

ANALIZA ASOCIERII POLIMORFISMELOR TLR2 (-196 PÂNĂ LA -174 INS / DEL) ȘI TLR9 (1174 C / T) CU TUBERCULOZA PULMONARĂ LA POPULAȚIA REPUBLICII MOLDOVA

Alexander VARZARI, dr. în șt. biologice, conf. cercetător, Ina SURUCEANU,
Ecatarina AXENTII, Andrei CORLOTEANU,
Iurie VLADEI, Elena TUDOR, dr. în șt. medicale, conf. cercetător

Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova

Rezumat

Receptorii Toll-like recunosc structurile moleculare legate de agentul patogen a micobacterii și, astfel, joacă un rol important în protecția organismului față de infecția tuberculoasă. Scopul acestei lucrări a fost studierea asocierii polimorfismelor *TLR2* (-196 până la -174 ins / del, rs111200466) și *TLR9* (1174 C / T, rs352139) cu tuberculoza pulmonară (TB) în populația Republicii Moldova.

Materiale și metode: În studiul au fost incluși 279 de pacienți cu TB confirmată bacteriologic; grupul de control a fost format din 261 de persoane clinic sănătoase din focarele de tuberculoză. Genotizarea polimorfismului *TLR2* (-196 to -174 ins / del, rs111200466) a fost realizată prin reacția de polimerizare în lanț (PCR) și electroforeză în gel; Polimorfismul *TLR9* (1174 C / T, rs352139) a fost determinat prin spectrometrie de masă MALDI-TOFF. Prezența asociației a fost determinată prin metoda regresiei logistice.

Rezultate: S-a determinat o asociere statistic semnificativă a polimorfismului *TLR9* (1174 C / T, rs352139) cu TB pulmonară în cazul codominant (OR = 0,59; CI = 0,38-0,90; P = 0,008), dominant (OR = 0,55; CI = 0,36-0,82; P = 0,0034) și modelul de moștenire log-aditiv (OR = 0,65; CI = 0,49-0,86; P = 0,0024). Nici o asociere nu a fost determinată între polimorfismul *TLR2* (-196 până la -174 ins / del, rs111200466) și TB pulmonară.

Concluzie: Polimorfismul *TLR9* (1174 C / T, rs352139) poate influența riscul de dezvoltare a tuberculozei pulmonare la populația Republicii Moldova.

Cuvinte-cheie: Toll-like receptori, *TLR2*, *TLR9*, polimorfism genetic, tuberculoză pulmonară, analiza cos-control

Summary. Analysis of the association of polymorphisms *TLR2* (-196 to -174 ins / del) and *TLR9* (1174 C / T) with pulmonary tuberculosis in the population of the Republic of Moldova

Toll-like receptors recognize the molecular structures linked to the mycobacterial pathogen and thus play an important role in protecting the body from tuberculosis. The purpose of this work was to study the association of *TLR2* polymorphisms (-196 to -174 ins / del, rs111200466) and *TLR9* (1174 C / T, rs352139) with pulmonary tuberculosis (TB) at the population of the Republic of Moldova.

Materials and methods: 279 patients with bacteriologically confirmed TB were included in the study; the control group consisted of 261 clinically healthy persons from tuberculosis outbreaks. Genotyping of *TLR2* polymorphism (-196 to -174 ins / del, rs111200466) was performed by chain polymerization (PCR) reaction and gel electrophoresis; *TLR9* polymorphism (1174 C / T, rs352139) was determined by MALDI-TOFF mass spectrometry. The presence of the association was determined by the logistic regression method.

Results: It was determined a statistically significant association of *TLR9* polymorphism (1174 C / T, rs352139) with pulmonary TB in the co-dominant case (OR = 0.59; CI = 0.38-0.90; P = 0.008), dominant (OR = 0.55; CI = 0.36-0.82; P = 0.0034), and the log-additive inheritance model (OR = 0.65; CI = 0.49-0.86; P = 0.0024). No association was determined between *TLR2* polymorphism (-196 to -174 ins / del, rs111200466) and pulmonary TB.

Conclusion: *TLR9* polymorphism (1174 C / T, rs352139) can influence the risk of developing pulmonary tuberculosis at the population of the Republic of Moldova.

Key-words: Toll-like receptors, *TLR2*, *TLR9*, polymorphism, pulmonary tuberculosis, case-control analysis

Резюме. Анализ ассоциации полиморфизмов *TLR2* (-196 to -174 ins / del) и *TLR9* (1174 C/T) с легочным туберкулезом в популяции Республики Молдова

Цель исследования: Толь-подобные рецепторы распознают патоген-связанные молекулярные структуры микобактерий и, таким образом, играет важную роль в противотуберкулезной защите организма. Целью настоящей работы явилось изучение ассоциации полиморфизмов *TLR2* (-196 to -174 ins/del, rs111200466) и *TLR9* (1174 C/T, rs352139) с туберкулезом легких (ТБ) в популяции Республики Молдова.

Материалы и методы: В исследовании приняли участие 279 пациентов с бактериологически-подтвержденным ТБ; контрольную группу составили 261 клинически здоровых лиц из эпидемических очагов. Генотипирование полиморфизма *TLR2* (-196 to -174 ins/del, rs111200466) проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гель-электрофореза; полиморфизм *TLR9* (1174 C/T, rs352139) выявлялся методом масс-спектрометрии MALDI-TOFF. Ассоциации оценивались методом логистической регрессии.

Результаты: Выявлена статистически значимая ассоциация полиморфизма *TLR9* (1174 C/T, rs352139) с ТБ

легких в случае ко-доминантной (OR = 0,59; CI = 0,38-0,90; P = 0,008), доминантной (OR = 0,55; CI = 0,36-0,82; P = 0,0034) и лог-аддитивной (OR = 0,65; CI = 0,49-0,86; P = 0,0024) моделей наследования. Связи между полиморфизмом *TLR2* (-196 to -174 ins/del, rs111200466) и ТБ легких обнаружено не было.

Заключение: Полиморфизм *TLR9* (1174 C/T, rs352139) может влиять на риск ТБ легких в популяции Республики Молдовы.

Ключевые слова: Толь-подобные рецепторы, ген *TLR2*, ген *TLR9*, генетический полиморфизм, туберкулез легких, анализ случай-контроль

Introducere

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) este un factor cheie în etiologia tuberculozei (TB). Rezultatul și evoluția infecției depind de sistemul imun al macroorganismului. Doar 5-10% dintre persoanele infectate prezintă boală activă [8]. Deși mecanismul acestei selectivități nu este în întregime clar, cercetările indică la rolul principal al factorilor genetici în dezvoltarea predisunerii la tuberculoză [10], [17], [5].

Interacțiunea dintre *M. tuberculosis* și patogenul este inițiată după ce bacteriile sunt recunoscute de o varietate de receptori moleculari de la suprafața și din interiorul celulelor sistemului imun. Acestea includ receptorii Toll-like (TLRs) [2]. În prezent, la om au fost descrise 11 tipuri de TLRs, care diferă în ceea ce privește localizarea lor și specificul antigenic [6].

TLR9 este localizat pe membranele endozomilor intracelulari și recunoaște CpG-motive pe ADN-ul bacterian. *TLR2* este o proteină membranară externă care recunoaște componentele lipopolisacaride și glicoproteine ale bacteriilor. S-a determinat că șoarecii cu o dublă depleție a genelor *TLR2* și *TLR9* (*TLR2/9* - / -) au avut o sensibilitate crescută la infecția cu *M. tuberculosis* și au prezentat o deficiență de citokine a răspunsului inflamator precoce [1]. Polimorfismul genelor care codifică receptorii de tip Toll pot afecta nivelul lor de expresie sau capacitatea lor de a recunoaște un patogen [11]. O serie de studii notează asocierea polimorfismelor ereditare în genele *TLR2* și *TLR9* cu TB [7], [16], [16], [3], [14].

În acest studiu, s-a efectuat o analiză genetică asociativă între polimorfismul de depleție a genei *TLR2* (-196 până la -174 ins / del, rs111200466) și polimorfismul uninucleotidic *TLR9* (1174 C / T, rs352139) cu TB pulmonară în populația Republicii Moldova.

materiale și metode

Eșantioane

Acest studiu a fost aprobat de Comitetul de etică al Institutului de Ftio pneumologie „Chiril Draganiuc” (Republica Moldova) și a respectat principiile Declarației de la Helsinki. Participanții în studiu au oferit consimțământ informat scris pentru participarea lor în studiu. Grupul de bază a fost format din 279 de pacienți fără legătură de rudenie (122 de femei și

157 de bărbați; vârsta medie la recrutare = $40,7 \pm 12,7$ ani; vârsta medie la diagnostic = $39,1 \pm 12,2$ ani) cu tuberculoză pulmonară infiltrativă. Diagnosticul s-a bazat pe simptome clinice și schimbări la examenul radiologic al toracelui urmat de confirmarea prin examen bacteriologic. Au fost excluși din studiu pacienții cunoscuți fiind cu imunodeficiență (de exemplu, din cauza infecției cu HIV, diabet, cancer sau terapie imunosupresivă administrată). Toți pacienții aveau origine europeană și predominant moldovenească (91,5%). Grupul de control a cuprins 261 de persoane sănătoase fără relații de rudenie și conform etniei: moldoveni, 87% (157 de femei și 104 bărbați; vârsta medie la recrutare = $47,6 \pm 14,1$ ani), care locuiau în focarele de tuberculoză. Din grupul de control au fost excluși dacă aveau antecedente de tratament anti-tuberculos anterior, semne sau simptome care sugerează TB activă și/sau prezentau infiltrate pe radiografia toracică.

Probele de sânge venos (anticoagulant EDTA adăugat) au fost colectate de la toți participanții în studiu, iar ADN-ul genomic a fost extras din leucocitele din sângele periferic folosind o metodă standard de salinizare. Toți participanții la studiu au fost vaccinați BCG.

Genotiparea

Genotiparea *TLR2* (-196 până la -174 ins/del, rs111200466) a fost realizată în Laboratorul Genetică Umană, Institutul de Ftio pneumologie „Chiril Draganiuc” prin intermediul reacției de polimerizare în lanț (PCR) conform protocolului publicat [12]. В кратце, прмерии pentru polimorfismul *TLR2* (-196 până la -174 ins/del) au fost: R: 5'-CTGGGCCGT-GCAAAGAAG и F: 3'-CACGGAGGCAGCGA-GAAA. Reacția PCR a fost realizată folosind amplificatorul BioRad (*T100 Thermal Cycler*) pentru un volum de 20 μ l ce conținea 2 μ l 10 x PCR bufer c ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), и 25 mM MgCl_2 , 2 μ l dNTP (câte 0,2 mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 μ l de fiecare primer (100 pmol/ μ l), 0,12 μ l Taq polimeraza (5 unități/ μ l), 11,3 μ l H_2O și 1,0 μ l ADN genomic. În urma primului pas de denaturare (95°, 5 min) au urmat 30 cicluri cu 95° - 30 sec, 63° - 40 sec, 72° - 40 sec și elongarea finală timp de 7 min la 72°, iar fragmentele rezultate în urma amplificării au fost analizate în gel de agaroză de 2% cu bromură de etidium. Pentru ana-

liza rezultatelor electroforezei, în cazul genotipării genei, s-a folosit markerul de referință „50 pb Ladder DNA marker”.

Genotiparea *TLR9* (1174G/A, rs352139) s-a efectuat prin metoda spectrometrie de masă MALDI-TOFF în Centrul de Cercetare a Mediului și Sănătății de Helmholtz și în Munchen, Germania. Praimerii au fost proiectați folosind Assay Design Suite v2.0 (<https://agenacx.com>).

Procesarea statistică

Controlul de repartizare a genotipurilor în lotul de control la corespunderea echilibrului Hardy-Weinberg (HWE) s-a efectuat prin aplicarea criteriului χ^2 . Compararea frecvenței genotipurilor între grupele pacienți și sănătoși s-a efectuat cu ajutorul regresiei logistice, ținând cont de factorii potențiali care pot influența (confounding), cum ar fi vârsta și genul. Analiza a fost realizată pentru cazuri de modele dominante, recesive, co-dominante, log-aditive și super-dominante ale moștenirii polimorfismelor. Analiza statistică a datelor s-a efectuat cu ajutorul programelor SISA și SNPstat.

Rezultate

Rezultatele analizei polimorfismelor *TLR2* (-196 până la -174 ins / del, rs111200466) și *TLR9* (1174G / A, rs352139) și asociațiilor lor cu TB pulmonară sunt prezentate în tabelul 1. Valorile de frecvență ale alelelor celor două polimorfisme sunt în intervalul de variație al polimorfismelor respective observate la populațiile europene. Distribuțiile observate ale genotipurilor ambelor loci corespund cu cele așteptate, conform legii de echilibru Hardy-Weinberg în grupurile de pacienți și persoane sănătoase.

Analiza nu a evidențiat diferențe semnificative a polimorfismului *TLR2* (-196 până la -174 ins/del, rs111200466) între grupurile de pacienți și persoanele sănătoase, fiind luate în considerare toate tipurile de moștenire. Asocierea polimorfismului *TLR2* (-196 până la -174 ins/del, rs111200466) cu tuberculoza nu a fost confirmată în subgrupele de bărbați și femei și la compararea indivizilor sănătoși cu două subgrupe de pacienți: tineri și vârstnici.

S-a constatat că polimorfismul *TLR9* (1174 C / T, rs352139) este asociat semnificativ cu TB în cazul modelelor de moștenire co-dominante, dominante și log-aditive. În special, frecvențele alelei T și genotipului TT au fost semnificativ mai înalte în grupul de persoane sănătoase decât în grupul de pacienți.

Receptorii de tip Toll - *TLR2* și *TLR9* joacă un rol important în susceptibilitatea la TB. Polimorfismul *TLR9* (1174 C / T, rs352139), situat în primul intron al *TLR9*, a arătat o asociere semnificativă cu

TB în acest studiu, cu alelă T minoră conferind protecție împotriva tuberculozei. Interesant, aceeași alelă a fost asociată semnificativ cu riscul de TB redus la femeile indoneziene, anterior [7], în timp ce o asociere în direcție opusă (efect de risc) a fost observată la un grup de femei indigene din Mexic [15]. În plus, un efect puternic de protecție a alelei T a fost observat la afro-americieni, dar nu și la americanii europeni și la pacienții africani din Guineea-Bissau [16]. Astfel de rezultate diverse ar putea fi explicate prin implicarea și interacțiunea altor factori genetici și de mediu, cum ar fi etnia, mediul genetic, istoricul vaccinării și caracteristicile bacteriene ale tulpinilor *M. tuberculosis*. Funcțional (din punct de vedere al geneticii funcționale), s-a constatat, că acest polimorfism afectează transcripția genică, astfel încât alela T a fost asociată cu expresia crescută a *TLR9* [13]. Mecanismul acestei reglări rămâne neclar și varianta intronică rs352139 poate afecta direct transcripția genei sau poate fi legată de o altă variantă funcțională încă de identificat, deoarece există un dezechilibru semnificativ de legătură cu alte SNP (cu alte polimorfisme) din această regiune.

O serie de studii genetice și epidemiologice anterioare au demonstrat asocierea polimorfismului *TLR2* (-196 până la -174 ins / del, rs111200466) cu riscul de a dezvolta tuberculoza [16], [3], [14]. Cu toate acestea, alte studii, inclusiv ale noastre, nu au dezvoltat o astfel de legătură [9], [4]. Contradicțiile observate pot fi explicate din punctul de vedere al diferențelor interpopulare dintre factorii genetici și mediu. Unul dintre motivele lipsei de asociere este probabil o dimensiune mică a eșantionului, a cărei putere nu ne-a permis să detectăm diferențe semnificative în frecvențele genotipurilor și alelelor între grupurile comparate.

Concluzii

Rezultatele studiului indică contribuția polimorfismului *TLR9* (1174 C / T, rs352139) în dezvoltarea tuberculozei pulmonare la populația Republicii Moldova. Polimorfismul *TLR2* (-196 până la -174 ins / del, rs111200466) nu este asociat cu TB pulmonară la populația Republicii Moldova. Studii suplimentare pe eșantioane independente sunt necesare pentru a confirma rezultatele obținute.

Mulțumiri

Autorii mulțumesc pacienților și persoanelor sănătoase a căror participare voluntară a făcut posibil acest studiu.

Bibliografie

1. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. *TLR9 regulates Th1 responses and cooperates*

- with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2005 Dec 19;202(12):1715-24.
2. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. *Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors*. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):732-6.
 3. Chen YC, Hsiao CC, Chen CJ, Chin CH, Liu SF, Wu CC, Eng HL, Chao TY, Tsen CC, Wang YH, Lin MC. *Toll-like receptor 2 gene polymorphisms, pulmonary tuberculosis, and natural killer cell counts*. *BMC Med Genet*. 2010 Jan 30;11:17.
 4. Devi KR, Mukherjee K, Chelleng PK, Kalita S, Das U, Narain K. *Association of VDR gene polymorphisms and 22 bp deletions in the promoter region of TLR2Δ22 (-196-174) with increased risk of pulmonary tuberculosis: A case-control study in tea garden communities of Assam*. *J Clin Lab Anal*. 2018 Sep;32(7):e22562.
 5. Guide SV, Holland SM. *Host susceptibility factors in mycobacterial infection. Genetics and body morphology*. *Infect Dis Clin North Am*. 2002 Mar;16(1):163-86.
 6. Kawai T, Akira S. *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84.
 7. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. *Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females*. *Tissue Antigens*. 2012 Mar;79(3):190-7.
 8. Lawn SD, Zumla AI. *Tuberculosis*. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):57-72.
 9. Mittal M, Biswas SK, Singh V, Arela N, Katoch VM, Das R, Yadav VS, Bajaj B, Mohanty KK. *Association of Toll like receptor 2 and 9 gene variants with pulmonary tuberculosis: exploration in a northern Indian population*. *Mol Biol Rep*. 2018 Aug;45(4):469-476.
 10. Orlova M, Schurr E. *Human Genomics of Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease*. *Curr Genet Med Rep*. 2017 Sep;5(3):125-131. doi: 10.1007/s40142-017-0124-7.
 11. Schröder NW, Schumann RR. *Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease*. *Lancet Infect Dis*. 2005 Mar;5(3):156-64.
 12. Tahara T, Arisawa T, Wang F, Shibata T, Nakamura M, Sakata M, Hirata I, Nakano H. *Toll-like receptor 2 (TLR) -196 to 174del polymorphism in gastro-duodenal diseases in Japanese population*. *Dig Dis Sci*. 2008 Apr;53(4):919-24.
 13. Tao K, Fujii M, Tsukumo S, Maekawa Y, Kishihiro K, Kimoto Y, Horiuchi T, Hisaeda H, Akira S, Kagami S, Yasutomo K. *Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population*. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jul;66(7):905-9.
 14. Thuong NT, Hawn TR, Thwaites GE, Chau TT, Lan NT, Quy HT, Hieu NT, Aderem A, Hien TT, Farrar JJ, Dunstan SJ. *A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis*. *Genes Immun*. 2007 Jul;8(5):422-8.
 15. Torres-García D, Cruz-Lagunas A, García-Sancho Figueroa MC, Fernández-Plata R, Baez-Saldaña R, Mendoza-Milla C, Barquera R, Carrera-Eusebio A, Ramírez-Bravo S, Campos L, Angeles J, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gopal R, Khader SA, Yunis EJ, Zuñiga J. *Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a Mexican population*. *J Transl Med*. 2013 Sep 21;11:220.
 16. Velez DR, Wejse C, Stryjewski ME, Abbate E, Hulme WF, Myers JL, Estevan R, Patillo SG, Olesen R, Tacconelli A, Sirugo G, Gilbert JR, Hamilton CD, Scott WK. *Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans*. *Hum Genet*. 2010 Jan;127(1):65-73.
 17. Yim JJ, Selvaraj P. *Genetic susceptibility in tuberculosis*. *Respirology*. 2010 Feb;15(2):241-56