

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *TLR2* ARG753GLN С
УРОВНЕМ ЕГО ЭКСПРЕССИИ У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ С СИНДРОМОМ
СТАРЧЕСКОЙ АСТЕНИИ**

Лукьянова С. О. ¹,
Артемьева О. В. ¹,
Насаева Е. Д. ¹,
Ганковская Л. В. ¹

¹ ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва,
Российская Федерация.

**ASSOCIATION OF *TLR2* ARG753GLN GENE POLYMORPHISM WITH
ITS EXPRESSION LEVEL IN NONAGENARIANS WITH FRAILTY**

Lukyanova S. O. ^a,
Artemieva O. V. ^a,
Nasaeva E. D. ^a,
Gankovskaya L. V. ^a

^a Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Резюме

Среди паттернраспознающих рецепторов TLR2 является исключительным из-за возможности гетеродимеризации с различными типами TLR, что позволяет ему распознавать широкий спектр молекулярных структур на поверхности патогенов. Полиморфизмы в генах, участвующих в сигнальном каскаде TLRs, могут быть фактором восприимчивости хозяина к развитию воспаления, влиять на исход ряда инфекционных заболеваний и иммунных повреждений. Вариант Arg753Gln (rs574308) в гене TLR2 — это наиболее охарактеризованная миссенс-мутация кодирующей области в домене TIR, которая включает замену аргинина на глутамин в позиции 753 аминокислотной последовательности белка. Эта функционально значимая замена ведет к измененной передаче сигналов и взаимосвязана с воспалительными реакциями. В работе проведено исследование ассоциации полиморфизма Arg753Gln (rs574308) гена TLR2 с уровнем его экспрессии у долгожителей. В исследование включено 82 долгожителя, среди которых синдром старческой астении выявлен у 41 обследуемого на основании краткой батареи тестов физического функционирования, при регистрации ≤ 7 баллов. Было показано, что носительство аллеля Gln статистически значимо ассоциировано с повышенным риском развития синдрома старческой астении, у пациентов с генотипом Arg/Gln в 12,8 раз выше шанс развития этого гериатрического синдрома. Установлено, что аллель Arg и генотип Arg/Arg являются протективными факторами развития синдрома старческой астении у долгожителей. При проведении анализа экспрессии гена TLR2 у долгожителей было выявлено повышение его экспрессии в 2,79 раз относительно доноров. Оценка уровня экспрессии гена TLR2 в группах долгожителей с наличием и отсутствием синдрома старческой астении показала повышение экспрессии гена TLR2 в 1,4 раза у долгожителей с этим гериатрическим синдромом. У пациентов с генотипом Arg/Gln экспрессия гена TLR2 была в 1,3 раз выше, чем в группе с генотипом Arg/Arg и в 1,6 раз выше, чем в группе с генотипом Gln/Gln. Повышение частоты встречаемости генотипа Arg/Gln полиморфизма Arg753Gln гена TLR2 у долгожителей с синдромом старческой астении может быть обусловлено повышением экспрессии гена этого рецептора. Необходимы дальнейшие функциональные и молекулярно-генетические исследования, которые дополнят наше понимание механизмов регуляции и активации TLR2 и его роли в развитии синдрома старческой астении.

Ключевые слова: воспалительное старение; долголетие; экспрессия генов; TLR2; полиморфизм; синдром старческой астении.

Abstract

TLR2 is an exceptional pattern-recognising receptor because of its ability to heterodimerise with different types of TLRs, which allows it to recognise a wide range of molecular structures on the surface of pathogens. Polymorphisms in genes involved in the TLRs signalling cascade may be a factor in host susceptibility to the development of inflammation, affecting the outcome of a number of infectious diseases and immune diseases. The variant Arg753Gln (rs574308) in the TLR2 gene is the most characterised missense mutation of the coding region in the TIR domain, which involves the substitution of arginine for glutamine at position 753 of the protein sequence. This functionally significant substitution leads to altered signalling and is associated with inflammatory responses. In this study, we investigated the association of the Arg753Gln (rs574308) polymorphism of the TLR2 gene with the level of its expression in nonagenarians. The study included 82 nonagenarians. Frailty was detected in 41 subjects using a short physical performance battery, with registration in the test ≤ 7 points. It was shown that carriage of the Gln allele is statistically significantly associated with an increased risk of developing frailty; patients with the Arg/Gln genotype have a 12.8-fold higher chance of developing this geriatric syndrome. The Arg allele and the Arg/Arg genotype were found to be protective factors in the development of frailty in nonagenarians. Analysis of TLR2 gene expression in nonagenarians revealed a 2.79-fold increase in TLR2 expression relative to donors. Evaluation of TLR2 gene expression level in groups of nonagenarians with the presence and absence of frailty showed a 1.4-fold increase in TLR2 gene expression in nonagenarians with this geriatric syndrome. In patients with the Arg/Gln genotype, TLR2 gene expression was 1.3 times higher than in the group with the Arg/Arg genotype and 1.6 times higher than in the group with the Gln/Gln genotype. The increased frequency of occurrence of the Arg/Gln genotype of the Arg753Gln polymorphism of the TLR2 gene in nonagenarians with frailty may be due to increased gene expression of this receptor. It is necessary to conduct further functional and molecular genetic studies.

Keywords: inflammaging; longevity; gene expression; TLR2; polymorphism; frailty.

1 Введение

Известно, что дисрегуляция системы врожденного иммунитета при старении приводит к активации воспалительного ответа и развитию воспалительного старения (inflammaging) [5].

Toll-подобные рецепторы (TLR) являются одними из наиболее изученных рецепторов распознавания образов (PRR) врожденного иммунитета. TLR2 образует гетеродимеры с TLR1, TLR4, TLR6 и TLR10, что позволяет ему распознавать широкий спектр патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP), и эндогенных молекулярных паттернов, связанных с повреждением (DAMP) [4].

В гене *TLR2* идентифицировано 16 полиморфизмов. Вариант Arg753Gln (rs574308) в гене *TLR2* — это наиболее охарактеризованная миссенс-мутация кодирующей области в домене TIR, которая включает замену аргинина на глутамин в позиции 753 аминокислотной последовательности белка. В ряде работ было показано, что полиморфизм Arg753Gln функционально значим и связан с измененной передачей сигналов, ухудшением активации NF-κB [8,9,11]. Для однонуклеотидного полиморфизма (SNP) Arg753Gln в гене *TLR2* человека были показаны ассоциации с повышенным риском развития туберкулеза, септического шока в ходе грамположительной бактериальной инфекции, возрастной макулярной дистрофии, тяжелого течения COVID-19 с развитием пневмонии [3,6,7,9,10].

Воспалительное старение ассоциировано с развитием возраст-ассоциированных заболеваний и гериатрических синдромов. Ключевым гериатрическим синдромом с высоким риском развития неблагоприятных исходов для здоровья является синдром старческой астении (ССА) [1]. Ранее нами было показано, что повышение экспрессии гена *TLR2* ассоциировано с развитием ССА у долгожителей и может являться одним из факторов патологического старения [2].

Целью настоящего исследования явилась оценка ассоциации полиморфизма Arg753Gln (rs574308) гена *TLR2* с уровнем его экспрессии у долгожителей с ССА.

2 Материалы и методы

В исследование было включено 82 долгожителя (22 мужчин, 60 женщин, средний возраст $91,4 \pm 2,18$), находившихся на обследовании в Российском геронтологическом научно-клиническом центре РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (директор – член-корреспондент РАН, д.м.н. Ткачева О.Н.). Оценка ССА была проведена на основании краткой батареи тестов физического функционирования (Short Physical Performance Battery, SPPB), критерием наличия ССА являлась регистрация ≤ 7 баллов. ССА был выявлен у 41 исследуемого долгожителя. Группу сравнения для оценки экспрессии гена *TLR2* составили здоровые доноры ($n=24$; средний возраст $22,5$; 16 женщин; 8 мужчин).

Биологическим материалом для исследования служила периферическая кровь (ПК). В ходе работы определяли уровень экспрессии гена *TLR2* в

лейкоцитах ПК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) согласно отработанному нами ранее протоколу [2], анализ однонуклеотидного полиморфизма гена *TLR2* Arg753Gln методом ПЦР проводился стандартным набором «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», Россия).

Статистическая обработка результатов выполнялась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 8 и IBM SPSS Statistics 26. Для оценки различий между исследуемыми группами использовался критерий Манна-Уитни, различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. При сравнении частот аллелей и генотипов по качественному бинарному признаку пользовались критерием χ^2 . Степень риска развития событий оценивали по величине отношения шансов (odd ratio (OR)) с расчетом для него 95% доверительного интервала (CI).

Работа была одобрена локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол заседания №213 от 13.12.2021) и проводилась в соответствии с правилами надлежащей клинической практики. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда №23-15-00137, <http://rscf.ru/project/23-15-00137/>

3 Результаты и обсуждение

Среди всех известных паттернраспознающих рецепторов *TLR2* является исключительным из-за возможности гетеродимеризации с различными типами *TLR*, что расширяет спектр лигандов, а также возможности для про- и противовоспалительного действия. [4] В исследовании на трансфектных 293Т-клетках было показано, что полиморфизм Arg753Gln снижает способность *TLR2* реагировать на бактериальные пептиды *in vitro* [8].

В настоящем исследовании впервые был проведен анализ распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln у долгожителей. Было показано, что среди 82 долгожителей генотип Arg/Gln имеют 52,44% (n=43), Arg/Arg 39,02 % (n=32), Gln/Gln 8,54 % (n=7) ($\chi^2 = 2.0021$, $p = 0.1571$). Наблюдаемое распределение частот аллелей и генотипов гена *TLR2* среди обследованных соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 2,00$, $p = 0,157$).

Затем была проведена оценка распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln у долгожителей в зависимости от наличия ССА. У долгожителей с наличием ССА частота встречаемости аллеля Gln составила 42,68%, в группе с отсутствием этого гериатрического синдрома – 26,83%. Частота генотипа Arg/Gln в группе с ССА составила 80,49%, в группе долгожителей с отсутствием ССА – 24,39% (табл.1).

Носительство аллеля Gln статистически значимо ассоциировано с повышенным риском развития ССА (OR = 2,031, 95 % CI 1,054-3,913, $\chi^2 = 4,544$, $p=0,033$). Показано, что у пациентов с генотипом Arg/Gln в 12,8 раз выше шанс развития ССА. (OR = 12,78, 95 % CI 4,470-36,580, $\chi^2 = 25,866$,

p=0,000). Аллель Arg и генотип Arg/Arg являются протективными факторами развития ССА (табл.1).

При проведении анализа экспрессии гена *TLR2* у долгожителей было выявлено повышение его экспрессии в 2,79 раз относительно доноров (p<0,0001) (рис. 1а). Оценка уровня экспрессии гена *TLR2* в группах долгожителей с наличием и отсутствием ССА показала повышение экспрессии гена *TLR2* в 1,4 раза у долгожителей с этим гериатрическим синдромом (p<0,005). (рис. 1б)

На рис.1в представлен уровень экспрессии гена *TLR2* в зависимости от генотипа полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln. У пациентов с генотипом Arg/Gln экспрессия гена *TLR2* в 1,3 раз выше чем в группе с генотипом Arg/Arg (p<0,005) и в 1,6 раз выше чем в группе с генотипом Gln/Gln (p<0,005). (рис.1в).

Полиморфизмы в генах, участвующих в сигнальном каскаде TLRs, могут быть фактором восприимчивости хозяина к развитию воспаления, влиять на исход ряда инфекционных заболеваний и иммунных повреждений. Эта регуляция может включать клеточные сигнальные события, ответственные за выработку цитокинов и хемокинов и их взаимодействие с адаптивным иммунным ответом, обеспечивая тесную связь между иммуностарением и воспалением, продолжительностью жизни и успешностью старения.

Исследования по молекулярному моделированию показали, что наличие замены в полиморфизме Arg753Gln приводит к изменениям во внутриклеточном домене TIR. Это нарушает гетеродимеризацию с TLR6, рекрутирование адаптерных белков Mal и MyD88, фосфорилирование p38, активацию NF-κB, что коррелирует со снижением воспалительной реакции [11]. Вероятно, этот механизм косвенно может быть связан с изменением экспрессии гена *TLR2*. У долгожителей с генотипом Arg/Arg, который по результатам нашего исследования является протективным в отношении риска развития ССА, был выявлен средний уровень экспрессии *TLR2*, который, вероятно, является наиболее благоприятным.

В группе долгожителей была выявлена ассоциация гетерозиготного генотипа Arg/Gln полиморфного варианта Arg753Gln гена *TLR2* с развитием ССА. Носительство данного генотипа увеличивает шанс развития ССА в 12,8 раз (табл.1), что позволяет рассматривать его в качестве неблагоприятного маркера данного гериатрического синдрома. Повышение частоты встречаемости генотипа Arg/Gln полиморфизма Arg753Gln гена *TLR2* у долгожителей с ССА может быть обусловлено повышением экспрессии гена этого рецептора.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg753Gln в гене *TLR2* в исследуемых клинических группах.

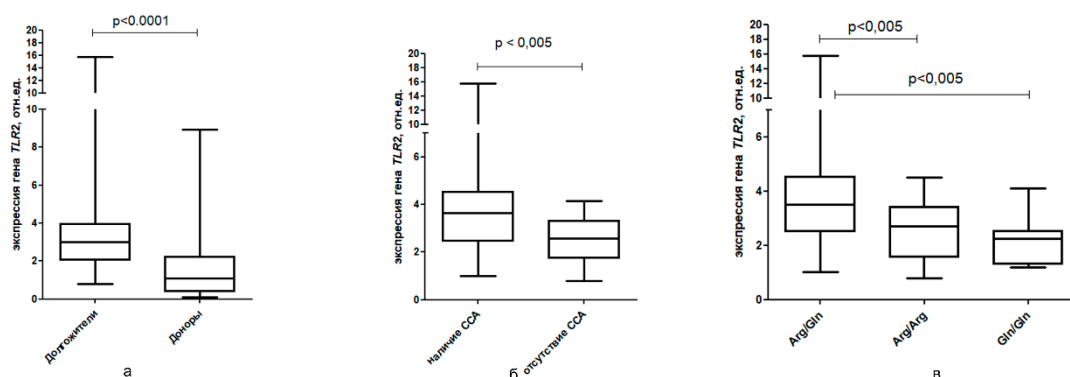
Table 1. Frequency of alleles and genotypes of polymorphic marker Arg753Gln in *TLR2* gene in the studied clinical groups.

	Отсутствие ССА (n=41) No frailty (n=41)		Наличие ССА (n=41) With frailty (n=41)		OR	95% CI	χ^2	p
	n	%	n	%				
Аллель Arg		73,17						
Allele Arg	60		47	57,32	0,49	0,256 - 0,949	4,544	0,033
Аллель Gln		26,83						
Allele Gln	22		35	42,68	2,031	1,054-3,913	4,544	0,033
Arg/Arg	25	60,98	7	17,07	0,132	0,047 - 0,368	16,605	<0,001
Arg/Gln	10	24,39	33	80,49	12,788	4,470-36,580	25,866	<0,001
Gln/Gln	6	14,63	1	2,44	0,1446	0,017 - 1,271	3,905	0,048

РИСУНКИ

Рисунок 1. Экспрессия гена *TLR2* в лейкоцитах периферической крови долгожителей и здоровых доноров (а), долгожителей с наличием и отсутствием ССА (б), долгожителей с различными генотипами полиморфного маркера гена *TLR2* Arg753Gln (в).

Figure 1. TLR2 gene expression in peripheral blood leukocytes of nonagenarians and healthy donors (a), nonagenarians with frailty and absence of frailty (b), nonagenarians with different genotypes of polymorphic marker of TLR2 gene Arg753Gln (c).



1а Экспрессия гена *TLR2*, отн.ед

TLR2 gene expression, relative units

Долгожители

Nonagenarians

Доноры

Donors

$p < 0,0001$

1б Экспрессия гена *TLR2*, отн.ед

TLR2 gene expression, relative units

Наличие ССА

With frailty

Отсутствие ССА

No frailty

$p < 0,005$

Russian Journal of Immunology (Russia)

ISSN 1028-7221 (Print)

ISSN 2782-7291 (Online)

1в Экспрессия гена *TLR2*, отн.ед

TLR2 gene expression, relative units

Arg/Gln

Arg/Arg

Gln/Gln

$p < 0,005$

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Лукиянова Светлана Олеговна – ассистент кафедры иммунологии;

адрес: г. Москва 117513, ул. Островитянова д. 1;

телефон: 8(915)182-37-62;

e-mail: lukyanovasv@mail.ru

Lukyanova Svetlana Olegovna – Assistant of the Department of Immunology;

telephone: 8(915)182-37-62;

e-mail: lukyanovasv@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Артемьева Ольга Владимировна – канд. мед. наук, доцент кафедры иммунологии;

Artemieva Olga Vladimirovna – PhD, Associate Professor of the Department of Immunology;

Насаева Екатерина Дмитриевна – канд. мед. наук, доцент кафедры иммунологии;

Nasaeva Ekaterina Dmitrievna – PhD, Associate Professor of the Department of Immunology;

Ганковская Людмила Викторовна – д-р мед. наук, проф., профессор кафедры иммунологии;

Gankovskaya Ludmila Viktorovna – PhD, Professor of the Department of Immunology.

Блок 3. Метаданные статьи

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *TLR2* ARG753GLN С УРОВНЕМ ЕГО ЭКСПРЕССИИ У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ С СИНДРОМОМ СТАРЧЕСКОЙ АСТЕНИИ

ASSOCIATION OF *TLR2* ARG753GLN GENE POLYMORPHISM WITH ITS EXPRESSION LEVEL IN NONAGENARIANS WITH FRAILTY

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ПОЛИМОРФИЗМ ARG753GLN ГЕНА TLR2

POLYMORPHISM ARG753GLN TLR2 GENE

Ключевые слова: воспалительное старение; долголетие; экспрессия генов; TLR2; полиморфизм; синдром старческой астении.

Keywords: inflammaging; longevity; gene expression; TLR2; polymorphism; frailty.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 3,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 1.

28.02.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Артестьева О.В., Греченко В.В., Громова Т.В., Ганковская Л.В. Синдром старческой астении: неоднозначная роль воспалительного старения // Иммунология. 2022. Т. 43, № 6. С. 746-756.	Artemyeva O.V., Grechenko V.V., Gromova T.V., Gankovskaya L.V. Frailty: a controversial role of inflammation. Immunologiya. 2022; 43 (6): 746–56.	10.33029/0206-4952-2022-43-6-746-756
2	Лукьянова С.О., Артестьева О.В., Стражеско И.Д., Ганковская Л.В. Экспрессия генов TLR2, IL-1 β , IL-10 как возможный фактор успешного или патологического старения у долгожителей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176, № 10. – С. 510-513.	Lukyanova S.O., Artemyeva O.V., Strazhesko I.D., Nasaeva E.D., Grechenko V.V., Gankovskaya L.V. Expression of TLR2, IL-1 β , IL-10 genes as a possible factor of successful or pathological aging in nonagenarians. Bulletin of	10.47056/0365-9615-2023-176-10-510-513

		Experimental Biology and Medicine – 2023. – T. 176, № 10. – C. 510-513.	
3	Bakaros E, Voulgaridi I, Paliatsa V, Gatselis N, Germanidis G, Asvestopoulou E, Alexiou S, Botsfari E, Lygoura V, Tsachouridou O, Mimitsoudis I, Tseroni M, Sarrou S, Mouchtouri VA, Dadouli K, Kalala F, Metallidis S, Dalekos G, Hadjichristodoulou C, Speletas M. Innate Immune Gene Polymorphisms and COVID-19 Prognosis. Viruses. 2023 Aug 22;15(9):1784.		doi: 10.3390/v15091784
4	Colleselli K, Stierschneider A, Wiesner C. An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Pro- and Anti-		10.3390/ijms241512464

	Inflammatory Processes. Int J Mol Sci. 2023 Aug 5;24(15):12464.		
5	Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;908:244-54.		10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651
6	Gao JW, Zhang AQ, Wang X, Li ZY, Yang JH, Zeng L, Gu W, Jiang JX. Association between the TLR2 Arg753Gln polymorphism and the risk of sepsis: a meta-analysis. Crit Care. 2015 Nov 30;19:416.		10.1186/s13054-015-1130-3. PMID: 26616674
7	Güven M, Batar B, Mutlu T, Bostancı M, Mete M, Aras C, Ünal M. Toll-Like Receptors 2 and 4 Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. Curr Eye Res. 2016 Jun;41(6):856-61.		10.3109/02713683.2015.1067326

8	Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun. 2000 Nov;68(11):6398-401.		10.1128/IAI.68.11.6398-6401.2000
9	Merx S, Neumaier M, Wagner H, Kirschning CJ, Ahmad-Nejad P. Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. Hum Mol Genet. 2007 May 15;16(10):1225-32.		10.1093/hmg/ddm070
10	Ogus AC, Yoldas B, Ozdemir T, Uguz A, Olcen S, Keser I, Coskun M, Cilli A, Yegin O. The Arg753GLn polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. Eur Respir J. 2004 Feb;23(2):219-23.		10.1183/09031936.03.00061703

11	Xiong Y, Song C, Snyder GA, Sundberg EJ, Medvedev AE. 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 Nov 2;287(45):38327-37.		10.1074/jbc.M112.375493.
----	--	--	--------------------------