و استخراج DNA

در مطالعه موردی-شاهدی حاضر جهت بررسی واریانت‌های TLR2 و TLR4 تعداد ۳۰ نمونه بافت سرطان معده پارافینه شده آلوده به هلیکوباکتر پیلوری، استخراج DNA انجام شد و پس از انجام PCR و تعیین توالی منطقه میانکنش گیرنده و لیگاند با توالی رفرنس (NM_001318796: TLR2 و NM_138554.5: TLR4) به عنوان کنترل، مورد بررسی قرار گرفتند.

طبق دستورالعمل جهت استخراج DNA: ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از بافت مورد نظر همراه با نیتروژن مایع درون هاون کوبیده و همگن شد. پس از انتقال نمونه‌ها به میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شامل (10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS, 200 µg/ml proteinase و mM NaCl)

شناسایی شده پس از وارد کردن در نرم افزار CLC genomic Work bench21 ترجمه معکوس انجام شد و در ناحیه اینتراکشن TLR2 و لیگاند مربوطه، پرایمر طراحی شد. توالی پرایمرهای مورد نظر در جدول ۱ به ترتیب ذکر شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرها برای تکثیر نواحی مورد بررسی در دو ژن ارائه شده.

Target	Fwd & Rev sequences	Amicon (bp)
TLR2	Fwd TGAGAGTGGGAAATATGG	889
	Rev CTGTGTATTCTGTGCTG	
TLR4	Fwd GTCCTGAACCCTATGAA	748
	Rev GGTGTGAGTATGAGAAATG	

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر Master mix red Taq 5x، ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بدون نوکلئاز انجام شد. مراحل PCR نیز طبق شرایط دمایی و زمانی (جدول ۳) انجام شد، دمای اولیه °C ۹۵ به مدت ۹۰ ثانیه، سپس ۳۵ سیکل شامل °C ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، °C ۵۲ به مدت ۳۰ ثانیه و °C ۷۲ به مدت ۸۰ ثانیه انجام شد.

در مرحله آخر یک مرحله ۵ دقیقه‌ای در °C ۷۲ به عنوان مرحله گسترش نهایی در نظر گرفته شد. در جدول ۲ و ۳ به ترتیب مواد مورد استفاده در هر میکروتیوب و دما-زمان مورد نیاز جهت انجام واکنش در دستگاه PCR ذکر شده است. به دنبال آن الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد جهت اطمینان از قطعات تکثیری مورد نظر استفاده شد و در نهایت نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند.

حذف شد. برای دست یابی به ناحیه‌ی اتصال TLR4 و LPS، چند آمینواسیدی که در فاصله ۵ آنگستروم دارای پیوند هیدروژنی با LPS بودند شناسایی شدند. در مرحله بعد توالی آمینواسیدی شناسایی شده وارد نرم افزار CLC genomic Work bench21 شده و با ترجمه معکوس توالی آمینواسیدی ناحیه‌ای حدود ۷۵۰ bp در ژن TLR4 جهت توالی‌یابی هدف گذاری شد. پرایمرهای Forward و Reverse در محدوده مورد نظر توسط نرم افزار CLC genomic Work bench21 طراحی شده و جهت سنتز به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای forward و reverse به ترتیب ذکر شده است.

طراحی پرایمر بر اساس مدل (3D) TLR2 و

آگونیسست Diprovocim

برای طراحی پرایمر TLR2، ساختار پروتئینی TLR2 از بانک داده‌های پروتئین PDB دانلود شد. همودایمر TLR2/TLR2 با شماره ثبت 6NIG با Diprovocim به عنوان لیگاند مصنوعی در نرم افزار CLC drug discovery version 4 جهت طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفت. Diprovocim به عنوان آگونیسست هتروداایمر TLR2/TLR1 به تازگی کشف شده است.

این آگونیسست باعث تشکیل هتروداایمر TLR1/TLR2 و همچنین همودایمر TLR2/TLR2 در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. ساختار کریستالوگرافی Diprovocim نشان داده است که دو مولکول از این آگونیسست به دو مونومر گیرنده شبه‌تول دو (بصورت همودایمر) توسط میانکنش‌های هیدروفوب و پیوندهای هیدروژنی متصل می‌شود (۱۷). مراحل طراحی پرایمر همانند مسیر TLR4 با حذف عوامل غیر ضروری از جمله مولکول‌های آب و یکی از دایمرهای TLR2 می‌باشد. بنابراین فقط یکی از حلقه‌ها و لیگاند مورد نظر جهت شناسایی توالی پروتئینی در فاصله ۵ آنگسترومی در فضای کار مورد استفاده قرار گرفت. توالی آمینواسیدی

آنالیزهای بیوانفورماتیکی

پس از تعیین توالی و شناسایی جهش‌های مربوط به ژن مورد نظر بیماری زایی آنها توسط SIFT و PolyPhen تعیین شد. در مرحله بعد ساختار سه بعدی پروتئین از سایت (<https://www.rcsb.org/>) به دست آمد و تغییرات حاصله اعمال و از طریق سایت (<https://swissmodel.expasy.org/>) مدلینگ ساختار سه بعدی انجام و نهایتاً از طریق سایت (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) عمل داکینگ پروتئین-لیگاند انجام و تصویر سازی با استفاده از PyMOL انجام شد.

یافته‌ها

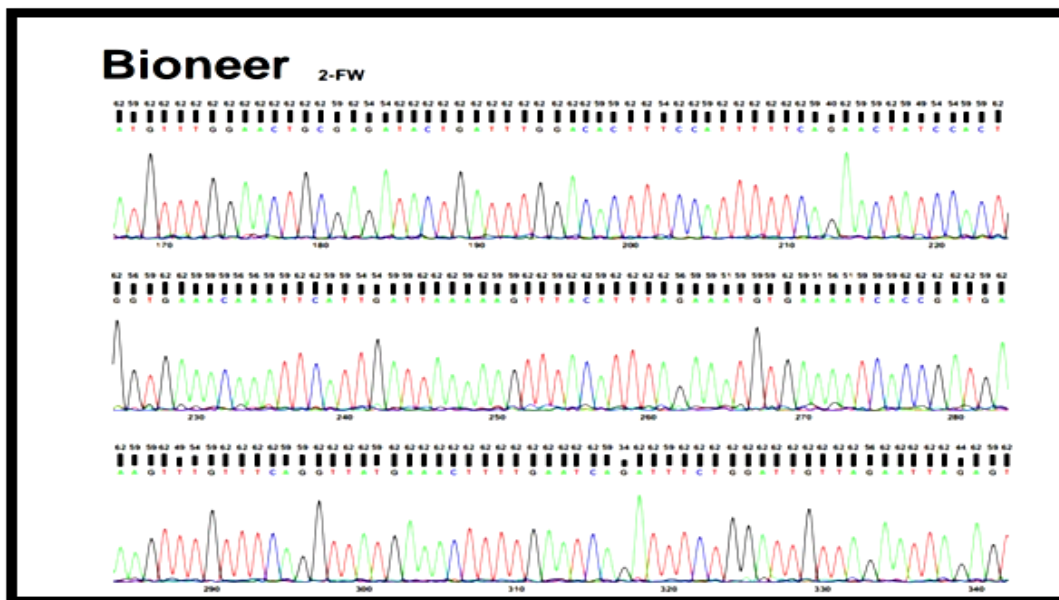
پس از استخراج DNA از ۳۰ نمونه بافت سرطان معده و طراحی پرایمر در ناحیه میانگنش گیرنده شبه‌تول دو و چهار (TLR2, TLR4) با لیگاند اختصاصی، در مراحل بعدی PCR و توالی‌یابی سنگر در ژن TLR2 و TLR4 انجام شد. همانطور که در (شکل ۱ و شکل ۲) مشاهده می‌شود تمامی پیک‌ها کاملاً واضح بوده و به درستی نوع بازهای آن تشخیص داده شده است.

جدول ۲. ترکیبات لازم جهت PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر

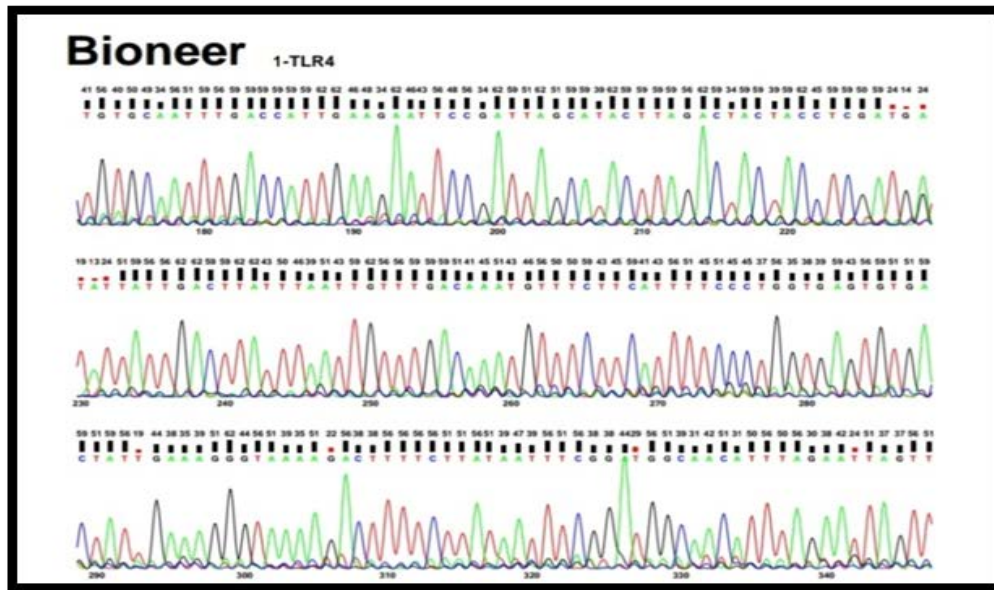
غلظت	حجم (میکرولیتر)	مواد لازم جهت واکنش
۱۵ pmol	۱/۵	پرایمر (Reverse)
۱۵ pmol	۱/۵	پرایمر (Forward)
۱۰۰ (نانوگرم)	۳	DNA الگو
1X	۶	Master mix red Taq 5x
	۳	آب دیونیزه
	۱۵	حجم نهایی

جدول ۳. برنامه دمایی-زمانی مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR

زمان (ثانیه)	دما (سلسیوس)	مراحل تکنیک PCR	مراحل و تعداد تکرار
۹۰	۹۵	دنا تورا سیون اولیه	۱ (۱)
۳۰	۹۵	دنا تورا سیون	۲ (۳۵)
۳۰	۵۲	اتصال پرایمر	۳ (۳۵)
۸۰	۷۲	مرحله ی طویل شدن	۴ (۳۵)
۳۰۰	۷۲	گسترش نهایی	۵ (۱)



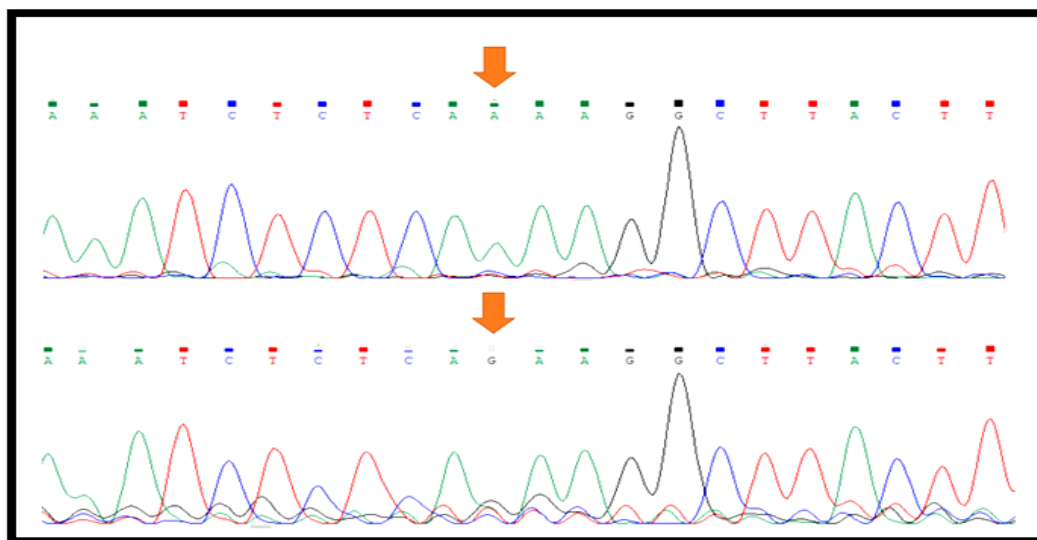
شکل ۱. بخشی از نتیجه تعیین توالی رشته‌ی پیشرو در گیرنده TLR2



شکل ۲. بخشی از نتیجه تعیین توالی در گیرنده TLR4

شد (شکل ۳). این جهش در اگزون شماره ۳ بود ولی مطابق پیش بینی کننده‌های SIFT و PolyPhen به ترتیب با نمره های ۰/۵۸ و ۰/۱۲ به عنوان تغییر نوکلئوتیدی غیر بیماری زا تشخیص داده شد.

طبق بررسی‌های انجام شده پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی تغییر دهنده آمینواسید در گیرنده TLR2 مشاهده نشد، اما جهش هتروزایگوت در موقعیت ۱۰۶۱ (c.1061A>G NM_138554.5) شناسایی



شکل ۳. آنالیز Alignment گیرنده شبه‌تول چهار با توالی رفرنس.

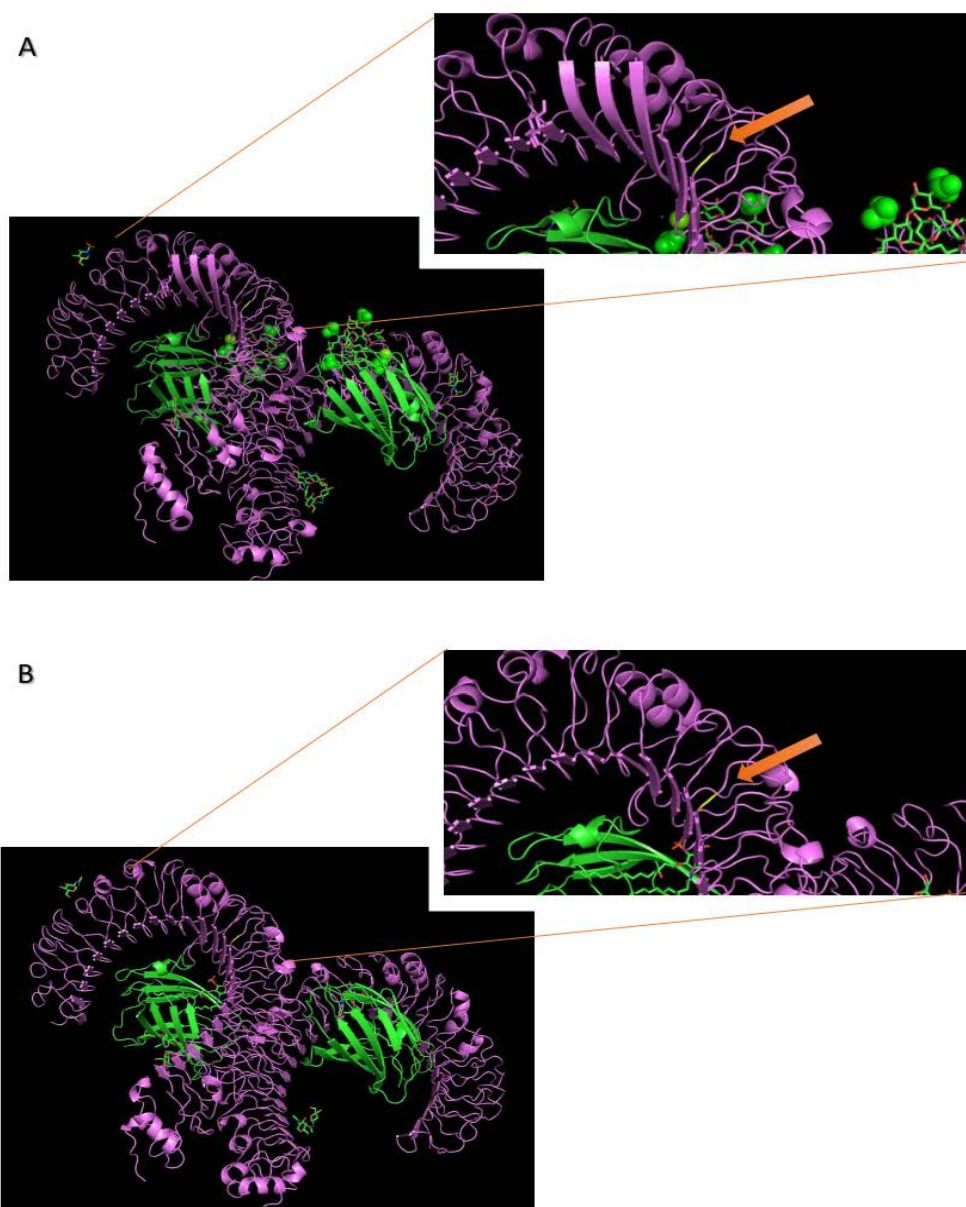
همانطور که در شکل مشاهده می شود، در موقعیت ۱۰۶۱ نوکلئوتید A (تصویر بالا- توالی رفرنس NM_138554.5) به نوکلئوتید G (تصویر پایین- نمونه سرطان معده) تبدیل شده است.

جهش مذکور منجر به تغییر اسیدامینه لیزین به آرژینین در موقعیت ۳۵۴ (p.K354R) گیرنده شبه‌تول چهار می‌شود که بعد از دریافت پروتئین سالم با کد PDB ID: 3FXI

که در آن کمپلکس حاوی ساختار کریستالی TLR4-MD2 انسانی و LPS به تصویر کشیده شده، تغییرات حاصله بعد از جهش اعمال

برهمکنش TLR4 و LPS است که نشان دهنده عدم پاتوژن بودن تغییر یافت شده می‌باشد (شکل ۴ و ۵).

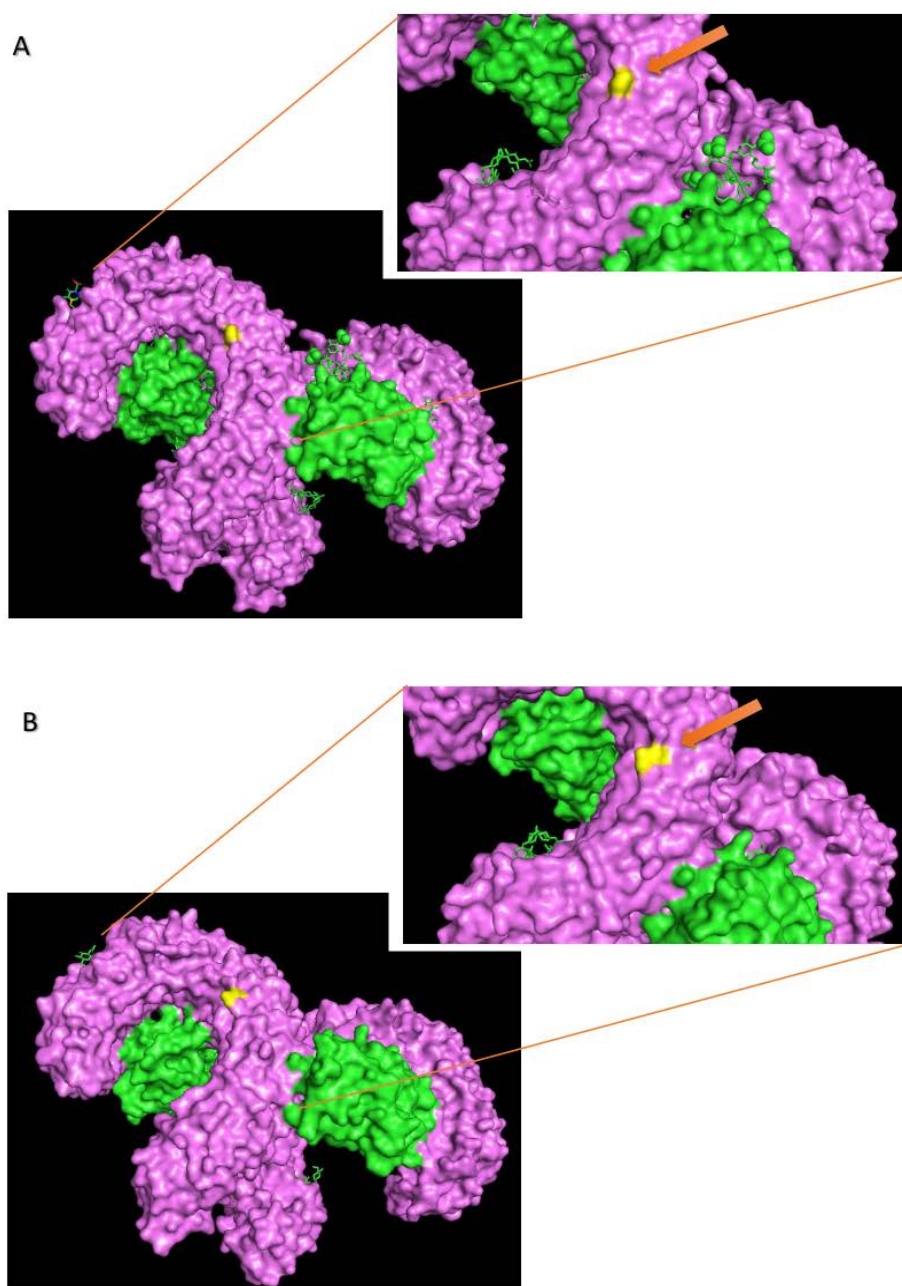
شدند و با مدلینگ ساختار سه بعدی گیرنده و لیگاند، نتایج حاکی از دور بودن نقطه تغییر یافته از محل تلاقی و



A; Normal protein, B: Mutated

شکل ۴. ساختار روبان کمپلکس پروتئینی TLR4 انسانی (رنگ بنفش) و MD-2 (روبان های سبز) و LPS (اجسام کروی سبز با شبکه سبز-قرمز).

همانطور که در شکل مشاهده می شود نقطه جهش زرد رنگ که با فلش نارنجی هم مشخص شده قبل (تصویر A) و بعد از تغییر آمینواسیدی (تصویر B) دچار تغییر بخصوصی نمی شود و نقطه مورد نظر دور تر از ناحیه برهمکنش دو پروتئین است.

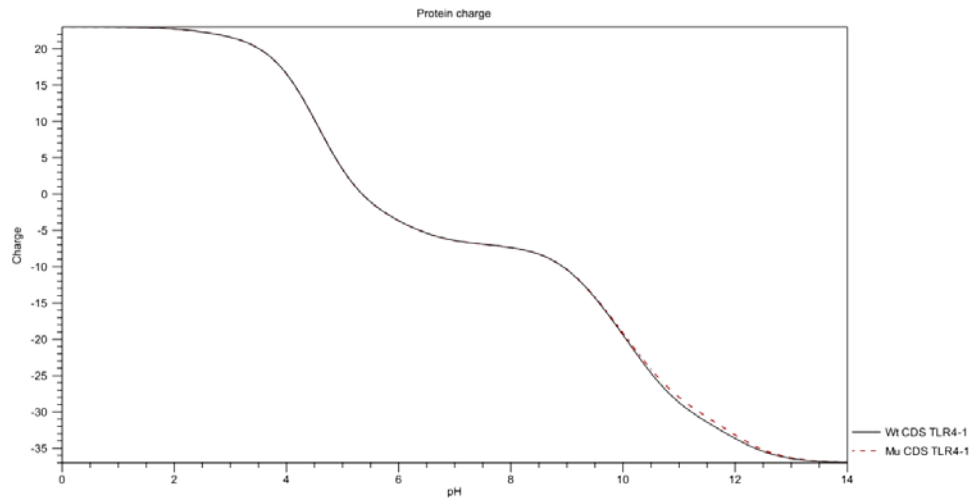


شکل ۵. ساختار سطحی کمپلکس پروتئینی TLR4 انسانی (رنگ بنفش) و MD-2 (روبان های سبز) و LPS (اجسام کروی سبز با شبکه سبز-قرمز).

همانطور که در شکل مشاهده می شود، نقطه جهش زرد رنگ که با فلش نارنجی هم مشخص شده قبل (تصویر A) و بعد از تغییر آمینواسیدی (تصویر B) دچار تغییر بخصوصی نمی شود و نقطه مورد نظر دورتر از ناحیه برهمکنش دو پروتئین است.

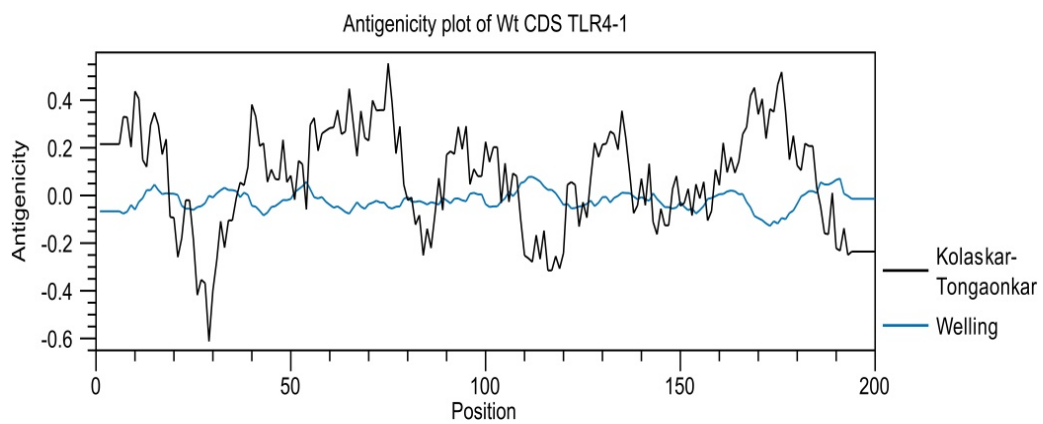
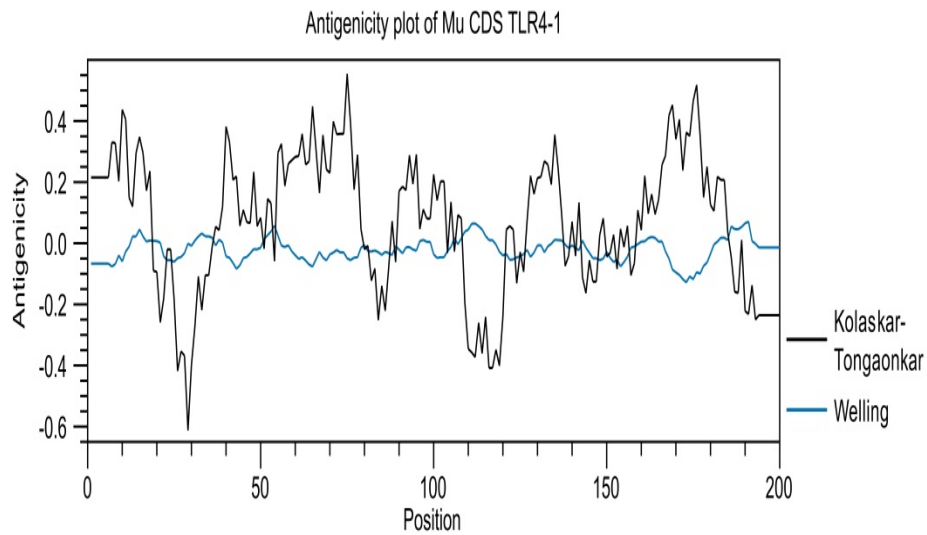
است. همچنین مطالعات آب گریزی یا هیدروفوبیسیته TLR-4 نرمال و جهش یافته در ۲۰۰ ناحیه مختلف پروتئین نشان از عدم تغییر در میزان هیدروفوبیسیته پروتئین مذکور دارد.

بررسی تغییرات بار پروتئین در PH های مختلف و پیش بینی واکنش به آنتی ژن قبل و بعد از اعمال جهش نیز تغییر بخصوصی را نشان نداد که در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده



شکل ۶. دیاگرام تغییرات شارژ پروتئین TLR4 در PH مختلف

در بررسی پروتئین نرمال (wt) و جهش‌یافته (Mu) در PH مختلف تغییر شارژ قابل توجهی مشاهده نمی‌شود.



شکل ۷. واکنش به آنتی‌ژن در پروتئین TLR4 نرمال و جهش‌یافته

همانطور که در شکل مشاهده می‌شود واکنش به آنتی‌ژن در ۲۰۰ ناحیه مختلف پروتئین نرمال (wt) و پروتئین جهش یافته (Mu) مشابه می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس آمار Global Cancer Observatory، مبتلایان ایرانی به سرطان معده از نظر شیوع در رتبه‌ی دوم و از جهت مرگ و میر نزدیک به ۱۳ هزار نفر رتبه اول فوت بر اثر ابتلا به این سرطان را دارد. این آمار به صورت چشمگیر در هر دو زمینه شیوع و ابتلاء منجر به فوت از آمار جهانی متفاوت می‌باشد، به طوری‌که این سرطان در جهان در رتبه‌ی پنجم شیوع و از نظر مرگ و میر در رتبه چهارم قرار دارد (۱۸). این موضوع اهمیت مطالعات محلی در حوزه سرطان معده را آشکارتر می‌کند. غشای خارجی هلیکوباکتریلوری حاوی لیپوپلی‌ساکارید (LPS) می‌باشد که توسط گیرنده‌های سطح سلولی از جمله TLR2 و TLR4 در سطح سلول‌های اپیتلیال و سلول‌های ایمنی شناسایی می‌شود (۱۹). علاوه بر این، TLR4 و TLR2 در شناسایی مولکول‌های خارجی که توسط آسیب سلولی و سلول‌های نکروتیک آزاد می‌شوند نیز دخیل می‌باشند. در واقع این گیرنده‌ها توسط برهمکنش با مولکول‌های مرتبط با آسیب سلولی در فرآیندهای پاسخ شدید پیش التهابی شرکت می‌کنند (۲۰). با در نظر گرفتن نقش مهم TLRs در ایجاد التهاب توسط پاسخ به محرک‌های مختلف (۲۱، ۲۲، ۲۳) از یک سو و نقش محوری التهاب مزمن در ایجاد سرطان‌ها (۲۴) از سوی دیگر، اهمیت این گیرنده‌ها و جهش‌های رخ داده در ژن‌های مربوطه آشکار می‌شود. بر همین اساس مطالعه‌ی حاضر نیز بر شناسایی جهش در ژنوم نمونه‌های مورد بررسی متمرکز بود. گزارش‌های متعددی مبنی بر رخداد تغییرات توالی و همچنین میزان بیان تغییر یافته ژن TLR4 و TLR2 در سرطان‌ها و به ویژه در سرطان معده وجود دارد (۱۲، ۱۵، ۲۵). در مطالعه‌ی Ze Li و همکاران، ارتباط چندین پلی‌مورفیسم ژنتیکی TLR4 با ریسک ابتلا به سرطان معده مورد بررسی قرار گرفته است که از این میان rs7869402 و rs7873784 با ریسک کاهش یافته‌ی ابتلا به سرطان

معده همراهی داشتند (۲۶). در مقابل نتیجه‌ی مطالعه‌ی دیگری نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (p.D299G) c.896A>G با ریسک افزایش یافته‌ی ابتلا به سرطان معده همراهی داشته (۳) و سلول‌های حاوی این جهش دارای پاسخ تقلیل یافته به لیپوپلی‌ساکارید می‌باشند (۲۷، ۲۸). منطبق با این یافته و مطالب پیشین عنوان شده در متن، تأثیر عمده‌ی جهش‌های رخ داده در توالی ژن کد کننده‌ی TLR4 بر میانگین این گیرنده و لیگاند آن (LPS) مربوط به باکتری گرم منفی مانند هلیکوباکتریلوری می‌باشد. مطالعه‌ی Wang و همکاران این تأثیر را به خوبی نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که ژنوتایپ AA مربوط به پلی‌مورفیسم rs1057317 در افراد دارای عفونت هلیکوباکتریلوری با ریسک افزایش یافته‌ی ابتلا به سرطان معده (۹۵٪ confidence interval, 1.12 to 2.70; odds ratio, 1.74; P = 0.0129) معنی دار است (۲۹). از طرفی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در TLR2 سبب تغییر حساسیت این گیرنده به بیماری‌های مختلف التهابی و عفونی شده که از مهمترین آن‌ها Arg677Trp و Arg753Gln می‌باشند. Arg677Trp سبب اختلال در دومین داخل سلولی شده و عدم ارتباط با Myd88 سبب کاهش تولید سایتوکاین‌ها بویژه اینترلوکین ۲ می‌شود، طبق گزارش‌ها جدام لپروماتوز در جمعیت کره با Arg677Trp و عفونت‌های مکرر کودکان در ترکیه با پلی‌مورفیسمی که سبب تغییر اسیدامینه آرژینین به گلوتامین شده در ارتباط می‌باشند (۳۰، ۳۱) در این مطالعه نیز ما با آنالیز توالی ژنومی TLR4 و TLR2 با استفاده از توالی یابی سنگر، واریانته‌ی که منجر به تغییر آمینو اسیدی در TLR2 شود مشاهده نشد. اما جهش در توالی TLR4 در موقعیت ۱۰۶۱ (c.1061A>G NM_138554.5) شناسایی شد. این جهش هتروزایگوت بوده و در آزمون سوم ژن قرار داشت. در مرحله‌ی بعدی نیز جهت بررسی پاتوژن بودن جهش مورد نظر از پیش‌بینی کننده‌های SIFT و PolyPhen

دقیق‌تر دینامیک و پایداری هریک از رشته‌های این پروتئین و پتانسیل رسوب آن‌ها نیز می‌تواند کمک کننده باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از نوع تجربی بوده و رعایت ضوابط اخلاقی و مطابقت آن با قوانین ملی و بین‌المللی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان با کد اخلاق ۴۵۶۱ به تصویب رسیده است. بدین وسیله از کلیه اساتید دانشگاه زنجان که صمیمانه ما را در اجرای این طرح یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی داریم.

استفاده شد که بر اساس آن‌ها این جهش، به ترتیب با نمره های ۰/۵۸ و ۰/۱۲ به عنوان تغییر نوکلئوتیدی غیر بیماری زا تشخیص داده شد. این جهش که منجر به جایگزینی لیزین با آرژینین در موقعیت ۳۵۴ (p.K354R) می‌شود، در بررسی‌های مدلینگ ساختار سه بعدی TLR4-MD2 انسانی در میانکنش با LPS به دلیل دور بودن آن از محل تلاقی و برهمکنش لیگاند-رسپتور به عنوان غیرپاتوژن شناخته شد. با این حال، در نظر گرفتن سایر مکانیسم‌های مستعد کننده‌ی به بیماری نیز ضروری می‌باشد و مطالعات همراهی می‌توانند استعداد افزایش یافته ابتلا به بیماری را در ارتباط با تغییر نوکلئوتیدی شناسایی شده، آشکار کنند. با در نظر گرفتن این نتایج می‌بایست، در مطالعات آینده با استفاده از سایر روش‌های بررسی ژنوم مانند تکنیک های توالی‌یابی انبوه چندین جهش عمده شناسایی و بررسی شوند. همچنین مطالعات

References

1. Carcas LP. Gastric cancer review. *J Carcinog*. 2014;13:14.
2. Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):713-39.
3. Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Smith MG, Gammon MD, Risch HA, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology*. 2007;132(3):905-12.
4. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, et al. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer*. 2005;114(2):237-41.
5. Rad R, Ballhorn W, Voland P, Eisenächer K, Mages J, Rad L, et al. Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*. 2009; 136(7):2247-57.
6. Partida-Rodríguez O, Torres J, Flores-Luna L, Camorlinga M, Nieves-Ramírez M, Lazcano E, et al. Polymorphisms in TNF and HSP γ -show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *Int J Cancer*. 2010;126(8):1861-8.
7. Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(4):713-39.
8. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244-65.
9. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, Bouvier AM, Simon T, Allez M, et al. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;145(1):166-75.e8.
10. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.*. 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
11. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 2007;7(5):353-64.
12. Yokota S, Okabayashi T, Rehli M, Fujii N, Amano K. Helicobacter pylori lipopolysaccharides upregulate toll-like receptor 4 expression and proliferation of gastric epithelial cells via the MEK1/2-ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.*. 2010; 78(1): 468-476.
13. Obonyo M, Sabet M, Cole SP, Ebmeyer J, Uematsu S, Akira S, et al. Deficiencies of myeloid differentiation factor 88, Toll-like receptor 2 (TLR2), or TLR4 produce specific defects in macrophage cytokine secretion induced by Helicobacter pylori. *Infect. Immun*. 2007;75(5):2408-14.
14. Castaño-Rodríguez N, Kaakoush NO, Mitchell HM. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front immunol*. 2014;5:336.
15. Castaño-Rodríguez N, Kaakoush NO, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. The role of

- TLR2, TLR4 and CD14 genetic polymorphisms in gastric carcinogenesis: a case-control study and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(4):e60327.
16. Pikor LA, Enfield KS, Cameron H, Lam WL. DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *J Vis Exp*. 2011(49).
 17. Su L, Wang Y, Wang J, Mifune Y, Morin MD, Jones BT, et al. Structural Basis of TLR2/TLR1 Activation by the Synthetic Agonist Diprovocim. *J. Med. Chem*. 2019;62(6):2938-49.
 18. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*. 2021;71(3):209-49.
 19. Cadamuro ACT, Rossi AFT, Matos Biselli-Périco J, Fucuta Pereira P, Do Vale EPBM, Acayaba R, et al. Effect of *Helicobacter pylori* Eradication on TLR2 and TLR4 Expression in Patients with Gastric Lesions. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:481972.
 20. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*. 2010;14(11):2592-603.
 21. Zhang YB, He FL, Fang M, Hua TF, Hu BD, Zhang ZH, et al. Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol. Biol. Rep*. 2009;36(6):1475-81.
 22. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410(6832):103-1099.
 23. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
 24. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):8-732.
 25. Lagunes-Servin H, Torres J, Maldonado-Bernal C, Pérez-Rodríguez M, Huerta-Yépez S, Madrazo de la Garza A, et al. Toll-like receptors and cytokines are upregulated during *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter*. 2013;18(6):423-32.
 26. Li Z, Gao H, Liu Y, Wu H, Li W, Xing Y, et al. Genetic variants in the regulation region of TLR4 reduce the gastric cancer susceptibility. *Gene*. 2021;767:145181.
 27. Higgins SC, Lavelle EC, McCann C, Keogh B, McNeela E, Byrne P, et al. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;171(6):3119-27.
 28. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000;25(2):187-91.
 29. Wang YW, Zhang CH, He X. Minor allele of rs1057317 polymorphism in TLR4 is associated with increased risk of

- Helicobacter pylori -induced gastric cancer. J Cell Biochem. 2018.
30. Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001;31(1):53-8.
31. Kutukculer N, Yeniay BS, Aksu G, Berdeli A. Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor-2 gene in children with recurrent febrile infections. Biochem Genet. 2007;45(7-8):507-14.

Genetic Diversity in Key Molecules of Pattern Recognition Receptors (TLR4 and TLR2) in Gastric Cancer

Zargari S¹, Bahari A^{2*}, Goodarzi MT³, Mahmoodi M⁴, Valadan R⁵

1. Ph.D. Student of Biochemistry, Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

2. Assistant Professor, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran, bahari@znu.ac.ir

3. Professor, Department of Biochemistry, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran

4. Assistant Professor, Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

5. Assistant Professor, Department of Immunology, Molecular and Cell Biology Research Center, School of Medicine, Mazandaran University of Medical science, Mazandaran, Iran

Received: 26 Dec 2021

Accepted: 25 Jan 2022

Abstract

Background: Gastric cancer (GC) is the second most common malignancy and the leading cause of death in Iran. The global statistics regarding GC are highly worrying highlighting the importance of studies in this field. Given that the role of chronic inflammation in the development of cancer, especially infection-related cancers, such as GC, has been revealed for many years, evaluating the molecules involved in these processes can be helpful. Toll-like-receptors (TLRs) as the greatest family of receptors for inflammation-associated inflammatory patterns, and the effect of mutations in TLR2 and TLR4 on the pathology of GC has been identified. Considering the results of previous studies and the major role of TLR2 and TLR4 in inflammatory processes of pre-malignancy, in this study, the mutation in the sequence of these genes and its association with GC have been investigated in both laboratory and bioinformatics stages.

Materials and Methods: In this study, 30 *Helicobacter pylori*-positive GC samples were collected and after DNA extraction using Sanger sequencing methods, and subsequently, variant pathogenicity predictions, such as SIFT and PolyPhen, mutation pathogenicity was predicted. Following that, PyMOL was applied to model 3D structures of the wild and mutated receptor.

Results: Sanger sequencing data showed a heterozygous mutation in exon 3 of TLR4 c.1061A>G. The modeling crystal structure of the human receptor and LPS complex showed that the variant was far from the TLR4 binding sites with its ligand.

Conclusion: The results of this study indicated that mutations in two important genes of the pattern recognition system in Iranian cancer samples have no functional relevance with these two proteins.

Keywords: Gastric cancer, *Helicobacter pylori*, Inflammation, Polymorphism, TLRs.

***Citation:** Zargari S, Bahari A, Goodarzi MT, Mahmoodi M, Valadan R. Genetic Diversity in Key Molecules of Pattern Recognition Receptors (TLR4 and TLR2) in Gastric Cancer. *Yafte*. 2022; 23(5):65-79.