

## ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА Arg753Gln (rs574308) ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 (TLR2) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ (НА ПРИМЕРЕ ЖИТЕЛЕЙ КАРЕЛИИ)

Мальшева И.Е.<sup>1</sup>, Топчиева Л.В.<sup>1</sup>, Тихонович Э.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Республиканская больница имени В.А. Баранова», г. Петрозаводск, Россия

**Резюме.** Генетические факторы играют важную роль в развитии и прогрессировании многих патологий, к числу которых относится саркоидоз легких. Это системное воспалительное гранулематозное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием в пораженных тканях эпителиоидноклеточных гранул. Интенсивность развития воспалительного ответа может зависеть от многих факторов, в том числе от генетического фона организма. Генетический фон может определять не только восприимчивость людей к возникновению саркоидоза легких, но также клинические характеристики протекания данного заболевания и силу развития воспалительных реакций со стороны иммунной системы. В числе генетических факторов может выступать аллельный полиморфизм генов. У носителей определенных аллельных вариаций генов можно наблюдать либо увеличение, либо уменьшение продукции провоспалительных факторов. Среди генов-кандидатов, чьи продукты могут быть вовлечены в восприимчивость людей к формированию гранулемы – гены, кодирующие Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs). Сведения о связи носительства аллельных вариаций указанных генов с восприимчивостью к саркоидозу легких, а также вклад полиморфных вариантов этих генов в развитие, прогрессирование и терапию данного заболевания еще весьма малочисленны и зачастую противоречивы.

Цель исследования заключалась в изучении связи полиморфизма Arg753Gln (rs574308) гена Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) с риском развития саркоидоза легких.

Обследовано 253 человека (122 больных русской национальности (проживающих в Республике Карелия)) с диагнозом «морфологически верифицированный саркоидоз с поражением легких» (ср. возраст – 41,00±12,56 года) и 131 здоровый донор (контрольная группа) (ср. возраст – 44,00±14,23 года). Исследовано распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру Arg753Gln (rs574308) гена TLR2 в группе больных саркоидозом легких и в группе здоровых доноров. Идентификацию аллелей данного полиморфного маркера проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ метод).

Статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфному маркеру Arg753Gln (rs574308) гена TLR2 между контрольной группой и группой больных саркоидозом легких не выявлено:  $\chi^2 = 2,0$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,158$  и  $\chi^2 = 2,19$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,140$  соответственно.

Полиморфный маркер Arg753Gln (rs574308) гена Toll-подобного рецептора 2 не связан с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

*Ключевые слова:* саркоидоз легких, Toll-подобные рецепторы, ген TLR2, генетический полиморфизм, rs574308, ассоциация

### Адрес для переписки:

Мальшева Ирина Евгеньевна  
Институт биологии  
185910, Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11.  
Тел.: 8 (8142) 57-31-07.  
Факс: 8 (8142) 76-98-10.  
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

### Address for correspondence:

Malysheva Irina E.  
Institute of Biology  
185910, Russian Federation, Petrozavodsk, Pushkinskaya str., 11.  
Phone: 7 (8142) 57-31-07.  
Fax: 7 (8142) 76-98-10.  
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

### Образец цитирования:

И.Е. Мальшева, Л.В. Топчиева, Э.Л. Тихонович  
«Исследование ассоциации полиморфизма Arg753Gln (rs574308) гена Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) с риском развития саркоидоза легких (на примере жителей Карелии)» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 849-852.

doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2496

© Мальшева И.Е. и соавт., 2022

### For citation:

I.E. Malysheva, L.V. Topchieva, E.L. Tikhonovich  
“Association between Arg753Gln (rs574308) polymorphism of the Toll-like receptor 2 (TLR2) gene and the risk of pulmonary sarcoidosis among the residents of Karelia”,  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 849-852.

doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2496

DOI: 10.15789/1563-0625-ABA-2496

# ASSOCIATION BETWEEN Arg753Gln (rs574308) POLYMORPHISM OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 (TLR2) GENE AND THE RISK OF PULMONARY SARCOIDOSIS AMONG THE RESIDENTS OF KARELIA

Malysheva I.E.<sup>a</sup>, Topchieva L.V.<sup>a</sup>, Tikhonovich E.L.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

<sup>b</sup> V. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

**Abstract.** Genetic factors play an important role in the development and progression of many disorders including lung sarcoidosis which is a systemic inflammatory granulomatous disease of unknown etiology, characterized by the formation of epithelioid cell granules in affected tissues. Intensity of the developing inflammation may partially depend on genetic factors which may influence both susceptibility to lung sarcoidosis, and also clinical course of the disease and the degree of inflammatory response from the immune system. Allelic polymorphism of distinct genes is therefore worth of study. In the carriers of certain allele variants, one may observe either increase, or a decreased production of pro-inflammatory factors. Among the candidate factors involved in higher susceptibility of humans, one may consider Toll-like receptors (TLRS) which may contribute to formation of granulomas. Relevant data concerning association between the allele variants of these genes and susceptibility to lung sarcoidosis, and its clinical course are still quite limited and contradictory. The aim of the present study was to analyze the association between the Arg753Gln (rs574308) polymorphism of the Toll-like receptor 2 (TLR2) gene and the risk of developing pulmonary sarcoidosis.

A total of 253 persons were under study including 122 patients diagnosed with morphologically verified sarcoidosis with lung involvement (average age, 41.00±12.56 years), and 131 healthy donors comprising a control group (average age, 44.00±14.23 years). The distribution of alleles and genotypes for the Arg753Gln (rs574308) polymorphic TLR2 gene marker was studied in the groups of patients with pulmonary sarcoidosis and healthy donors. The test alleles of this polymorphic marker were typed by means of PCR technique followed by length analysis restriction fragments (PCR-RFLP method).

There were no statistically significant differences in the distribution of allele and genotype frequencies for the polymorphic marker Arg753Gln (rs574308) of the TLR2 gene between the control group and the group of patients with pulmonary sarcoidosis:  $\chi^2 = 2.0$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.158$  and  $\chi^2 = 2.19$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.140$ , respectively.

The polymorphic marker Arg753Gln (rs574308) of Toll-like receptor 2 gene is not associated with the risk of developing pulmonary sarcoidosis among ethnic Russians of the Republic of Karelia.

*Keywords:* pulmonary sarcoidosis, Toll-like receptors, TLR2 gene, genetic polymorphism, rs574308, association

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра Российской академии наук (тема: FMEN-2022-0009; № г. р. 122031100064-4).

## Введение

Саркоидоз легких (болезнь Бенье–Бека–Шаумана) относится к системным воспалительным заболеваниям, характеризующимся образованием эпителиоидно-клеточных гранул с преимущественным поражением легких и внутригрудных лимфатических узлов [1]. Принято считать, что развитие воспаления и образование гранул при саркоидозе возникает в ответ на воздействие неустановленного этиологического фактора у генетически восприимчивых людей [4]. В качестве причин развития саркоидоза легких могут выступать бактериальные антигены (например присутствие микобактерий, пропионобактерии и др.). В исследовании некоторых авторов показано, что в крови некоторых больных с саркоидозом выявлены антитела к микобактериальным антигенам [5].

Среди генов-кандидатов, чьи продукты могут быть вовлечены в генетическую предрасположенность к саркоидозу легких, — гены, кодирующие Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs). Указанные рецепторы играют важную роль в распознавании лигандов молекул микроорганизмов, а также эндогенных молекул, которые образуются при патологических процессах в различных тканях [8]. Имеющиеся в литературе данные о роли аллельного полиморфизма генов Toll-подобных рецепторов, в частности *TLR2*, в патогенезе саркоидоза противоречивы и мало изучены. Так, в исследовании Veltkamp и соавт. показано, что полиморфный маркер -16934 А/Т в промоторной области гена *TLR2* ассоциирован с саркоидозом. Носительство аллельных вариантов по указанному полиморфному маркеру связано с клиническими особенностями течения данного заболевания [11]. Эффективность распознавания патоген-ассоциированных и молекулярных паттернов клеточного повреждения и проведения сигнала на эффекторные системы иммунных клеток во многом зависит от функциональных особенностей рецепторов, которые, в свою очередь, могут определяться наличием мутаций в

разных областях кодирующих их генов. Так, замена аргинина на глицин в позиции 753 аминокислотной последовательности белка Toll-подобного рецептора 2 Arg753Gln (rs5743708) приводит к изменению его электростатического потенциала и конформационным изменениям и, в конечном итоге, к изменению силы проведения сигнала от рецептора [13]. Эта мутация ассоциирована с повышенным риском развития ряда заболеваний, например таких как инфекционный эндокардит, туберкулез, астма, atopический дерматит и др. [3, 6, 7, 12, 14]. Сведения о влиянии полиморфного маркера Arg753Gln (rs5743708) гена *TLR2* на риск развития саркоидоза легких отсутствуют. В настоящей работе мы провели исследование по изучению связи полиморфного маркера Arg753Gln (rs5743708) гена Toll-подобного рецептора 2 с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

## Материалы и методы

Обследовано 253 человека (122 пациента русской национальности (проживающих в Республике Карелия)) с диагнозом «морфологически верифицированный саркоидоз с поражением легких» (ср. возраст – 41,00±12,56 года) и 131 здоровый донор (контроль) (ср. возраст – 44,00±14,23 года). Саркоидоз диагностировался в соответствии с критериями на основе клинико-рентгенологических и лабораторных изменений, соответствовал консенсусу Всемирной ассоциации саркоидоза и других гранулематозных заболеваний 1999 г. и национальным клиническим рекомендациям [2]. Образцы венозной крови использовали в качестве материала для исследования. До проведения исследования информированное добровольное согласие было получено от всех пациентов. Работа одобрена комитетом по медицинской этике ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» протокол № 96 от 11.07.2017.

Для выделения геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) использовали наборы Analytikjena (Германия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на приборе

иCycler iQ5 («Био-Рад», США). ПЦР-ПДФ-анализ применяли для генотипирования по полиморфному локусу rs574308 гена *TLR2*. Сиквенс праймеров указан в работе [10]. ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции MspI (1 ед.а.) («Сибэнзим», Россия) в течение 3 часов при 37 °С. Фрагменты рестрикции разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле, окрашивали 1%-ным раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет программ StatGraphics Centurion XVI. Для определения достоверности различий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах применяли критерий  $\chi^2$ . Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Данные по возрасту представлены как: медиана (Me) и межквартильный интервал (interquartile range – IQR).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

## Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов по полиморфному маркеру rs574308 гена *TLR2* в группе больных саркоидозом и в контрольной группе соответствовало ожидаемому, согласно закону Харди–Вайнберга ( $\chi^2 = 0,50$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,780$  и  $\chi^2 = 1,44$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,486$  соответственно). Частота встречаемости аллелей и генотипов исследуемого полиморфного маркера гена *TLR2* была аналогичной популяциям европейских стран [9]. Между контрольной группой и исследуемой группой больных не установлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфному маркеру rs574308 гена *TLR2* (табл. 1).

Как было отмечено ранее, полиморфный маркер Arg753Gln (rs5743708) гена Toll-подобного рецептора 2 ассоциирован с риском развития

**ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА Arg753Gln (rs5743708) ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ И В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ**

**TABLE 1. DISTRIBUTION OF ALLELE AND GENOTYPE FREQUENCIES OF THE Arg753Gln (rs5743708) POLYMORPHIC MARKER OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 GENE IN THE CONTROL GROUP AND IN THE GROUP OF PATIENTS WITH PULMONARY SARCOIDOSIS**

Показатель Indicator		Контрольная группа Control group (n = 131)	Больные саркоидозом легких Patients with pulmonary sarcoidosis (n = 122)	Критерий $\chi^2$ Criterion $\chi^2$
Аллели Alleles	G	237 (0,905)	229 (0,939)	2,0 (df = 1, p = 0,158)
	A	25 (0,095)	15 (0,061)	
Генотипы Genotypes	GG	106 (0,809)	107 (0,877)	2,19 (df = 2, p = 0,140)
	GA	25 (0,190)	15 (0,123)	
	AA	0	0	

**Примечание.** n – число обследованных лиц. Данные представлены в виде абсолютных значений (относительная частота).  
Note. n is the number of examined persons. Data are presented as absolute values (relative frequency).

ряда патологий. Указанная мутация в гене *TLR2*, в позиции 2258 G/A, приводит к изменению аминокислотной последовательности белка *TLR2*. В позиции 753 происходит замена аргинина (Arg) на глутамин (Gln) в TIR-домене (внутриклеточная часть молекулы белка). Это может привести к изменению электростатического потенциала белковой молекулы и/или конформационным изменениям. В результате чего наблюдается нарушение процесса гетеродимеризации *TLR2* с *TLR6*, фосфорилирование тирозина, и рекрутирование адаптерных белков MyD88 и Mal, что влияет на передачу сигнала от Toll-подобного

рецептора 2 на NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) [13, 15].

Таким образом, полиморфный маркер Arg753Gln (rs5743708) гена Toll-подобного рецептора 2 не связан с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

## Заключение

В настоящем исследовании не установлена ассоциация полиморфизма гена Toll-подобного рецептора 2 (rs574308) с риском развития саркоидоза лёгких у русского населения Республики Карелия.

## Список литературы / References

1. Baughman R.P., Culver D.A., Judson M.A. A concise review of pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, Vol. 183, no. 5, pp. 573-581.
2. Bickett A.N., Lower E.E., Baughman R.P. Sarcoidosis diagnostic score: a systematic evaluation to enhance the diagnosis of sarcoidosis. *Chest*, 2018., Vol. 154, no. 5, pp. 1052-1060.
3. Bustamante J., Tamayo E., Flórez S., Telleria J., Bustamante E., López J., San Román J.A., Alvarez F.J. Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2011, Vol. 64, no. 11, pp. 1056-1059.
4. Chen E., Moller D. Etiologies of sarcoidosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 49, no. 1, pp. 6-18.
5. Dubaniewicz A., Kampf S., Singh M. Serum antimycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, Vol. 86, no. 1, pp. 60-70.
6. Gao Y., Xiao H., Wang Y., Xu F. Association of single-nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 2 gene with asthma susceptibility: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2017, Vol. 96, no. 20, e6822. doi: 10.1097/MD.0000000000006822.
7. Guo X., Xia Y. The rs5743708 gene polymorphism in the *TLR2* gene contributes to the risk of tuberculosis disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 9, pp. 11921-11928.
8. Nie L., Cai S., Shao J., Chen J. Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1523. doi: 10.3389/fimmu.2018.01523.
9. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs5743708 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs5743708>.
10. Selvaraj P., Harishankar M., Singh B., Jawahar M., Banurekha V. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010, Vol. 90, no. 5, pp. 306-310.
11. Veltkamp M., Wijnen P., van Moorsel C., Rijkers G., Ruven H., Heron M., Bekers O., Claessen A., Drent M., van den Bosch J., Grutters J. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 149, no. 3, pp. 453-462.
12. Wang X., Zhang L., Li Y., Hou H., Sun H. [Association between toll-like receptors 2 and 5 polymorphisms and neonatal sepsis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.*, 2015, Vol. 17, no. 12, pp. 1316-1321.
13. Xiong Y., Song C., Snyder G., Sundberg E., Medvedev A. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 45, pp. 38327-38337.
14. Zhang Y., Wang H.C., Feng C., Yan M. Analysis of the association of polymorphisms rs5743708 in *TLR2* and rs4986790 in *TLR4* with Atopic Dermatitis Risk. *Immunol. Invest.*, 2019, Vol. 48, no. 2, pp. 169-180.
15. Żukowski M., Taryma-Leśniak O., Kaczmarczyk M., Kotfis K., Szydłowski Ł., Ciechanowicz A., Brykczynski M., Żukowska A. Relationship between toll-like receptor 2 R753Q and T16934A polymorphisms and *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Anaesthesiol. Intensive Ther.*, 2017, Vol. 49, no. 2, pp. 110-115.

### Авторы:

**Мальшева И.Е.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

**Топчиева Л.В.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

**Тихонович Э.Л.** — к.м.н., заведующая отделением респираторной терапии ГБУЗ «Республиканская больница имени В.А. Баранова», г. Петрозаводск, Россия

### Authors:

**Malysheva I.E.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

**Topchieva L.V.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

**Tikhonovich E.L.**, PhD (Medicine), Head, Department of Respiratory Therapy, V. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

Поступила 07.04.2022  
Принята к печати 22.05.2022

Received 07.04.2022  
Accepted 22.05.2022