

IFN- γ -ийн дохио дамжилтад оролцдог зохицуулагч уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг судалсан дүн

Балжинням Т.^{1,2}, Хулан Ө.², Эрхэмбаяр Ш.², Баасансүрэн Э.², Жаавхлан Б.², Батхишиг М.², Энхсайхан Л.², Өлзийсайхан Ж.², Байгалмаа Б.², Галиндэв Б.², Цэвэлмаа Н.², Хонгорзул Б.², Содномцогт Л.², Мөнхбат Б.², Мөнхтүвшин Н.¹, Билэгтсайхан Ц.^{1,2}

¹Т.Шагдарсүрэнгийн нэрэмжит Анагаах ухааны хүрээлэн

²Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль

E-mail: bilegtsaikhan@mnums.edu.mn

Abstract

Study on influence of the CpG DNA on activation of IFN- γ signaling transduction regulatory proteins

Baljinnyam T.^{1,2}, Khulan U.², Erkhembayar Sh.², Baasansuren E.², Javkhlan B.², Batkhishig M.², Enkhsaikhan L.², Ulziisaikhan J.², Baigalmaa B.², Galindev B.², Tsevelmaa N.², Khongorzul B.², Sodnomtsogt L.², Munkhbat B.², Munkhtuvshin N.¹, Bilegtsaikhan Ts.^{1,2}

¹Institute of Medical Sciences named after Shagdarsuren T.

²Mongolian National University of Medical Sciences

E-mail: bilegtsaikhan@mnums.edu.mn

Introduction

When human body encounters external pathogens primary/innate immunity cells are activated by recognizing them and secondary/adaptive immunity is activated consecutively. In our previous study, we revealed that there is a synergistic action between TLR9 and IFN- γ signaling in the endothelial cells.

Purpose

To determine the role of negative and positive regulator proteins on the IFN- γ /TLR9 signaling pathway.

Methods

In this study, murine endothelial cell (END-D) culture was used. END-D cells pre-treated with TLR9 ligand CpG DNA and then stimulated with IFN- γ . The negative (SHP-2, SOCS1, PIAS1) and positive (p38) regulator protein expression was detected by Western blotting.

Results and Conclusion

Treatment by TLR9 ligand CpG DNA and IFN- γ increased positive regulator p38 phosphorylation in 0.5 hour. CpG DNA inhibited IFN- γ negative regulator PIAS1 protein expression in 6 hour and SOCS1 and SHP-2 expression could not affect in 4 hour.

Keyword: CPG ДНХ, IFN- γ , p38, PIAS1, SOCS1, SHP2

Рр. 10-13, Figures 4, References 13

Оршил

Халдварын эсрэг анхдагч болон хоёрдогч дархлааны хариу урвалыг амжилттай удирдсанаар халдварт өвчнийг анагаах, халдварын шалтгаант архаг өвчлөлөөс сэргийлэх, эмчлэх шинэ эм, шинэ эмчилгээний технологийг боловсруулах бололцоотой юм. Анхдагч болон өвөрмөц дархлаа тогтолцооны гол молекул болох интерферон гамма (IFN- γ) нь дархлааны үндсэн эсүүдээс ялгарч халдварын эсрэг хүчтэй урвалыг өрнүүлдэг [4]. Нөгөө талаас анхдагч дархлааны Toll Like Receptor 9 (TLR9) нь бактери,

вирус, эукариот биетийн доторхи метилжээгүй цитозин фосфогуанины давтагдсан ДНХ-ийн дараалалыг (CpG ДНХ) таньснаар дархлааны урьтал цитокин болон 1-р хэвшинжийн IFN-ны нийлэгжлийг өдөөж дархлааны урвалыг эхлүүлж байжээ [7]. Сүүлийн жилүүдэд аливаа өвчний эмгэг жамд нөлөөлөх дархлааны урвалууд, тэдгээрийн харилцан үйлчлэлийг судалгаа ихээхэн анхаарал татах болов. Бидний өмнөх судалгаагаар IFN- γ -аар өдөөгдөх дархлааны урвалын эцсийн бүтээгдэхүүн азотын дан исэлийн (NO) нийлэгжлийг TLR9-ийн лиганд CpG

ДНХ нь тун болон хугацаа хамааралтай нэмэгдүүлж байсан юм [1]. NO багажнтэй, хагас задралын хугацаа богино боловч эсийн дотор хялбар нэвтэрч эсийн дотор дохио дамжилтын молекулуудыг идэвхжүүлэх, үрэвслийн урвал, эсийн апоптоз (үйлт үхэл)-ийг өдөөх, судас тэлэх, мэдрэлийн эсийн сэрэл дамжилт, халдвар, хавдрын эсрэг урвалд тус тус оролцдог болох нь тогтоогдоод байна [2]. Энэхүү TLR9-ийн үйлчлэл нь NO төдийгүй, NO нийлэгжүүлэгч iNOS уураг, iNOS уургийн мРНХ-ийн түвшинг нэмэгдүүлж мөн IFN-γ-ийн дохио дамжилтын молекул болох STAT1 (англи: Signal transducer and activator of transcription 1, монгол: хуулбарлалтын дохио өдөөгч, идэвхжүүлэгч 1) уургийн идэвхжлийн түвшинд нөлөөлж байв. IFN-γ-аар өдөөхөд STAT1 уургийн амин хүчлийн дараалалын 727 ба 701 байрлал дахь серин болон тирозины бүлэг фосфоржсноор бүрэн идэвхжиж дохио дамжилт нь өрнөдөг [5]. Бидний судалгаагаар TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ нь IFN-γ-ийн дохио дамжилтын молекул болох S727-STAT1 болон Y701-STAT1 уургийг ихэсгэж байсан боловч IFN-γ-ийн рецепторын нийлэгжилд нөлөө байсан юм [1]. Энэхүү харилцан үйлчлэл нь IFN-γ-ын дохио дамжилтын молекул болох STAT1-тэй холбоотой байлаа. Цаашид IFN-γ-ийн дохио дамжилтын зам дахь зохицуулагч уургуудын идэвхжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлох нь TLR9 болон IFN-γ харилцан үйлчлэлийг нөхцөлдүүлэгч гол уургийг илрүүлэх улмаар IFN-γ-аар өдөөгдөх NO-ээр нөхцөлдөх дархлааны урвалыг зохицуулах, шинэ эм бүтээх, эмчилгээний практикт онолын суурь болох ач холбогдолтой юмаа. Бид энэ удаагийн цуврал судалгаагаараа IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг эерэг болон сөрөг зохицуулагч уургуудын нийлэгжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг илрүүлж, энэхүү харилцан үйлчлэлийг нөхцөлдүүлэгч гол уургийг хайх зорилго дэвшүүлсэн юм.

Зорилго

IFN-γ дохио дамжилтын эерэг болон сөрөг зохицуулагч уургуудын идэвхжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлох.

Зорилт:

- IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг сөргөөр зохицуулагч SOCS1, SHP-2, PIAS1 уургийн нийлэгжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлох
- IFN-γ-ийн дохио дамжилтын эерэгээр зохицуулагч p38 уургийн фосфоржилтонд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлох

Материал

Урвалж

PerproTech (Rocky Hill, NJ)-ийн бүтээгдэхүүн хулганы рекомбинант интерферон гамма, Invivogen (San

Diego, CA)-ийн бүтээгдэхүүн TLR9-ийн лиганд CpG ODN1826, анхдагч эсрэгбие Cell signaling technology (USA), хоёрдогч эсрэг биеийг Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (USA) хэрэглэсэн. Эсийн өсгөвөр: АШУУИС-ийн Шинжлэх ухаан технологийн төвийн Цөм лабораторид хадгалагдаж байгаа хулганы аортын шугаман дотор хөхөлж эсийг ашиглав.

Арга зүй

Эсийн өсгөвөр

Туршилт судалгаанд ашигласан шугаман эс нь хулганын аортын дотор хөхөлж эс бөгөөд эсийн гадаргуудаа судасны эс наалдуулах молекул-1 (vascular cell adhesion molecule-1 VCAM-1) болон эсийн доторх эс наалдуулах молекул (intracellular cell adhesion molecule-1 ICAM-1)-ыг тус тус илчилдэг. Дотор хөхөлжийн шугаман эсийг тугалын хээлийн идэвхгүйжүүлсэн 5%-ийн ийлдэс (FCS), антибиотикийн холимог (penicillin G, streptomycin, amphotericin B) агуулсан DMEM орчин, CO₂-ийн 5%-ийн чийгшилтэй 37°C хэмийн орчинд өсгөвөрлөв.

Уургийн илрэлийг тодорхойлох иммуноблотинг шинжилгээ (Western Blot)

Дотор хөхөлж эсээс уургийг протеаза ба фосфотаза дарангуйлагчтай задлагч уусмалын тусламжтай 40C-д ялган авсан. Уургийн концентрацийг Бицинхонины хүчлийн сорил (BCA)-оор тодорхойлж, ижил концентрацитай уургуудыг гельд гүйлгэж хүндийн жингээр нь ялгаж тодорхойлсон. Гель дээрх уургуудыг цахилгаан хүчдэлийн тусламжтайгаар нитроцеллюлоз мембран дээр шилжүүлж, мембраныг холбогдох өвөрмөц анхдагч эсрэгбиеэр 24 цаг үйлчилсэн. Үүссэн дархан бүрдэл дээр тунхуу (horseradish)-ны пероксидастай зүймэл, хоёрдогч эсрэгбие нэмж 2 цаг болгоод угаасны дараа хүчжүүлсэн хемилюминесцент субстрат (өгөш) нэмж толбо үүсгэв. Үүссэн толбыг Image Lab5 системийн анализатор ашиглан тодруулж харсан. Дотоод хяналтанд β-актин эсрэгбие ашигласан болно. Үр дүнг дотоод хяналттай харьцуулан, imageJ программын тусламжтай тоон үзүүлэлтээр дүгнэлээ.

Үр дүн

SOCS1 уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

IFN-γ-ийн дохио дамжилтын молекул STAT1 уургийн 701-р байрлал дахь тирозины фосфоржилтыг (pY701-STAT1) сөргөөр зохицуулагч SOCS1 (англи: Suppressor of cytokine signaling 1, монгол: эсийн охийн дохио дарагч 1) уургийн идэвхжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эс тайван үед SOCS1 уургийн суурь идэвхжил ажиглагдаж байсан. CpG ДНХ-ээр үйлчилсэн бүлэгт SOCS1 уургийн илрэлийг

ихэсгэж чадсан. Харин CpG ДНХ ба IFN-γ-аар хамт үйлчилсэн бүлэгт IFN-γ дангаараа үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулахад SOCS1 уургийн экспресс тодорхой ялгаа ажиглагдаагүй (Figure 1).

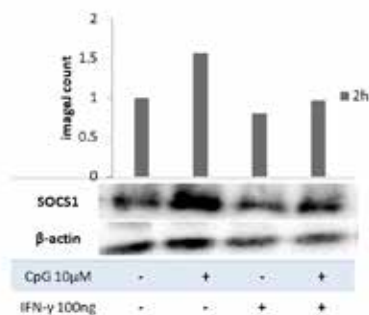


Figure 1. Evaluation of SOCS1 protein activation by immunoblot assay

p38 уургийн фосфоржилтонд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

IFN-γ-ийн дохио дамжилтын pS727-STAT1 уургийн фосфоржилтыг эерэгээр зохицуулагч p38 уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг иммуноблоттингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эс тайван үед p38 уураг фосфоржоогүй. Харин CpG ДНХ болон IFN-γ-аар дангаар нь үйлчилсэн бүлэгт p38 уургийн фосфоржилт үүссэн бөгөөд CpG ДНХ ба IFN-γ-аар хамт үйлчилсэн бүлэгт p38 уургийн фосфоржилт эрс нэмэгдсэн (Figure 2).

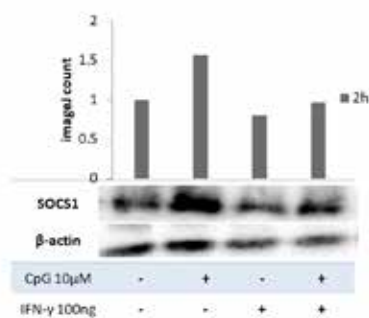


Figure 2. Evaluation of p38 protein phosphorylation by immunoblot assay

Сөрөг зохицуулагч SHP-2 уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

IFN-γ-ийн дохио дамжилтын молекул STAT1 уургийн фосфоржилтыг сөргөөр зохицуулагч SHP-2 тирозино фосфатаза уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг иммуноблоттингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эс тайван үед SHP-2 уургийн суурь идэвхжил ажиглагддаг. Харин CpG ДНХ болон IFN-γ-аар дангаар нь үйлчилсэн бүлэгт SHP-2 уургийн нийлэгжил нэмэгдэж байсан бол CpG ДНХ ба IFN-γ-аар хамт үйлчилсэн бүлэгт CpG болон IFN-γ

дангаараа үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулахад SHP-2 уургийн нийлэгжил тодорхой ялгаа тод ажиглагдаагүй (Figure 3).

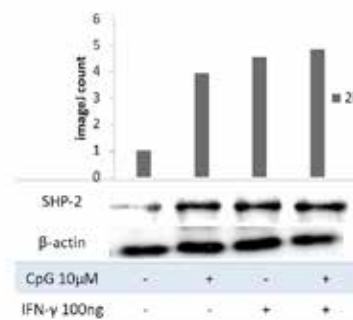


Figure 3. Evaluation of SHP-2 protein activation by immunoblot assay

IFN-γ-аар өдөөгдөх генийн идэвхжлийг сөрөг зохицуулагч PIAS1 уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

IFN-γ-аар бүрэн идэвхжсэн STAT1 уургийг генийн бай дараалалтай холбогдсоны дараа PIAS1 уураг идэвхжин STAT1-ийг ДНХ-ээс салгах замаар сөрөг зохицуулгад оролцдог бөгөөд энэхүү үйлчлэлд CpG ДНХ-ийн нөлөөг судалсан. Иммуноблоттинг шинжилгээний дүнгээс үзэхэд эс тайван үед PIAS1 уураг илэрдэггүй. CpG ДНХ дангаар PIAS1 уургийн илрэлийг ихэсгэж байсан бол IFN-γ-аар дангаар нь өдөөсөн бүлэгт PIAS1 уургийн нийлэгжил эрс нэмэгдэж байв. Харин сонирхолтой нь IFN-γ болон CpG ДНХ-ээр хамт үйлчилсэн бүлэгийг дан IFN-γ-аар үйлчилсэн бүлэгтэй харьцуулахад PIAS1 уургийн нийлэгжил эрс буурч байлаа (Figure 4).

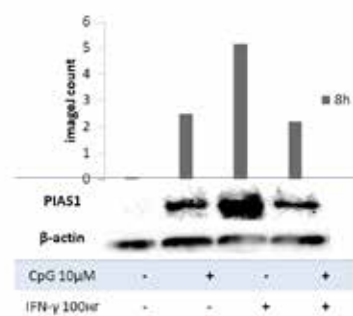


Figure 4. Evaluation of PIAS1 protein expression by immunoblot assay.

Хэлцэмж

Toll like receptor (TLR) болон IFN-γ дохио дамжилт хоорондын синергист харилцан үйлчлэлийг хэд хэдэн шугаман эсийн загвар дээр тодорхойлсон байна. Ц.Билэгтсайхан нарын (2013) TLR2, TLR4-ийн лигандуудыг ашиглан IFN-γ-ийн дохио дамжилтад үзүүлэх нөлөөг тодорхойлсон бөгөөд

эдгээр лигандууд нь IFN-γ-аар өдөөгдсөн азотын дан ислийн гарц, iNOS уургийн экспрессийн түвшинд ихэсгэж байжээ [11]. TLR2 нь p-S727 STAT1-ийн фосфоржуулагч p38 уургийн илрэлийг өдөөж улмаар IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг дэмжиж байна [9]. Бидний судалгаанд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ нь p38 уургийн фосфоржилтыг нэмэгдүүлж байсан бөгөөд ингэснээр S727 STAT1-ийг идэвхжүүлэх замаар IFN-γ-ийн дохио дамжилтанд эерэг нөлөө үзүүлдэг юм. Наоки, Койдэ нарын судалгаанд дотор хөхөлж эсэд интерферон гаммагаар үйлчлэхэд өдөөгдсөн азотын дан ислийн гарцыг TLR4-ийн лиганд липополисахарид (LPS) нэмэгдүүлж байжээ [13]. Энэ судалгаанд p38 нь MAPKs (англи: mitogen-activated protein kinases, монгол: митогенээр идэвхжсэн протейнкеназууд) хамааралт IRF1 (англи: Interferon regulatory factor 1, монгол: интерферон зохицуулгын фактор 1) ихэссэнээр NO-ийн гарцыг нэмэгдүүлж байгааг тодорхойлсон байна [12]. Цаашид бид IRF1-ийг уургийн түвшинд бататгах шаардлага урган гарч байна. CpG ДНХ болон IFN-γ-аар макрофаг эсийг давхар үйлчлэхэд STAT1 уургийн p-S701 STAT1 болон p-S727 STAT1 фосфоржилтыг ихэсгэж байсан бөгөөд бидний өмнөх судалгаагаар энэхүү үр дүнг дотор хөхөлж эс дээр баталсан билээ [3]. TLR9 лиганд болон IFN-γ-аар өдөөгдөх p-S727 STAT1 болон p-S701 STAT1-ийн илрэлийг тодорхойлоход 2-4 цаг дээр хамгийн өндөр идэвх үзүүлж байсан бол 8-с дээш цаг дээр идэвхи нь буурч байсан учраас цаг хойшлоход ач холбогдол нь багасах хандлагатай байлаа. IFN-γ-аар идэвхжиж байгаа Y701 STAT1-ийн фосфоржилтонд SOCS1 хамгийн өндөр дарангуйлах нөлөө үзүүлж байсан бөгөөд SOCS1 уургийн үйл ажиллагааны алдагдал болон хувьсамжийн үед IFN-γ-ийн дохио дамжилт нэмэгдэн эмгэг төрөгчийн эсрэг дархлааны хариу урвал ихэсдэг байна [8, 10]. Qin.L ба Tamiya нарын туршилтын дүнд илэрсэн нөлөө бидний туршилтаар батлагдаагүй боловч хугацаа хамааралт нөлөөний судалгаагаар цаашид гүнзгийрүүлэх шаардлагатай байгаа юм. PIAS1 болон SHP-2 уургууд IFN-γ-ийн дохио дамжилтанд хязгаарлах нөлөөтэй нь тодорхойлогдсон боловч TLR9-тэй холбоотой мэдээлэл хомс байгаа нь цааш судлах боломж байгааг харуулж байна [6]. Дотор хөхөлж эсийн TLR9 нь судасны хатуурал болон үрэвслийн аль алинд чухал үүрэг гүйцэтгэдэг оролцдог бөгөөд зүрх судасны өвчний эмчилгээний шинэ бай болох боломжтой нь нэгэнт тогтоогдсон билээ [8]. Хүний биеийн нийт TLR бус зөвхөн дотор хөхөлж эсийн TLR-ийн үйл ажиллагааг голлож саатуулах эсвэл зохицуулах эмчилгээний шинэ стратеги нь илүү эрсдэлгүй байж болох юм.

Дүгнэлт

1. TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ нь SOCS1, SHP-2 уургийн идэвхжилд нөлөөлөөгүй бол PIAS1 уургийн нийлэгжлийг бууруулж IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг нэмэгдүүлж байна.
2. TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ p38 уургийн фосфоржилтыг нэмэгдүүлсэнээр p-S727 STAT1 уургийн идэвхжлийг эерэгээр зохицуулж IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг нэмэгдүүлж байна.

Ном зүй

1. Билэгтсайхан Ц., нар., Интерферон гаммагаар өдөөгдөх STAT1 /IRF1/iNOS дохио дамжилтанд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлох нь. Innovation.; Vol.12, №4: 8-12. (2017)
2. Banuls, C., et al., «The pivotal role of nitric oxide: effects on the nervous and immune systems.» Curr Pharm Des 20(29): 4679-4689. (2014)
3. Buhe, V., et al., «Development of a Murine model to dissect the CpG-oligonucleotide-enhancement of the killing of human B Cells by rituximab.» J Autoimmun 34(2): 136-144. (2010).
4. Dalpke, A. H., et al., «Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling.» Eur J Immunol 33(7): 1776-1787. (2003).
5. Lin, A. A., et al., «Gamma interferon signaling in macrophage lineage cells regulates central nervous system inflammation and chemokine production.» J Virol 83(17): 8604-8615. (2009).
6. Liu, B., et al., «PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity.» Nat Immunol 5(9): 891-898. (2004).
7. Ohto, U., et al., «Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9.» Nature 520(7549): 702-705. (2015).
8. Qin, L., et al., «SOCS1 prevents graft arteriosclerosis by preserving endothelial cell function.» J Am Coll Cardiol 63(1): 21-29. (2014).
9. Takaiji, R., et al., «CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors.» J Leukoc Biol 72(5): 1011-1019. (2002).
10. Tamiya, T., et al., «Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3.» Arterioscler Thromb Vasc Biol 31(5): 980-985. (2011).
11. Tsolmogyn, B., et al., «A Toll-like receptor 2 ligand, Pam3CSK4, augments interferon-gamma-induced nitric oxide production via a physical association between MyD88 and interferon-gamma receptor in vascular endothelial cells.» Immunology 140(3): 352-361. (2013).
12. Utasincharen, P., et al., «CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7).» Clin Exp Immunol 128(3): 467-473. (2002).
13. Yoo, B. K., et al., «Activation of p38 MAPK induced peroxynitrite generation in LPS plus IFN-gamma-stimulated rat primary astrocytes via activation of iNOS and NADPH oxidase.» Neurochem Int 52(6): 1188-1197. (2008).

Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:

*Монголын Анагаах ухааны академийн гишүүн,
Биологийн ухааны доктор,
Профессор И.Пүрэвдорж*