بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه دامغان

دانشکده زیست شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

زیست شناسی (گرایش سلولی- تکوینی)

اثر DNA باکتری بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز دردودمان سلولی N1۱۳۲۱

توسط:

رادا اصل دهقان

استاد راهنما:

دکتر تقی لشکر بلوکی

اساتید مشاور:

دکتر محمود اله دادی سلمانی

دکتر محمد تقی قربانیان

شهریور ۱۳۹۰

سپاسگزاری

شکر وسپاس خدا را که بی لطف وعنایت او پایان این راه میسر نبود.

تشکروسپاس ویژه از **استاد راهنمای محترم و بزرگوار آقای دکتر تقی لشکر بلوکی** به پاس رهنمودهای صادقانه وز حمات فراوان

وآموزه هایی که از ایشان آموختم . صداقت، دقت ، داشتن اخلاق علمی وتفکر صحیح

از اساتید محترم مشاورآقای دکتر محمد تقی قربانیان وآقای دکتر محمود اله دادی سلمانی به پاس همراهی ایشان تشکر وسپاسگزاری می کنم .

قدر دانی می کنم

از رئیس محترم دانشکده زیست شناسی،جناب **آقای دکتر خورشیدی وهمچنین ازاساتید محترم دانشکده زیست شناسی خانم دکترکاشانی ،خانم دکتر گودرزی ، خانم دکتر ابراری ، خانم دکتر رضایی ،آقای دکتر پای لاخی وآقای دکتر زواره** به پاس آنچه از ایشان آموختم .

تشکر فراوان از کارشناس محترم ، سرکار**خانم حسین پور** که همچون خواهری مهربان به ویژه در روزهای پایانی همرا ه خوبی برای من بودند.

تقدیر ازسرکار خانم **عالمی** که با تلاشهای بی وقفه مارا یاری نمودند.

از آقای **نوشیری** کارشناس دانشگاه آزاد دامغان به پاس همکاری ایشان تشکر می کنم.

از دوستان عزیزم که با حضورشان مایه دلگرمی من بودند تشکر وبرای همه آنها آرزوی موفقیت می کنم.

چکیده

اثر DNA باکتری بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز دردودمان سلولی ۱۳۲۱N۱

به وسیله ی:
رادا اصل دهقان

مقدمه: Toll-like receptor ها نقش مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی و متعاقب آن ایمنی اکتسابی بر علیه عفونت و آسیب بافتی دارند. TLR9, DNA باکتری دارای موتیف های CpG را تشخیص می دهد. علاوه بر سلولهای ایمنی ، سلولهای سرطانی متنوع نیز TLR9را بیان می کنند. اتصال DNA با TLR9، تهاجم سلولها را از طریق افزایش فعالیت ماتریکس متالو پروتئیناز، تقویت می کند.

هدف از این مطالعه این است که آیا DNA باکتری می تواند ، فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز را در U87 (گلیوبلاستوما) و۱۳۲۱N۱ افزایش دهد.

روش کار: RT-PCR برای بررسی بیان TLR9 در این سلولها، استفاده شد. سلولها در محیط DMEM در حضور 100µg/ml DNA باکتری برای ۷۲ ساعت کشت داده شدند . سپس فعالیت ماتریکس متالو پروتئیناز از طریق ژلاتین زایموگرافی SDS-PAGE تعیین شد.

یافته ها: RT-PCR بیان TLR9 را در سلولهای U87 و۱۳۲۱N۱ نشان داد. DNA باکتری فعالیت فرم پرو و فعال ماتریکس متالو پروتئیناز۲را در U87 به طور معنی داری افزایش داد. بیان وفعالیت ماتریکس متالو پروتئیناز۲ در سلولهای ۱۳۲۱N۱ تغییر معنی داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: این یافته ها نشان می دهد که DNA باکتری بیان و فعالیت ماتریکس متالو پروتئیناز۲ را در گلیوبلاستوما انسانی ،U87 افزایش می دهد ولی این آنزیم در سلولهای ۱۳۲۱N۱ با وجود بیان TLR9 تغییری نمی کند.

کلمات کلیدی : ماتریکس متالوپروتئیناز، DNA باکتری، TLR9، U87 ، ۱۳۲۱N۱

فهرست مطالب ه
فهرست جدول‌ها ح
فهرست شکل ط

فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱ التهاب در سیستم عصبی مرکزی ۴
۱-۲ TLRها و نقش آن درالتهاب ۵
۱-۲-۱ بیان TLRها در سلولهای سیستم عصبی مرکزی ۷
۱-۲-۲ بیان TLR درسلولهای تومور ۱۰
۱-۲-۳ نقش TLR درسرطان ۱۲
۱-۲-۴ TLR۹ وآگونیست آن ۱۴
۱-۳ آستروسیت و آستروسیتوما ۱۵
۱-۴ ماتریکس متالوپروتئیناز ۱۹
۱-۴-۱نقش ماتریکس متالوپروتئیناز در تومورها ۲۰

فصل دوم : مواد و روش ها

۲-۱ تخلیص DNA باکتری ۲۲
۲-۲ کشت سلول ۲۳
۲-۲-۱ تهیه PBS به میزان ۱۰۰۰ میلی لیتر ۲۳
۲ -۲-۲ تهیه تریپسین/ EDTA به میزان ۱۰۰ میلی لیتر ۲۴
۲ - ۳ استخراج RNA (بر اساس کیت سیناژن RNXplus) ۲۵
۲-۴ RT-PCR ۲۵
۲-۴-۱سنتز cDNA (۲۰میکرولیتر) ۲۵
۲-۴-۲ Touchdown PCR بر اساس کیت Fermentas ۲۶
۲ -۴-۳ الکتروفورز ۲۷
۲-۵ سنجش پروتئین به روش لوری ۲۸
۲-۶ ژلاتین زایموگرافی ۲۹

۲-۶-۱روش کار با نرم افزار Image j ۳۱
۲-۷ آنالیز آماری ۳۲

فصل سوم : نتایج

۳- ۱ تخلیص DNA ۳۳
۳-۲ کشت سلول ۳۵
۳- ۳ استخراج RNA ۳۵
۳-۴ RT- PCR ۳۶
۳- ۵ ژلاتین زایموگرافی ۳۷

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری ۳۹

فهرست شکل ها

فصل اول:

تصویر ۱-۱ نقش TLRها در سیستم عصبی مرکزی ۹
تصویر ۱-۲ نقش دوگانه TLRsدر تقویت ومهار تومورها ۱۳
تصویر ۱-۳ روند شکل گیری آستروسیتوما از سلولهای بنیادی عصبی ۱۷
تصویر۱-۴ دومنطقه درمغز که آستروسیتوما در ان شکل می گیرند. ۱۸

فصل سوم: نتایج

تصویر A ۳- ۱ طیف DNA (UV/Vis) دو رشته ای اشریشیاکلی ۳۳
تصویر B ۳- ۱ طیف DNA (UV/Vis) تک رشته ای اشریشیاکلی ۳۴
تصویر۳-۲ الکتروفورز DNA باکتری اشریشیاکلی ۳۴
تصویر ۳-۳ تصویر فازکنتراست از مورفولوژی سلولهای ۱۳۲۱N۱ وU۸۷ ..... ۳۵
تصویر ۳- ۴ الکتروفورز محصول PCR ۳۶
تصویر ۳- ۵ ژلاتین زایموگرافی ۳۷
تصویر ۳-۶ نسبت دانستیه باندهای فرم پرو درسلولهای۱۳۲۱ N۱ ..... ۳۸
تصویر۳- ۷ نسبت دانستیه باندهای فرم پرو وفعال U۸۷ ..... ۳۸

فهرست جدول ها

فصل اول

جدول۱-۱ TLRها الگوهای متفاوت میکروبی را تشخیص می دهند ۶
جدول ۱-۲ بیان TLRها در سلولهای سیستم عصبی موش وانسان ۸
جدول۱-۳ بیان TLRها در انواع تومورها ۱۱
جدول۱-۴ طبقه بندی ماتریکس متا لوپروتئیناز ها.....۲۰

فصل دوم

جدول ۲-۱ طرزتهیه منحنی استاندارد ۲۸
جدول ۲-۲ طرزآماده سازی نمونه ها جهت سنجش پروتئین ۲۸

فصل ۱

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

عفونت [۱] و التهاب [۲] ناشی از آن نقش تنظیمی مهمی درپیشرفت تومورها دارد[۱]. Rudolf Virchow درسال۱۸۶۳ عنوان کرد که التهاب مزمن سبب ایجاد سرطان [۳] می‌شود. از آن پس مجموعه مطالعات انجام شده دراین زمینه، این فرضیه را تایید کردند و تخمین زده شد که ۲۰ درصد مرگ های ناشی ازسرطان مرتبط با عفونت و التهاب می‌باشد. عفونت باکتریایی در سرطان معده و ویروس هپاتیت B وC در پیشرفت سرطان کبد نقش مهمی دارند[۱]. مطالعات اخیر نشان داده است که التهاب مزمن، خطرتکوین و پیشروی سرطان را افزایش می‌دهد[۲]. التهاب،واکنش سیستم دفاعی میزبان برعلیه میکروب‌های مهاجم، آسیب‌های بافتی و سرطان است. دراین میان TLRها [۴]، نقش حیاتی را در پاسخ ایمنی ذاتی [۵] و متعاقب آن ایمنی اکتسابی [۶] بر عهده دارند[۳].

TLRها گیرنده‌های پروتئینی هستد که در غشای سلول‌های ارگانیسم های پر سلولی یافت می‌شوند و الگوهای ویژه‌ای از ترکیبات متفاوت میکروبی را تشخیص می‌دهند[۵-۴]. در پستانداران، گیرنده ها شامل ۱۱ عضو می‌باشند که هریک به طور اختصاصی لیگاند خاصی را شناسایی می‌کنند. برای مثال TLR9, TLR7 و TLR4 به ترتیب DNA , RNA و لیپوپلی ساکارید [۷] باکتری را تشخیص می دهند[۵-۴]. الیگونوکلئوتیدهای [۸] دارای دی نوکلئوتید [۹] CpG غیر متیله نیز همانند DNA باکتری توسط TLR9 شناسایی می‌شوند[۷-۶]. TLRها نه تنها در سلول‌های ایمنی بلکه در سلول‌های سرطانی نیز بیان می‌شوند[۹-۸].

---

[1] Infection
[2] Inflammation
[3] Carcinogenesis
[4] Toll-like receptors
[5] Innate immunity
[6] Adaptive immunity
[7] Lipopolysaccharide
[8] Oligonucleotide
[9] Dinucleotide

سیگنال‌های حاصل از فعال شدن TLRها در سلول‌های سرطانی ممکن است پیشرفت سرطان، فعالیت آنتی آپوپتوتیک[۱۰] و مقاومت به پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان را تقویت کنند[۱۱-۹]. فاکتورهای محیطی همچون عفونت و التهاب ناشی از آن تنظیم کننده‌های مهمی در پیشرفت سرطان هستد[۲]. سیستم ایمنی ذاتی می‌تواند از طریق مکانیسم وابسته به التهاب، باعث تکوین و پیشرفت تومورها شود[۱۳-۱۲]. کموکین‌ها و سیتوکین‌ها[۱۱]و ماتریکس متالوپروتئینازهای[۱۲] ناشی ازسلول‌های التهابی و سلول‌های ایمنی به طور موثری روی سلول‌های میزبان و رفتار سلول‌های سرطانی تاثیر می گذارند و منجر به رشد و متاستاز[۱۳]سلول‌های سرطانی می‌شوند. نشان داده شده است که اندوتوکسین[۱۴] و لیپو پلی ساکارید باکتری در یک مدل از سرطان کولون موش باعث تقویت متاستاز می‌شود[۱۵-۱۴]. علاوه بر اثر غیر مستقیم، به واسطه سیتوکین‌های ناشی ازعفونت و التهاب بر متاستاز، ترکیبات باکتری مانند لیپوپلی ساکارید، نیز می‌توانند اثر مستقیم بر متاستاز سلول‌های سرطانی که به طور فراوان TLR را بیان می‌کنند، داشته باشند[۱۵]. تومورها توسط سلول‌های سرطانی، سلول‌های سالم که دچار استرس شده اند، بافت استرومایی و ماتریکس خارج سلولی که منبع اصلی فاکتور های پیشرفت و متاستاز سرطان هستند، احاطه شده اند[۱۶]. متاستاز شامل یک سری مراحل بهم پیوسته است. مرحله اصلی در متاستاز، تجزیه ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه است. ازجمله مولکول‌هایی که دارای فعالیت پروتئولیتیکی می‌باشند و نقش مهمی در تجزیه ماتریکس خارج سلولی و متاستاز دارند، ماتریکس متالو پروتئیناز ها هستند[۱۷]. در بین این آنزیم ها ماتریکس متالوپروتئینازهای۲و ۹ ، نقش مهم تری را در تجزیه کلاژن غشای پایه ایفا می‌کنند[۱۸].

گزارش‌ها نشان می‌دهد که بیشتر سلول‌های سرطانی ازجمله سرطان کولون، پروستات، معده و تومورهای مغز، ماتریکس متالوپروتئیناز را بیان می‌کنند[20-19]. هیدرولیز کلاژن[۱۵]، ژلاتین[۱۶]، لامینین[۱۷]، فیبرونکتین[۱۸] و الاستین[۱۹] غشای پایه توسط این آنزیم ها با تهاجم سلول‌های سرطانی و متاستاز مرتبط است[22-21].

[10]Antiapoptotic
[11]Cytokines
[12]Matrix metalloproteinase
[13]Metastasis
[14]Endotoxin
[15] Collagen
[16] Gelatine
[17] Laminin
[18] Fibronectin
[19]Elastin

میزان بیان TLR9 در نمونه های مختلف سلول‌های سرطانی ازجمله پروستات[۲۰]، آستروسیتوما[۲۱]، گلیوبلاستوما[۲۲] متفاوت است[23]. فعالیت این گیرنده‌ها با CpG یا DNA باکتری، تهاجم سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد[24].یافته ها نشان می‌دهند که آگونیست[۲۳] TLR9 متاستاز و تهاجم[۲۴] سرطان سینه در انسان را از طریق فعال شدن MMP13 تحریک می‌کند[24]. همچنین مشخص شده است که تیمار کردن آستروسیت[۲۵] موش با CpG باعث فعال شدن MMP9 می‌شود[25]. این اثر در آستروسیت‌ها ممکن است به واسطه فعال شدن MMP13 باشد که منجر به فعال شدن proMMP9 می‌شود [26]. تحقیقات نشان می‌دهد که مشابه این مکانیسم‌ها در سلول‌های بیان کننده TLR9 مانند سلول‌های تومور مغز نیز در هنگام عفونت باعث افزایش تهاجم و متاستاز می‌شوند[29-27]. هرچند مکانیسم و عملکرد TLR در تومورزایی و پیشرفت آن ناشناخته است ولی این یافته‌ها نشان می‌دهد که TLR یک هدف مناسب برای تکوین داروهای ضد سرطان[۲۶] است و شناسایی آگونیست و آنتاگونیست‌های آنها نقش مهمی در درمان تومورها ایفا می کند[32-30].

[20]Prostate
[21] Astrocytoma
[22] Glioblastoma
[23]Agonists
[24]Invasion
[25]Astrocyte
[26]Anticancer

۱-۱ التهاب در سیستم عصبی مرکزی

سد خونی- مغزی درحفظ هموستازی فیزیولوژیک و ایمونولوژیک سیستم عصبی نقش مهمی دارد و ورود عوامل بیماریزا، پروتئین‌های پلاسما و سلول‌های ایمنی را محدود می‌کند [33]. سلول‌های ایمنی مستقر درمغز، میکروگلیا ها[۲۷] (ماکروفاژ مغز) و آستروسیت‌ها هستند که سیتوکین و واسطه های التهابی را تولید می‌کنند. عفونت باکتریایی در سیستم عصبی مرکزی یکی از عوامل مهم و اصلی در ایجاد التهاب می‌باشد.

عفونت باکتریایی در مغز همچون مننژیت توسط چندین عامل بیماریزا مانند اشریشیاکلی[۲۸]، استرپتوکوک گروه B[۲۹]، هموفیلوس آنفلوانزا [۳۰] ، نیسریا مننژیتیدیس[۳۱]، استرپتوکوک پنومونیه[۳۲] و لیستریا مونوسیتوژنز[۳۳] ایجاد می‌شود [33]. با ورود عوامل باکتریایی به سیستم عصبی مرکزی پاسخ‌های التهابی قوی در بافت مغز ایجاد می‌شود[34]. با این وجود مکانیسم دقیق ایجاد پاسخ‌های التهابی توسط این عوامل ناشناخته است. مطالعات اخیر در درک نقش TLR9 در التهاب، نشان می دهدکه TLR9 به عنوان یک گیرنده برای DNA باکتری عمل می‌کند و پاسخ‌های التهابی را در مغز شروع می‌کند. همچنین مطالعات نشان داده است که DNA باکتری دارای موتیف هایCpG مننژیت را در موش القا می کند [35]. گزارش دیگر نشان می‌دهد که تزریق اینتراکرانیال[۳۴] CpG سبب فعال شدن آستروسیت و میکروگلیا می گردد. در مطالعات دیگری در آستروسیت های خالص شده و میکروگلیا مشاهده شده است که در اثر تحریک با CpG ها، میزان تولید سیتوکین ها وکموکین های التهابی به سرعت افزایش می یابد[36].

مجموع یافته ها نشان می‌دهد که TLR9 توسط آستروسیت و میکروگلیا بیان می‌شود و نقش مهمی را درالقا مننژیت به واسطه CpG بازی می‌کند. نقش مهم وحیاتی TLRها در شروع پاسخ‌های التهابی و مسیر انتقال پیام آن به طور گسترده در حال تحقیق و بررسی است [37].

---

[27] Microglia
[28] Escherichia coli
[29] Group B streptococci
[30] Hemophilus influenzae
[31] Neisseria meningitides
[32] Streptococcus pneumoniae
[33] Listeria monocytogenes
[34] Intracranial

۱-۲ TLRها و نقش آن درالتهاب

TLRها با تشخیص الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن[۳۵] نقش مهمی را در التهاب و در دفاع ذاتی میزبان بر علیه میکروارگانیسم های مهاجم بازی می‌کنند[38]. Toll اولین بار به عنوان ژن مهم برای تعیین محور پشتی- شکمی[۳۶] در تکوین[۳۷] جنینی در دروزوفیلا[۳۸] شناسایی شد [39].بعدها مشخص شد که نقش مهمی در سیستم ایمنی دروزوفیلا بر علیه عفونت قارچی[۳۹] دارد[40]. TLR4 اولین هومولوگ Toll[۴۰] در پستانداران، به عنوان گیرنده مورد نیاز برای ایمنی اکتسابی شناسایی شد. این گیرنده و اعضای خانواده آن نقش مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی به عفونت درپستانداران ایفا می‌کنند[41].

تا به امروز یازده TLR انسانی وسیزده TLR درجوندگان[۴۱] شناسایی شده است که در پاسخ ایمنی ذاتی واکتسابی نقش دارند(جدول۱-۱) [42]. این گیرنده‌ها پروتئین‌های غشایی هستند که از تکرارهای غنی از لوسین (LRR[۴۲]) در بخش خارج سلول و یک بخش TIR[۴۳]درناحیه سیتو پلاسمی، تشکیل شده اند. این گیرنده ها لیگاند را از طریق توالی غنی از لوسین در خارج سلول تشخیص می‌دهند و پیام درون سلول را از طریق بخش TIR, انتقال می دهند و سبب فعال شدن فاکتورهای رونویسی مانند NF-κB[۴۴] می شوند[43] . فعالیت TLRها منجر به واکنش ایمنی و افزایش تولید واسطه های التهابی همچون سیتوکین‌ها وکموکین- ها می‌شود. TLRها به طور گسترده حفظ[۴۵] شده اند و به نظر می‌رسد که بیشتر سلول‌ها به میزان کم و به طور پایدار آن ر ا بیان می‌کنند. در یک آنالیز فیلوژنیک[۴۶]، این گیرنده‌ها در مهره داران بر اساس توالی اسید آمینه و همولوژی LRRs به شش خانواده مجزا طبقه بندی شدند[44]. محققان طی سال‌های گذشته تعداد زیادی از مولکول‌های موثر در مسیر فعالیت این گیرنده‌ها را شناسایی کردند[45]. مسیر فعالیت این گیرنده‌ها، به دنبال ورود عامل مهاجم از طریق کمپلکس‌های پیچیده فسفریله شدن[۴۷]، تجزیه شدن هدفمند[۴۸] و مولکول‌های پیام رسان تنظیم می‌شود[45]. TLRها علاوه برشناسایی الگوهای متفاوت مرتبط با پاتوژن تعدادی لیگاند

---

[35] Pathogen-associated molecular patterns (PAMP)
[36] Dorsal–ventral
[37] Development
[38]Drosophila melanogaster
[39] Fungal
[40] Homolog
[41] Murine
[42] Leucine-rich repeats
[43]Toll-interleukin (IL)-1 receptor
[44]NF-κB
[45]Preserved
[46]Phylogenetic
[47]Phosphorylation
[48]Targeted degradation,

درونی[۴۹] و ترکیبات ناشی از سلول‌های آسیب دیده (DAMPs[۵۰]) شامل پروتئین شوک حرارتی[۵۱]، mRNA ، سورفاکتانت[۵۲] A و D ،HMGB1[۵۳]، هیالورونان[۵۴] وفیبرونوژن[۵۵] را شناسایی می‌کنند[48-46] .

TLR	Ligand (PAMP)	Pathogen
TLR1/2	Triacylated lipopeptides	Gram-negative and Gram-positive bacteria
TLR2	Lipoarabinomannan	Mycobacteria, Gram-positive bacteria
	GPI anchor (tGPI-mutin)	*Trypanosoma cruzi*
	Peptidoglycan	Gram-positive bacteria
	Phospholipomannan	*Candida albicans*
	Glucuronoxylomannan	*Cryptococcus neoformans*
	Porins	*Neisseria meningitidis*
	Hemagglutinin protein	Measles virus
	Envelope glycoproteins gB and gH	Human cytomegalovirus (HCMV)
	Not determined	Herpes simplex virus (HSV) 1
	Not determined	*Coccidioides posadasii*,
	Not determined	*Plasmodium berghei*
	Not determined	*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*
TLR2/6	Diacyl lipopeptides	Mycoplasma
	Lipoteichoic acid (LTA)	Gram-positive bacteria
TLR3	dsRNA	Viruses
TLR4	LPS	Gram-negative bacteria
	Glycoinositolphospholipids	*Tryponosoma cruzi*
	Mannan	*C. albicans*
	Glucuronoxylomannan	*C. neoformans*
	Not determined	*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*
TLR7	ssRNA	Viruses
TLR8	ssRNA	Viruses
TLR9	Unmethylated CpG DNA	Bacteria and viruses
	ssDNA	HCMV, HSV
	Hemozoin	*Plasmodium falciparum*
TLR11	Profilin-like protein	*Toxoplasma gondii*

جدول۱- ۱ TLRها الگوهای متفاوت میکروبی را تشخیص می دهند[24,4.155] .

مولکول‌های پلی- ساکاریدی همچون هیالورونان و هپارین سولفات[۵۶] که در پاسخ به آسیب یا عفونت، از سلول‌های تخریب شده و مرده آزاد می‌شوند، می‌توانند TLR را فعال کنند[49].TLRها علاوه بر نقششان در دفاع میزبان، در هموستازی بافت شامل ترمیم[۵۷] و بازسازی[۵۸] نیز نقش دارند[51-50].

[49]Endogenous ligands
[50]Damage-associated molecular patterns
[51]Heat shock proteins (hsp)
[52] Surfactant
[53]High mobility group box 1
[54] Hyaluronan
[55]Fibrinogen
[56]Heparin sulfate
[57]Repair
[58]Regeneration

فرایند ترمیم ازطریق چندین عملکرد بیولوژی شامل تکثیر سلولی، آنژیوژنز[۵۹] و بازسازی ماتریکس خارج سلولی انجام می شود که این گیرنده‌ها این مراحل را بعد از آسیب بافتی، از طریق القا تولید سیکلواکسیژناز[۶۰]، کموکین، ماتریکس متالوپروتئیناز، VEGF[۶۱] و فعال کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی[۶۲]، تنظیم می‌کنند[53-52]. TLRها در بخش‌های متفا وت سلولی بیان می‌شوند. TLR1,2,4,5,6,10 روی سطح سلول، TLR3 و زیر خانواده TLR9 که شامل TLR7,TLR8,TLR9 می باشد، در اندوزوم درون سلولی بیان می‌شوند [38]. علاوه بر سلول‌های B، ماکروفاژ ها، سلول‌های دندریتیک و دیگر سلول‌های ایمنی، این گیرنده‌ها در انواع سلول های دیگر مانند سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های چربی[۶۳]، سلول‌های ماهیچه ای اسکلتی، سلول‌های β پانکراس ، هپاتوسیت‌ها و همچنین سلول‌های سیستم عصبی مانند نورون، میکروگلیا، آستروسیت و الیگودندروسیت‌ها بیان می‌شوند[38].

تا به امروز لیگاند ویژه ای برای TLR1,6 شناخته نشده است. این دو گیرنده به همراه TLR2 یک هترودایمر را تشکیل می دهند که TLR2 به همراه TLR1,6 به ترتیب لیپو پروتئین تری و دی استیله را تشخیص می دهند[38]. لیگاند TLR3, RNA دو رشته ای است [58-55]. TLR4 که توسط سلول‌های زیادی بیان می‌شود، ترکیبات دیواره باکتری گرم منفی یعنی LPS را تشخیص می‌دهد [55,57,60]. TLR9 ، DNA دورشته ای باکتری و ویروس و الیگو دی اکسی نوکلئوتید ها ی دارای موتیف های CpG را شناسایی می‌کند[۷-۶].

۱-۲-۱ بیان TLRها در سلول‌های سیستم عصبی مرکزی

علاوه بر نورون‌ها ، سیستم عصبی مرکزی دارای سه جمعیت سلولی گلیا است؛ آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها با منشا نورواکتودرمال[۶۴] ومیکروگلیا با منشا مزودرم.[۶۵] نقش هر سه گلیا به نوعی حمایت از نورون‌ها می باشد. به علت عفونت های ایجاد شده درسیستم عصبی مرکزی توسط عواملی کهTLRها را فعال می‌کنند، انتظار می‌رود که سلول‌های مغز به طور پایدار این گیرنده‌ها را بیان کنند(جدول۱-۲). ازبین چهار نوع سلول در سیستم عصبی مرکزی، میکروگلیا همه انواع این گیرنده را بیان می‌کنند. در حقیقت گزارش‌ها نشان می‌دهد که میگروگلیا ها ، mRNAی TLR1-9 را بیان می کنند[56-54]. نورون‌ها و الیگودندروسیت‌ها تنها mRNA ی TLR3را بیان می‌کنند[57]. آزمایش‌ها روی آستروسیت با خلوص۹۹درصد در شرایط کشت آزمایشگاهی نشان داده است که LPS نتوانسته ترشح سیتوکین وکموکین‌ها را تحریک کند و

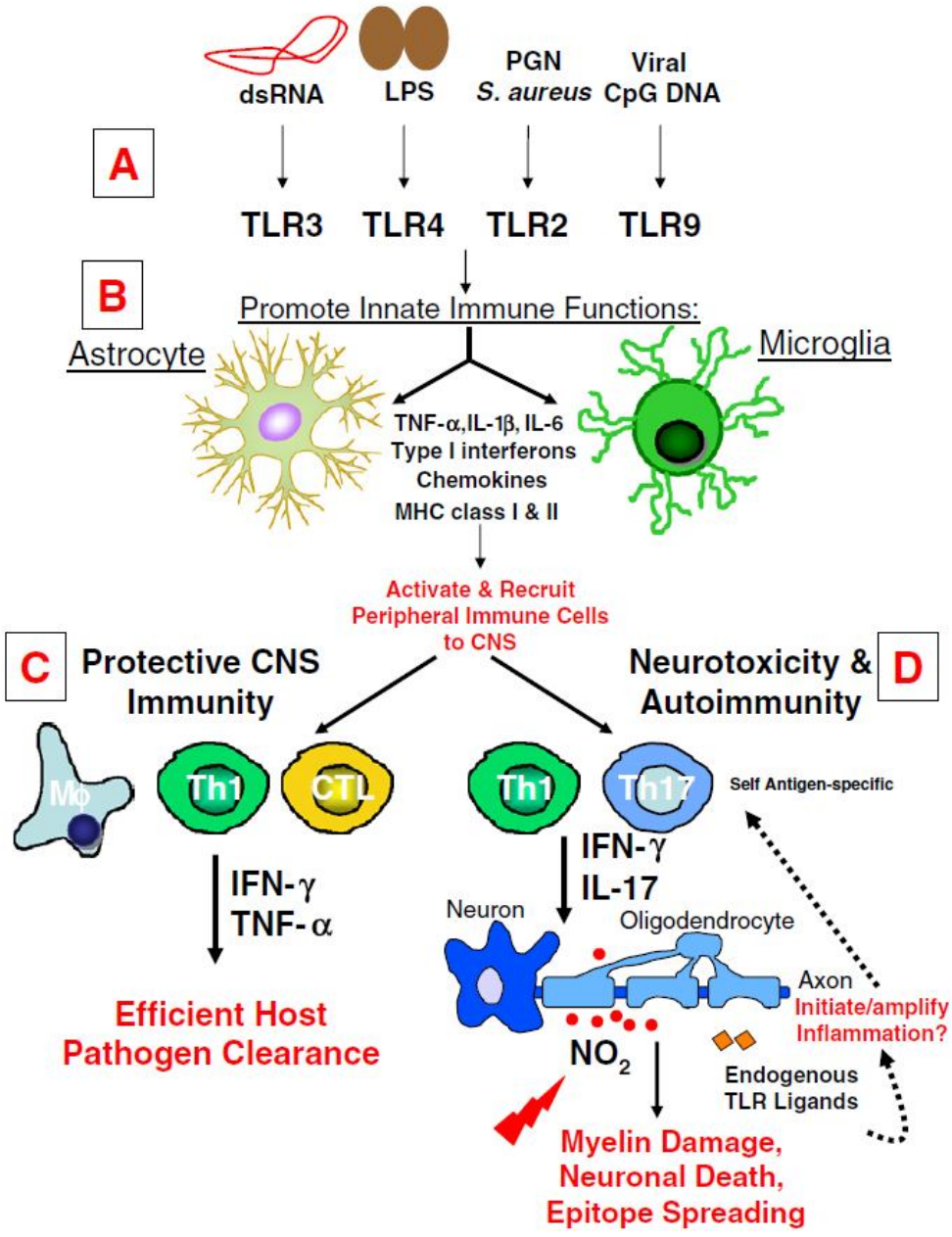
[59] Angiogenesis
[60] Cyclooxygenas
[61] Vascularendothelial growth factor
[62] Mesenchymal stem cells
[63] Adipocytes
[64] Neuroectodermal
[65] Mesoderm

همچنین بیان mRNA ی TLR4 در این سلول‌ها مشخص نشده است. با این وجود در مطالعه دیگری عنوان شده که آستروسیت‌ها mRNA ی TLR2,4 را بیان می کنند[58]. همچنین بیان mRNA ی TLR1-10 به استثنای TLR8 در آستروسیت‌های جوندگان گزارش شده است[59]. تفاوت تفاسیر ممکن است به دلیل حضورتعداد کمی میکروگلیا در بین جمعیت آستروسیت‌های جدا شده، باشد [59].بیان TLR در سطح پروتئین در آستروسیت‌ها هنوز مشخص نشده است[38]. در آنالیزهای ایمونوهیستوشیمی گزارش شده است که نورون‌ها در انسان وموش mRNA ی TLR4 را بیان می‌کنند[61]. مشخص شده است که میکروگلیا و آستروسیت‌ها mRNA ی TLR9 را بیان می‌کنند و به CpG با تولید پروتئین‌های IL1-β, TNF-α, IL-6,IL-12, MIP-1α MIP-1β پاسخ می‌دهند (تصویر ۱-۱)[55,58,62]. فعالیت مسیر انتقال پیام c-jun-JNK در آستروسیت‌ها پس از تیمار با CpG گزارش شده است [63].

Cell type	Species	TLRs
Microglia	Human	TLR1–9
	Mouse	TLR1–9
Astrocytes	Human	TLR 1–5, TLR9
	Mouse	TLR 1–9
Neurons	Human	TLR3
	Mouse	TLR2–4, TLR6–8

جدول ۱-۲ بیانTLRها در سلولهای سیستم عصبی موش وانسان[155]

فعالیت این مسیر برای تولید سیتوکین‌های پیش التهابی وکموکین‌ها در این سلول‌ها مهم است. برخلاف آستروسیت‌های جوندگان، بیان TLR9 در آستروسیت‌های جنینی انسان گزارش نشده است [64]. بیان انواع دیگر این گیرنده‌ها در سلولهای مغز ناشناخته باقی مانده است. به عنوان مثال TLR10 تنها در سلول‌های لنفوسیت B به صورت هترودایمر با TLR1 و TLR2 بیان می شود[65]. مطالعات زیادی برای مشخص شدن بیان این نوع گیرنده درمغز و اهمیت آن در عفونت نیاز است [66].



تصویر ۱-۱نقش TLRها در سیستم عصبی مرکزی[156]

۱-۲-۲ بیان TLR درسلولهای توموری

شواهد و مطالعات در دسترس نشان دهنده این است که سلول‌های سرطانی، یک یا چند نوع TLRرا بیان می‌کنند (جدول۳-۱). Hassan وهمکارانش بیان TLR4 را در نوروبلاستوما[۶۶] نشان دادند. اثر بیولوژیکی این گیرنده‌ها بر روی رشد، بقا و تکثیر مشخص شده است [67].
تحقیقات موجود نشان می‌دهد که باکتری موجود در محیط توموری قادر است رشد را از طریق مسیر انتقال پیام TLRها تقویت کند[68]. Huang و همکارانش نشان دادند که لیستریا موجود در محیط تومورهای بزرگ، رشد توموری را از طریق مسیر انتقال پیام TLR2 سرعت می‌بخشد. مشابه این مکانیسم در سلول‌های بیان کننده TLR2 در سرطان معده که با هلیکو باکتر پیلوری مواجه می‌شوند، نیز مشاهده شده است [68]. همچنین Kundu و همکارانش، نشان دادند که سلول‌های اپیتلیال سرطان پروستات، TLR9 و TLR4 را بیان می‌کنند و تکثیرشان در حضور DNA و LPS در محیط کشت افزایش می‌یابد[69,70] . بیان TLRها برروی سلول‌های سرطانی از طریق افزایش بیان NF-κB و پروتئین‌های آنتی آپوپتیک، سبب ایجاد سرطان و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. بیان TLR2, 4, 5، 9 روی سلول‌های اپیتلیال معده و مسیر انتقال پیام TLR4, نقش مهمی در تنظیم تکثیر و آپوپتوز دارد[71]. افزایش بیان این گیرنده در سلول‌های اپیتلیال آلوده شده با هلیکوباکتر پیلوری[۶۷] مشاهده شده است. تحریک مداوم این گیرنده با ترکیبات LPS از طریق فعال شدن NF-κB، سبب تولید فاکتور های التهابی همچون سیکلو اکسیژناز ۲[۶۸] و پروستاگلندین‌ها [۶۹] می‌شود که در نهایت منجر به سرطان زایی در سلول‌های اپیتلیال نرمال معده می‌شود [72]. در ارتباط بین التهاب و سرطان، در سرطان کولون مشاهده شده است که TLR 1- 9 در سلول‌های اپتلیال کولون بیان می‌شوند. بیان سه گیرنده TLR2-4 در بیشتر دودمان های سرطانی کولون افزایش یافته است و افزایش بیان آنها توسط باکتریهای موجود در لومن روده تنظیم می شود[73]. تغییرات منجر به سرطان، در دستگاه تولید مثل ماده از طریق تحریک TLR توسط عوامل بیماریزا ایجاد می-شود. TLR2-5 بر روی دودمان های سلولی سرطان تخمدان بیان می‌شوند[74].
فعال شدن TLR4 توسط لیپوپلی ساکارید، بقا این سلول ها را با تولید پروتیین‌های آنتی آپوپتوتیک شامل XIAP , Akt فسفریله شده تقویت می‌کند[75]. TLR5,9 که در حالت طبیعی در سلولهای رحم بیان نمی شوند، در سرطان رحم نقش دارند[77-76]. TLR2-4 و TLR9 در سرطان ریه بیان می‌شوند. فعالیت TLR4 به وسیله لیپو ساکارید باعث مقاومت سلول‌های سرطانی ریه به آپوپتوز می‌شود[78]. همچنین بیان متفاوتی از TLR9 در طیف

[66]Neuroblastoma
[67] Helicobacter pylori
[68]Cyclooxygenase-2
[69]Prostaglandin E2

وسیعی از تومور ها شامل پروستات، ریه، سینه، آستروسیتوما و گلیو بلاستوما مشاهده شده است. فعالیت این گیرنده به وسیله DNA باکتری یا الیگونوکلئوتیدهای CpG سبب افزایش مهاجرت و متاستاز می‌شود[79-81]. TLR 2-4 به میزان زیادی برروی سلول‌های ملانوما[70] بیان می‌شوند. مطالعات *in vitro* , *in vivo* نشان می‌دهند که دیگر TLRها به میزان کمتری در سلول‌های ملانوما بیان می‌شوند. فعالیت این گیرنده‌ها در ملانوما سبب تولید سیتوکین‌های مرتبط با التهاب می‌شود[82]. عملکرد TLR از دو جنبه مهم است؛ تحریک این گیرنده‌ها ممکن است باعث تقویت تومور یا باعث فعالیت آنتی توموری شود[83]. بیان این گیرنده‌ها در همه تومورها مشاهده نشده است وهمچنین همه آگونیست‌های این گیرنده‌ها منجر به مسیر ضد توموری نمی شوند. به علاوه چند شکلی بودن[71] TLR روی تومور- ها ممکن است منجر به اثرات نا خواسته در مسیر انتقال پیام در طی تیمارآنها با لیگاندهای مختلف شود [84].

Type of cancer	TLR
Gastric cancer	TLR2,TLR4,TLR5,TLR9
Colorectal cancer	TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR9
Ovarian cancer	TLR2,TLR3,TLR4,TLR5
Cervical cancer	TLR3, TLR4, TLR5,TLR9
Lung cancer	TLR2,TLR3,TLR4,TLR9
Prostate cancer	TLR4,TLR9
Melanoma	TLR2,TLR3,TLR4
Brain cancer	TLR2,TLR4
Breast cancer	TLR2,TLR3,TLR4,TLR9
Hepatocellular carcinoma	TLR2,TLR3,TLR4,TLR6,TLR9
Laryngeal cancer	TLR2,TLR3,TLR4

جدول۱-۳ بیان TLRها در انواع تومورها[24]

[70] Melanoma
[71] Polymorphism

۱-۲-۳ نقش TLR درسرطان

TLRها دردفاع میزبان بر علیه عفونت و حفظ هموستازی بافت از طریق تنظیم پاسخ‌های التهابی و ترمیمی در بافت آسیب دیده، نقش دارند. اثرات ضد توموری آگونیست‌های TLR بستگی به نقش TLR در سیستم ایمنی دارد. این گیرنده‌ها پاسخ‌های ایمنی ذاتی را شروع می‌کنند و پس از فعال کردن ایمنی اکتسابی باعث حذف سلول‌های سرطانی وتغییر شکل یافته می شوند. با این وجود سلول‌های توموری در مراحل بعدی از نقش TLR در هموستازی بافت، برای رشد و بقا استفاده می‌کنند. ازطریق مهار پاسخ ایمنی با تولید فاکتورهای مهار کننده ایمنی، منجر به تقویت رشد سلولی و آنژیوژنز و تولید فاکتورهای آنتی آپوپتوتیکی می شوند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که مسیر انتقال پیام TLR به عنوان یک شمشیر دولبه[۷۲] در درمان سرطان عمل می‌کند(تصویر۱-۲). تعیین میزان موثر لیگاند TLR برای درمان سرطان یک امر حیاتی و مهم می‌باشد. مشخص شده است که میزان بالای آگونیست های TLR ممکن است اثر ضد توموری داشته باشد و میزان پایین آن رشد توموری را تقویت کند [85]. بسیار مهم است که چگونه از اثرات ضد توموری آن استفاده کنیم. اثر ترکیبی آگونیست‌ها برای TLRهای مختلف مانند آگونیست TLR9 با آگونیست TLR4 ، در مدل‌های حیوانی مطالعه شده است. ترکیب آگونیست‌ها کارایی بیشتری در اثرات ضد توموری دارد. شواهد به دست آمده درباره نقش TLRها در هموستازی از مطالعات انجام شده روی TLR2 و TLR4 به دست آمده است. TLR ها به عنوان عامل مهم از طریق ایمنی ذاتی در ایجاد سرطان نقش دارند. اثرات تقویت کننده تومورها با مطالعه روی مدل‌های توموری ترانسفر[۷۳] نشان داده است که لیپو پلی ساکارید رشد تومورها را در موش4T1 دارای سلول‌های کارسینومای پستانی وCT26 دارای سرطان کلون افزایش داده است. تزریق مستقیم لیستریا مونوسیتوژنز[۷۴]- باکتری گرم مثبت- رشد تومورها را در سلول‌های هپاتوکارسینوما[۷۵]موش مدل H22 افزایش داد[89-86]. فلاژلین-[۷۶] لیگاند TLR5 - رشد تومور را در D2F2/E2 ،۱۰-۸ روز پس از تیمار شدن با این لیگاند مهارکرد در حالی که رشد هر دو دودمان سلولی در زمان تلقیح با این لیگاند افزایش یافت. به علاوه ترکیب فلاژلین و CpG ،۱۰- ۸ روز پس از تیمار کردن رشد توموری را در D2F2/E2 متوقف کرد. مشخص شده است که موقعیت بر هم کنش بین تومور ، ریزمحیط[۷۷] و سیستم دفاعی میزبان برای اثر لیگاند بسیار حیاتی است[92-90] .

[72]Double-edged sword
[73]Transferred
[74]Listeria monocytogenes
[75]Hepatocarcinoma
[76]Flagellin
[77]Microenvironment