موتانت های PreS2 ویروس هپاتیت B در بیماران مبتلا به سرطان کبد (HCC)

زهرا گودرزی[۱]، قدرت الله منتظری[۲]، سید موید علویان[۳]، حسین کیوان[۴]، مهدی قربانعلی زادگان[۵]، مریم دارم[۱]، مهدی نوروزی[۶]، سید محمد جزایری[۷*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی، دانشگاه تهران، دانشکده بهداشت
۲. متخصص داخلی، فوق تخصص بیماری های گوارش و کبد، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. متخصص داخلی، فوق تخصص بیماری های گوارش و کبد، استاد دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
۴. PhD ویروس شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
۵. کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
۶. دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران
۷. MD, PhD ویروس شناسی، استاد یار دانشگاه تهران، دانشکده بهداشت، بخش ویروس شناسی

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انسیتو تحقیقات بهداشتی، بخش ویروس شناسی، تلفن: ۸۸۹۵۰۱۸۷ ،
jazayerism@tums.ac.ir

دریافت مقاله: اردیبهشت هشتاد و شش پذیرش برای چاپ: مرداد هشتاد و شش

چکیده

سابقه و هدف: *سرطان کبد یا Hepatocellular Carcinoma (HCC) یکی از شایع ترین سرطان های موجود در دنیا است. عفونت مزمن با ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده آن می باشد. در طی عفونت مزمن با HBV، واریانت هایی از ویروس ایجاد می شود که دارای موتاسیون های حذفی در ناحیه PreS2 می باشند. این واریانت ها ممکن است در بروز HCC نقش داشته باشند. هدف از این مطالعه تعیین وجود این موتانت ها در بیماران مبتلا به سرطان کبد در ایران می باشد.*

روش کار: *DNA ویروس از سرم ۱۰ بیمار مبتلا به HCC استخراج گردید. پس از تکثیر ناحیه PreS و تعیین توالی این ناحیه از ژنوم، وجود موتانت های PreS2 در این بیماران در مقایسه با Database مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *موتاسیون نقطه ای در سطح کدون آغازی PreS2 در دو مورد از نمونه ها مشاهده شد. در سه مورد از ایزوله ها، deletion به طول چند اسید آمینه در انتهای آمینی ناحیه PreS2 وجود داشت.*

نتیجه گیری: *در موتانت های حذفی PreS2، اپی تپ های T cell و B cell موجود بر محصول ناحیه PreS2 حذف می شود. در نتیجه شرایطی فراهم می شود که ویروس احتمالا بتواند از سیستم ایمنی فرار کند. این پروتئین های موتانت یافته PreS2 در شبکه رتیکولوم آندوپلاسمی(ER) تجمع یافته و استرس ER را سبب می شوند. به این ترتیب علاوه بر اینکه شرایط نا پایداری در ژنوم سلول ایجاد می شود از طرق غیر مستقیم تکثیر هپاتوسیت ها تحریک می شود. در نتیجه این امکان وجود دارد که سلول ها به سمت سرطانی شدن پیش روند.*

واژگان کلیدی: ***HBV, HCC, PreS2***

مقدمه

ویروس هپاتیت B (HBV) طیف وسیعی از بیماری های حاد و مزمن کبد را ایجاد می کند. در اکثر موارد، عفونت های حاد HBV معمولا خود محدود شونده است. در حالیکه عفونت مزمن معمولا در تمام طول عمر باقی خواهد ماند. تظاهرات بالینی عفونت مزمن HBV شامل حالتهای: ناقل مزمن(chronic carrier)، هپاتیت مزمن(chronic hepatitis)، سیروز و (HCC) Hepatocellular Carcinoma می باشد(۱). HCC یکی از مهمترین سرطان های رایج در دنیا به خصوص در آفریقا و شرق آسیا است. همچنین سومین دلیل مرگ ناشی از سرطان در بین مردان و هفتمین عامل مرگ ناشی از سرطان در بین زنها است و سالانه باعث مرگ یک میلیون نفر در سرتاسر دنیا می شود. مطالعات اپیدمیولوژی نشان می دهد که عفونت مزمن با HBV از عوامل عمده بروز HCC می باشد(۲).

ویروس هپاتیت B (HBV) ویروسی است کوچک و پوشش دار که متعلق به خانواده Hepadnaviridae می باشد ژنوم این ویروس ۳/۲Kb طول دارد و از چهار قالب خواندن باز (Open reading frame، ORFs) که پروتئین X، Core، پلی مراز و پروتئین های سطحی ویروس را کد می کنند، تشکیل شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

پروتئین های سطحی ویروس شامل پروتئین های Small (**S**) ، Middle(M)، Large(L) بوده که همگی محصول یک ORF واحد هستند. پروتئین M، محصول **ناحیه** PreS2 و S بوده و ناحیه PreS2، ۵۵ اسید آمینه انتهای آمینی پروتئین M را کد می کند. انتهای آمینی ناحیه PreS2حاوی اپی تپ هایی است که توسط B cell **و** T cell **شناسائی** می شوند. آنتی بادی های القا شده توسط پپتید های این ناحیه خاصیت محافظت کنندگی دارند. در تعدادی از کشورها، پارتیکل های HBs حاوی Pre-S2 را به سلول های تخم هامستر چینی منتقل کرده به این طریق واکسن های HBs حاوی Pre-S2 تولید کرده و مورد استفاده قرار می دهند. (۵-۳).

در ارتباط با سرطانزایی HBV چندین فرضیه وجود دارد از مهمترین آنها می توان به نقش ترانس اکتیویتوری پروتئین X و واریانت های حذفی PreS2 اشاره کرد(۸-۶). این واریانت ها دو نوع هستند: دسته اول به واریانت هایی اطلاق می شود که به دلیل ایجاد موتاسیون در سطح کدون آغازی اصلا قادر به ساخت پروتئین M نیستند و دسته دوم واریانت هایی را در بر می گیرد که دارای موتاسیون حذفی در نیمه انتهای آمینی ناحیه PreS2 بوده در نتیجه پروتئین M در این گروه کوتاهتر از حد معمول تولید می شود(۹). هر دو نوع این واریانت ها، در طی عفونت مزمن HBV ممکن است ایجاد شوند. شواهد به دست آمده از مطالعات مختلف در سایر نقاط دنیا نشان می دهد که موتاسیون های حذفی این ناحیه از ژنوم ممکن است در بروز HCC نقش داشته باشد. هدف این مطالعه تعیین وجود احتمالی موتانت های حذفی ویروس هپاتیت B جدا شده از بیماران مبتلا به HCC در ایران می باشد.

روش کار

مطالعه بر روی ۱۰ نمونه سرم مربوط به بیماران مبتلا به HCC، که به صورت مزمن بهHBV آلوده بودند انجام شد. این بیماران مراجعین به بیمارستان امام خمینی و آزمایشگاه کیوان بودند. هیچ یک از بیماران به ویروس هپاتیت D و C و یا HIV آلوده نبودند.

با استفاده از کیت تجاریQIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, CA) DNA ویروس از ۲۰۰ میکرولیتر سرم، طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید و در نهایت DNA استخراج شده توسط ۵۰**ul** بافر جدا کننده از غشای سلیکایی جدا گردید. سپس ناحیه Pre-S ویروس هپاتیت B با روش Semi-Nested PCR و با استفاده از کیت تجاری (Taq DNA Polymerase Kit (QIAGEN, CA تکثیر یافت. واکنش هر دو مرحله PCR بر روی ۱۰۰ **ul** مخلوط واکنش طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. در واکنش مرحله اول از ۵ul DNA ودر مرحله دوم از ۱ul DNA استفاده گردید.

شکل ۱. توالی نوکلئوتیدی ناحیه PreS2 مربوط بـه ویـروس هـای جدا شده از بیماران مبتلا به HCC در مقایسه با ژنوتیپ D موجود در GenBank

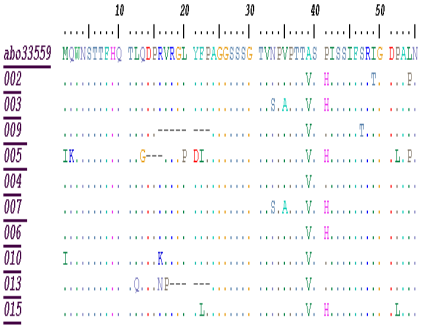
ازپرایمرهـــای 5'TCAGAATTCTCACCATATTCTTGGGAACAA3' و (PS1, Sense, nucleutides2817-2839)
و 5'CACTAGTAAACTGAGCCA3' (PS2, antisense, nucleutides668-687) به عنـوان پرایمرهـای خـارجی (1085 bases) و ازپرایمـــ

یافته ها

از طریق مقایسه کل توالی Pre-S با توالی های موجود در GenBank مشخص گردید که هر ۱۰ ویروس جدا شده در گروه ژنوتیپ D قرار دارند. سپس با مقایسه توالی ناحیه Pre-S2 ویروس های جدا شده از بیماران و توالی های مربوط به ژنوتیپ D موجود در GenBank نتایج زیر به دست آمد:

در توالی نوکلئوتیدی ناحیه Pre-S2، در ویروس جدا شده از سه بیمار موتاسیون از نوع deletion به طول های ۹، ۱۸و ۲۴ باز وجود داشت (شکل ۱). که در سطح اسید آمینه به ترتیب باعث حذف ۳، ۶ و۸ اسید آمینه شده است(شکل ۲).همچنین موتاسیون نقطه ای در سطح کدون آغازی (Start) codon point mutation ناحیه Pre-S2 ویروس جدا شده از دو بیمار دیده شد(شکل ۱). این نوع موتاسیون در سطح اسید آمینه منجر به تغییر متیونین به اینولین (M1I) شده است. در یکی از نمونه ها (005) هر دو نوع موتاسیون نامبرده شده (deletion و Start codon point mutation) با هم اتفاق افتاده است.

شکل۲. توالی اسید آمینه ناحیه PreS2 اقتباس شده از توالی نوکلئوتیدی



محصولات مرحله دوم PCR که ۸۳۴ باز طول داشتند روی ژل آگارز ۱٪ منتقل گردید و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شدند. سپس توالی محصولات مرحله دوم PCR به طور مستقیم و به صورت دوطرفه با استفاده از دستگاه sequencer ABI مدل 3130 XL و پرایمر های PS1 و PS3 مشخص گردید. توالی های به دست آمده توسط نرم افزار Chromas اصلاح و قسمت های اضافی به آنها شد. توالی های فوق با توالی های موجود در GenBank که در سایت NCBI و در بخش Blast موجود می باشند به منظور تعیین ژنوتیپ مقایسه گردید. ردیف نوکلئوتید و اسیدهای آمینه مربوطه، با توالی های موجود در GenBank، از جمله توالی های مربوط به ویروس های جدا شده از ایران و توالی مربوط به ژنوتیپ D با شماره ABO33559 مقایسه گردید(۱۱). مقایسه توسط نرم افزارBioEdit مدل 7, 0, 5, 3 صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه ناحیه PreS2 مربوط به ۱۰ ویروس HBV جداشده از بیماران HCC با ویروس Wild type موجود در GeneBank مورد مقایسه قرار گرفت. ما در این تعداد نمونه سه الگو ازموتانت های PreS2 پیدا کردیم. دسته اول در کدون آغازی دچار موتاسیون شده اند که این موتاسیون در سطح اسید آمینه منجر به تغییر متیونین به اینولین (M1I) شده است. دسته دوم علاوه بر موتاسیون در کدون آغازی دارای موتاسیون از نوع deletion نیز می باشند. دسته سوم واریانت ها فقط دارای موتاسیون از نوع deletion در این ناحیه می باشند. موتاسیون های نوع deletion همگی در انتهای 5' ناحیه PreS2 واقع شده اند. در الگوی شماره ۲و۱، به دلیل وجود موتاسیون در کدون آغازی در مرحله ترجمه پروتئین M اختلال ایجاد می شود در نتیجه این موتانت ها فاقد پروتئین M هستند. موتاسیون های نوع Deletion در الگوهای شماره ۳و۲ منحصرا بر انتهای آمینی ناحیه PreS2، اثر می گذارند.

در سال ۱۹۹۱ Raimondo در گزارش موردی واریانتی از ویروس را از یک بیمار مبتلا به HCC جدا کرد که در ناحیه PreS2, Deletion به طول ۳۴ نوکلئوتید وجود داشت(۱۲). در سال ۱۹۹۸، تحقیقی در همین زمینه توسط Takahashi انجام گرفت. از ۴۰ بیمار مبتلا به HCC, ۱۳ بیمار به واریانت های حذفی ناحیه PreS2 مبتلا بودند (۱۳). در سال ۲۰۰۳، کل ژنوم ویروسهای جدا شده از ۱۶ بیمار مبتلا به HCC ناشی از HBV مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه ۵۰٪ از بیماران مبتلا به HCC به واریانت‌های حذفی PreS آلوده بودند(۱۴). همچنین در سال ۲۰۰۳ در کشور ایتالیا ۱۹ بیمار مبتلا بهHCC از نظر وجود واریانتهای PreS2 مورد بررسی قرار گرفتند که ۸۴٪ آنها به این واریانت ها آلوده بودند(۱۵) در ژاپن در همان سال با در نظر گرفتن نوع ژنوتیپ، موتاسیون های ناحیه PreS بررسی شد. این تحقیق نشان داد که فراوانی موتانت های حذفی ناحیه PreS از طرفی به نوع ژنوتیپ (در ژنوتیپ C بیشتر مشاهده شد) و از طرف دیگر به درجه پیشرفت بیماری کبد بستگی دارد.(۱۶). علاوه بر اینها بر اساس مطالعه ای که اخیرا در تایوان انجام گرفته است فراوانی میزان موتانت های حذفی PreS2 در بیمارانی که در مراحل پیشرفته بیماریهای کبدی به خصوص HCC هستند نسبت به افراد گروه کنترول بیشتر است(۱۷). این مطالعات به همراه سایر گزارشاتی که در این زمینه وجود دارد، نشان داده اند که آلودگی به این واریانت رابطه تنگاتنگی با عفونتهای فعال HBV به خصوص HCC دارد. البته اکثر مطالعات ذکر شده بر روی ژنوتیپهای C وB انجام گرفته‌اند در حالیکه ویروسهایی که ما مورد مطالعه قرار دادیم در گروه ژنوتیپ D قرار دارند. مطالعات این چنین بر روی ژنوتیپ D کمتر صورت گرفته است.

ناحیه PreS2 با ناحیه Spacer از ژن پلی مراز هم پوشانی دارد که در عملکرد آنزیم پلی مراز هیچ نقشی برای آن شناخته نشده است(۱۴). به همین دلیل واریانت هایی از ویروس که دارای موتاسیون حذفی در این ناحیه هستند از نظر تکثیر DNA، و ترشح ویریون، با ویروس وحشی تفاوتی ندارند(۱۸). مطالعاتی که تا کنون در این زمینه صورت گرفته نشان می دهد که در نیمه انتهای آمینی این ناحیه از ژنوم، اپی تپ های مورد شناسایی توسط B cell و T cell قرار دارد (۹). در عفونت مزمن با HBV به مدت طولانی در اثر فشار سیستم ایمنی به تدریج این موتانت ها پدید می آیند. این شرایط یک مزیت انتخابی برای این نوع واریانت ها است که از سیستم ایمنی میزبان فرار کرده و در بین جمعیت ویروسی غالب شوند(۲۰و۱۹و۱۰). از طرفی نقص در تولید PreS2 باعث می شود که در ساخت پروتئین های سطحی عدم تعادل ایجاد شود. این عدم تعادل همراه است با افزایش تولید و تجمع PreS1 در داخل سلول و شبکه آندوپلاسمی که این حالت برای سلول شدیدا سمی است و ظاهری شبیه شیشه مات (Ground Glass Hepatocyte) به سلول کبدی می دهد(۲۲و۲۱و۸). مطالعه مشابهی در همین زمینه نشان داد که ممکن است شکل فضایی پروتئین های موتانت یافته HBS که در انتهای آمینی ناحیه PreS2 دچار موتاسیون های حذفی شده اند تغییر یافته و همین منجر به تجمع آنها در شبکه آندوپلاسمی و به دنبال آن منجر به استرس ER شود. استرس ER در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو DNA و ناپایداری ژنوم از یک سو و از سوی دیگر از طریق فعال کردن چندین مسیر signal transduction منجر به تکثیر سلول ها خواهد شد(۲۳). بنابراین می توان نتیجه گرفت که موتانت های حذفی PreS2 ممکن است در طولانی مدت در پاتوژنسیته HCC وابسته به HBV نقش داشته باشد. البته برای روشن شدن بیشتر این ارتباط به مطالعات بیشتری به صورت In vivo و In vitro نیاز است.

نتیجه گیری

در موتانت های حذفی PreS2، اپی تپ های T cell و B cell موجود بر محصول ناحیه PreS2 حذف می شود. در نتیجه شرایطی فراهم می شود که ویروس احتمالا بتواند از سیستم ایمنی فرار کند. این پروتئین های موتانت یافته PreS2 در شبکه رتیکولوم آندوپلاسمی(ER) تجمع یافته و استرس ER را سبب می شوند. به این ترتیب علاوه بر اینکه شرایط نا پایداری در ژنوم سلول ایجاد می شود از طرق غیر مستقیم تکثیر هپاتوسیت ها تحریک می شود. در نتیجه این امکان وجود دارد که سلول ها به سمت سرطانی شدن پیش روند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران محترم بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و خانم دکتر زهرا فرزادی تشکر می نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

REFERENCES

1. Kao J.H. and Chen D.S. Global control of hepatitis B virus infection. Lancet Infect Dis; 2002; 2, 395–403.

2. Baruch S. Blumberg. The curiosities of hepatitis B Virus prevention, sex ratio, and demography. The Proceedings of the American Thoracic Society; 2006; 3, 14-20.

3. Mchael K, Wolfram HG. Structure and molecular virology. In: Zuckerman A, Thomas H. viral hepatitis. 3Th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2005; 149-180.

4. Sobotta D, Sominskaya I, Jansons J, Meisel H, Schmitt S, Heermann K-H, Kaluza G, Pumpens Pl and Gerlich W H.. Mapping of immunodominant B-cell epitopes and the human serum albumin-binding site in natural hepatitis B virus surface antigen of defined genosubtype. Journal of General Virology; 2000; 81, 369-378.

5. J.-H. Park, M.-K. Lee, H.-S. Kim, K. L. Kim, E.-W. Cho. Ttargeted destruction of the polymerized human serum albumin binding site within the preS2 region of the HBV surface antigen while retaining full immunogenicity for this epitope. Journal of Viral Hepatitis ; 2003; 10 , 70 – 79.

6. Block T M, Mehta A S, Fimmel C J, Jorand R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. Ontogeny; 2003; 22, 5093-5107.

7. Joachin L, Eberhard H. Hepatits B vrus-induced oncogenesis. World j Gostroenterol; 2007; 13, 74-81.

8. Hui-C W, Wenya H, Ming-D L and Ih-Jen Su. Hepatitis B virus Pre-S mutant, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. Cancer Science; 2006; 97, 683-688.

9. Tai PC, Suk FM, Gerlich WH, Neurarath AR, ShihC. Hypermodification and immune escape of an internally deleted middel-envelope (M) protein of frequent and predominant hepatitis B virus variants. Virology; 2002; 292, 44-58.

10. Tuan HTT-, Hiroshi U, Khin M W, Pairoj Ll, et al. High Prevalence of Hepatitis B Virus Pre-S Mutant in Countries Where It Is Endemic and Its Relationship with Genotype and Chronicity. J Clin Microbiol. 2003; 41, 5449 –5455.

11. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo R, Imia M, et al: Typing Hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J. Gen. Virol; 1988; 69, 2575-2583.

12. Raimondo G, Campo S, Smedile V, Rodino G, SardoMA, et al. Hepatitis B virus variant, with a deletion in the PreS2 and two translational stop codon in the Precore regions, in apatient with hepatocellular carcinoma. J Hepatol; 1991.13, 74-77.

13. Takhashi K, AkahaneY, Hino K, Ohta Y, Nishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in circulation of heptocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. Arch Viro; 1998; 143, 2313-26.

14. Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Mutation within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. Jornal of medical virology; 2003; 71, 18-23.

15. Raimondo G, Costantino L, Caccamo G, Pollicino T, Giovanni S, et al.Non-sequencing molecular approaches to identify preS2-defective hepatitis B virus variants proved to be associated with severe liver diseases. J Hepatol; 2004; 40, 515-519.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, et al. influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. Journal of Medical Virology; 2003; 70, 537-544.

17. Bing FC, Chun J L, Guey MJ, Pei JC, Jia HK and Ding SC. High Prevalence and Mapping of Pre-S Deletion in Hepatitis B Virus Carriers With Progressive Liver Diseases. Gastroenterology; 2006; 130, 1153-1168.

18. Fernholz D, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H. Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. J Hepatol; 1991; 13; S102-4.

19. Fan YF, Lu CC, Chang YC et al. Identification of a pre-S2 mutant in hepatocytes expressing a novel marginal pattern of surface antigen inadvanced diseases of chronic hepatitis B virus infection. J GastroenterolHepatol. 2000; 15, 519–28.

20. Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, Lei HY, Shiau AL, Su IJ. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. Hepatology. 2001; 33, 277-86.

21. F.V. Chisari, K. Klopchin, T. Moiyama, C. Pasquinelli, H.A. Dunsford, S. Sell , et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. Cell; 1989; 59, 1145–1156.

22.Foo N.C, Ahn B.Y, X. Ma, W. Hyun and T.S.B. Yen. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. Hepatology; 2002;.36, 1400–1407.

23. Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, et al. PreS mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. Carcinogenesis; 2004; 25, 2023-2032.

Archive of SID

www.SID.ir