

**TLR7-ийн лиганд болон IFN-γ-ийн дохио дамжилтын
хоорондын харилцан үйлчлэлд сөрөг зохицуулагч молекулын
нөлөөг тодорхойлох нь**

Э.Баасансүрэн¹, Т.Балжинням^{1,2}, Б.Жавхлан^{1,4}, Ө.Хулан¹, М.Батхишиг¹, Л.Энхсайхан¹,
Ж.Өлзийсайхан¹, Б.Байгалмаа⁴, Н.Цэвэлмаа⁴, Б.Галиндэв⁴, Б.Хонгорзул⁴, Л.Содномцогт⁴,
Д.Нямбаяр⁴, Ж.Жамбалдорж^{3,4}, П.Эрхэмбулган², Г.Батбаатар¹, Б.Мөнхбат⁴,
Н.Мөнхтүвшин², Ц.Билэгтсайхан^{2,4}

¹Бичил амь-Дархлаа судлалын тэнхим, БАС, АШУҮИС

²Эрдэм ШинжилгээнийТөв Лаборатори, АУХ, ³Молекул Биологи, Удамзүйн тэнхим, БАС,
АШУҮИ, ⁴Цөм лаборатори, ШинжлэхУхаан Технологийн Газар, АШУҮИС

bilegsaikhan@mnums.edu.mn

Удиртгал

Хүний бие организм гадаад орчны бактер, вирус мөөгөнцөр зэрэг бичил организмтай тулгарахад анхдагч буюу өвөрмөц бус, хоёрдогч буюу дасан зохицолын дархлааны хариу урвалуудыг ээлж дараалан идэвхжүүлдэг. Анхдагч дархлааны хариу урвалд захын цусан дахь дархлалын эсүүд (макрофаг, моноцит г.м) оролцож гадны бичил организмийг устгахын зэрэгцээ хоёрдогч урвалыг эхлүүлэх охь бодисуудыг ялгаруулснаар дархлалын үндсэн эсүүдийг (Т, В лимфоцит) сэрээдэг. Дархлалын эсийн гадаргуу дээрх TLR нь бичил организмийг таньж холбогдсоноор анхдагч дархлааны урвалыг эхлүүлдэг TLR7 (Toll Like Receptor 7) нь вируст өргөн тохиолдох ба TLR7 харилцан үйлчлэлцэж үрэвслийн урьдал цитокиныг ялгаруулдаг. TLR7 нь поли-уридин (poly-U) болон гуанизины комплекс бүтэцтэй юм. Дан утаслагт PHX (single-stranded RNA), imidazoquinoline, loxobrine, bropirimine зэрэг жижиг синтетик бүрдэл нь TLR7-ийн өвөрмөц лиганд юм [1]. IFN-γ олон төрлийн вирусын генийн репликацийг дарангуйлах эсвэл саатуулахаас гадна моноклеар моноцит эсийг идэвхжүүлэх, В эсээс иммуноглобулин үүсэхийг өдөөх, Th2 эсийн ялгаран хөгжлийг саатуулах зэрэг дархлааны урвалыг зохицуулахад чухал үүрэг гүйцэтгэнэ. Интерфероны дохио дамжуулах механизм ихэнхдээ JAK-STAT-ын замаар дамждаг бөгөөд үүнд 50-аас дээш тооны цитокинүүд, өсөлтийн хүчин зүйл, ген зохицуулганд нөлөөлдөг

даавар оролцдог[2]. JAK-STAT дохио дамжилтын механизм нь шууд хэд хэдэн дараалсан үе шатуудаас хамааралтай байдаг. Дархлаа тогтолцооны хариу урвалд эерэг болон сөрөг зохицуулагч молекулууд тэнцвэртэй байдлыг хадгалах нь маш чухал. Бид өмнөх судалгаагаар TLR7 болон IFN-γ-ийн систем нь өөр хоорондоо синергист холбоотой болохыг тодорхойлсон. Харин энэ удаагийн судалгаагаар бид энэхүү TLR7 болон IFN-γ-ийн дохио дамжилтын хоорондын харилцан хамааралд эерэг болон сөрөг зохицуулагч уургийн нөлөөг тодорхойлохыг зорьсон.

Судалгааны зорилго

Эндотель эсэд IFN-γ-ийн дохио дамжилтаар идэвхижиж байгаа сөрөг зохицуулагч уургуудад имиквимодийн нөлөөг тодорхойлох

Зорилтууд

1. IFN-γ-аар өдөөгдөх сөрөг зохицуулагч уураг SOCS1-ийн идэвхжилд имиквимодийн нөлөөг уургийн түвшинд тодорхойлох

2. IFN-γ-аар өдөөгдөх сөрөг зохицуулагч уураг SHP2-ийн идэвхжилд имиквимодийн нөлөөг уургийн түвшинд тодорхойлох

Судалгааны аргачлал

Эсийн өсгөвөр: Эндотель (END-D) шугаман эсийг идэвхгүйжүүлсэн 10%-ийн үхрийн хээлийн ийлдэс (FCS), 1%-ийн

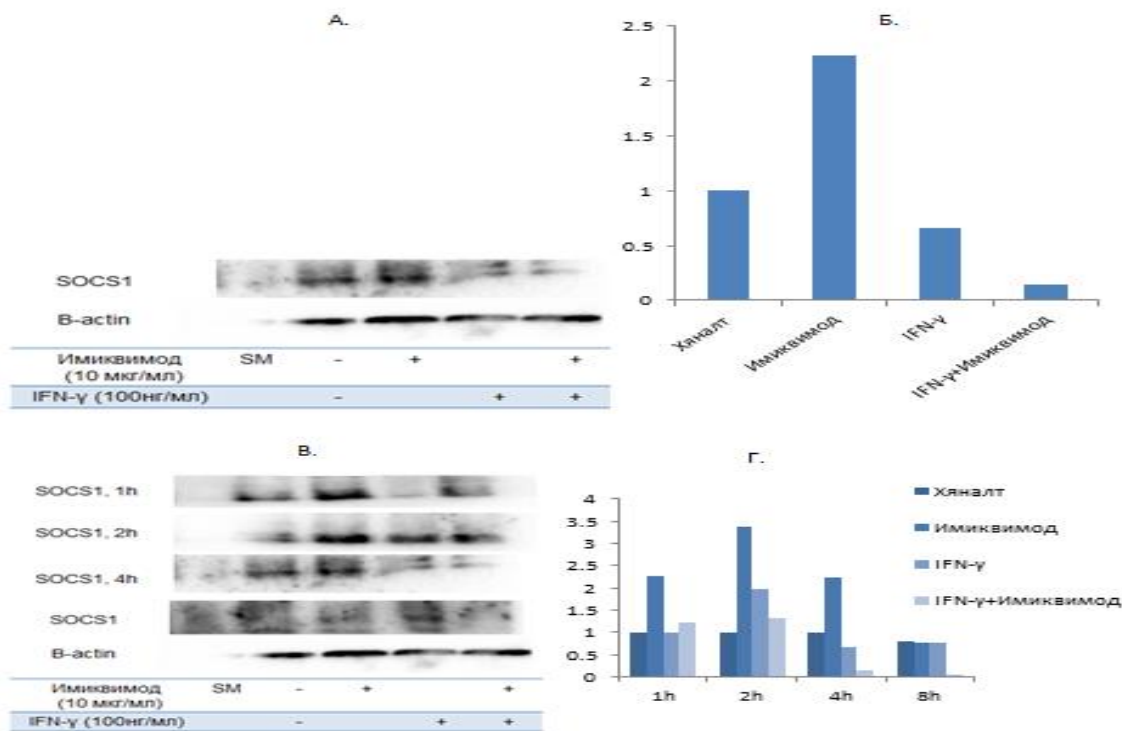
антибиотикийн холимог (penicillin G, streptomycin) агуулсан тэжээлт орчинд (DMEM) 5% CO₂-ийн чийгшилтэй 37°C хэмд өсгөвөрлөв.

Иммуноблотингийн арга

Эсээс уургийг ялгахдаа протеаза ферментийн ингибитор агуулсан задлагч уусмал хэрэглэдэг. Ялган авсан уургийн концентрацийг Pierce BCA protein assay kit ашиглан тодорхойлж, ижил концентрацитай уургуудыг гель-электрофорез явуулж хүндийн жингээр нь ялгана. Гель дээрх уургуудыг цахилгаан хүчдэлийн тусламжтайгаар нитроцеллюлозон мембранлуу шилжүүлэн өвөрмөц анхдагч эсрэгбиеээр будна. β-актины эсрэгбиеийг дотоод хяналтаар хэрэглэсэн. Үүссэн дархан бүрдэл дээр тунхуугийн пероксидаза зүүсэн хоёрдогч эсрэгбиеэр будаж, үүний дараа хемилюминесценци бүхий бодис нэмснээр BioRad ChemDoc багажийг ашиглан тодруулж харна.

Судалгааны үр дүн

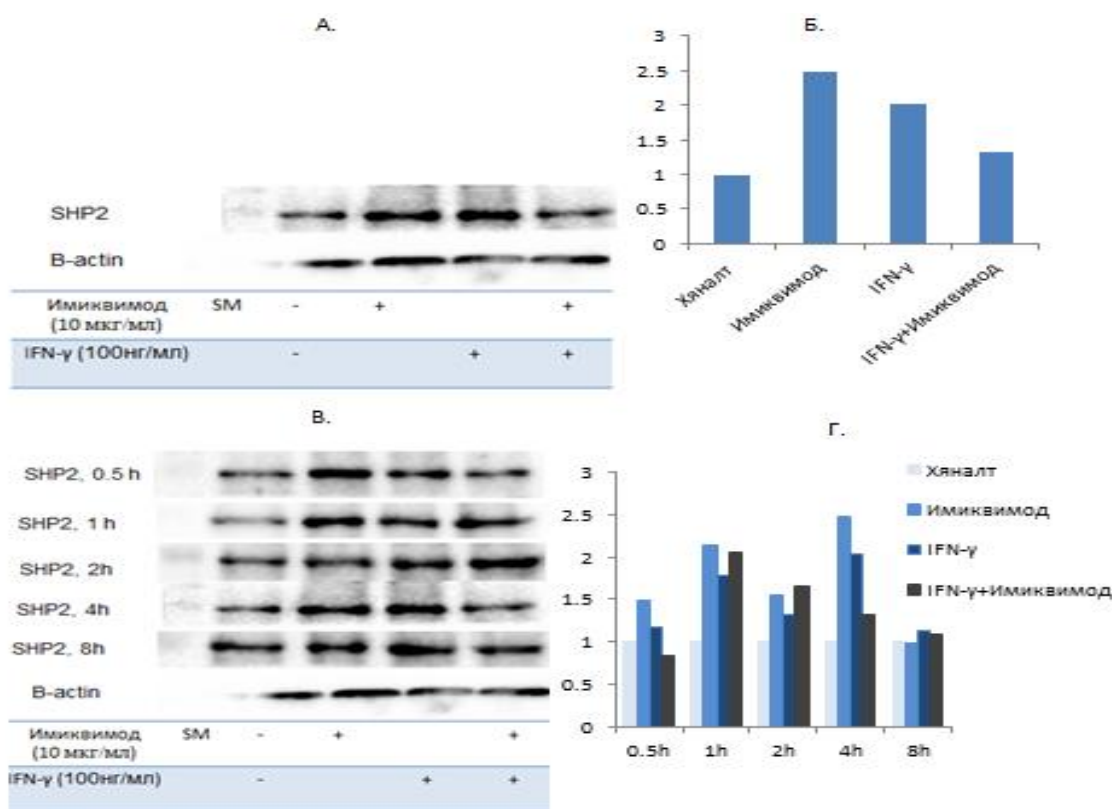
1. Имиквимод болон IFN-γ-ийн идэвхжилд сөрөг зохицуулагч SOCS1 уургийн нөлөөг тодорхойлсон дүн
Эндотель эсэд имиквимод болон IFN-γ-ийн идэвхжилд SOCS1 уургийн идэвхжлийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эндотель эсийг 10 мкг/мл имиквимодоор 1 цаг үйлчилсний дараа 100 нг/мл IFN-γ-аар 1-4 цаг үйлчилж SOCS1 уургийн идэвхжлийг тодорхойлж үнэлсэн. Иммуноблотинг шинжилгээний үр дүнгээс харахад тайван байгаа эсэд суурь идэвхжил ажиглагдаж байсан. Имиквимод болон IFN-γ-г дангаар нь үйлчлэхэд SOCS1 уургийн нийлэгжилт ихэссэн харин имиквимод болон IFN-γ-г хамт үйлчилсэн бүлэгт SOCS1 уургийн нийлэгжилт дарангуйлагдсан байлаа. Эдгээр үр дүнгээс үзэхэд TLR7/IFN-γ-ийн харилцан дэмжих үйлчлэлд у701-STAT1 уургийн фосфоржилтонд сөрөг зохицуулагч SOCS1 уургийг дарангуйлсанаар дохио дамжилтыг нэмэгдүүлэх нөлөөтэй байна



Зураг 1: Имиквимод болон IFN-γ-ийн идэвхжилд сөрөг зохицуулагч SOCS1 уургийн нөлөөлөл. А. Эндотель эсийг 10 мкг/мл имиквимодоор 1 цаг, 100 нг/мл IFN-γ-аар 4 цаг үйлчилж SOCS1 уургийн идэвхжлийг тодорхойлсон. Б. Иммуноблотингийн аргаар гаргасан үр дүнг Image J программ ашиглан боловсруулсан график. В. SOCS1 уургийн хугацаа хамааралтай идэвхжлийг үнэлсэн дүн. Г. SOCS1 уургийн хугацаа хамааралтай идэвхжлийн үр дүнг Image J программ ашиглан боловсруулсан график

2. Имиквимод болон IFN- γ -ийн идэвхжилд сөрөг зохицуулагч SHP2 уургийн нөлөөг тодорхойлсон дүн
Эндотель эсэд имиквимод болон IFN- γ -ийн идэвхжилд SHP2 уургийн идэвхжлийг иммуноблотингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эндотель эсийг 10 мкг/мл имиквимодоор 1 цаг үйлчилсний дараа 100 нг/мл IFN- γ -аар 0.5-8 цаг үйлчилж SHP2 уургийн идэвхжлийг тодорхойлж үнэлсэн. Иммуноблотинг шинжилгээний үр дүнгээс харахад тайван байгаа эсэд суурь идэвхжил

ажиглагдаж байсан. Имиквимод болон IFN- γ -ийг дангаар нь үйлчлэхэд SHP2 уургийн нийлэгжилт ихэссэн харин имиквимод болон IFN- γ -ийг хамт үйлчилсэн бүлэгт SHP2 уургийн нийлэгжилт дарангуйлагдсан байлаа. Эдгээр үр дүнгээс үзэхэд TLR7/IFN- γ -ийн харилцан дэмжих үйлчлэлд у701-STAT1 уургийн фосфоржилтонд сөрөг зохицуулагч SHP2 уургийг дарангуйлсанаар дохио дамжилтыг нэмэгдүүлэх нөлөөтэй байна.



Зураг 2: Имиквимод болон IFN- γ -ийн идэвхжилд сөрөг зохицуулагч SHP2 уургийн нөлөөг тодорхойлсон дүн. А. Эндотель эсийг 10 мкг/мл имиквимодоор 1 цаг, 100 нг/мл IFN- γ -аар 4 цаг үйлчилж SHP2 уургийн идэвхжлийг тодорхойлсон. Б. Иммуноблотингийн аргаар гаргасан үр дүнг Image J программ ашиглан боловсруулсан график. В. SHP2 уургийн хугацаа хамааралтай идэвхжлийг үнэлсэн дүн. Г. SHP2 уургийн хугацаа хамааралтай идэвхжлийн үр дүнг Image J программ ашиглан боловсруулсан график

Хэлцэмж

Бидний өмнөх судалгаагаар эндотель эсэд IFN- γ -аар өдөөгдөх азотын дан ислийн гарцад TLR7 лигандын тун хамааралтайгаар ихэсгэх

нөлөө, IFN- γ -аар өдөөгдөх генийн идэвхжилд (iNOS-ийн мэдээллийн PHX TLR7 лигандын нөлөө, IFN- γ -аар өдөөгдөх уургийн экспрессд (iNOS) TLR7 лигандын нөлөөг тус тус

тодорхойлсон. Бидний судалгаанд хулганы аортын шугаман эс болох эндотель эсийг ашигласан бол дархлааны үндсэн эс болох макрофаг, моноцит эс, түүнчлэн хавдрын эсийг ашигласан судалгааны ажлууд тэмдэглэгдсэн байна. Судалгааны үр дүнгээр эндотель эсэд IFN-γ-аар өдөөгдсөн азотын дан ислийн гарцад имиквимод нь тун хамааралтайгаар ихэсгэх нөлөө, бодит хугацааны полимерадын гинжин урвалаар iNOS-мэдээллийн PHX -г экспрессийг тодорхойлж үзэхэд IFN-γ дангаараа iNOS-мэдээллийн PHX-ийг ихэсгэж байсан ба IFN-γ+Имиквимод-аар үйлчилсэн эсэд iNOS-ийн экспресс 1,5 дахин нэмэгдүүлсэн, иммуноблотингийн аргаар уургийн экспрессийг үнэлэхэд IFN-γ дангаараа iNOS ихэсгэж, IFN-γ+Имиквимод-оор үйлчилсэн эсэд iNOS уургийн экспресс нэмэгдэж байв. IFN-γ-г дангаар нь үйлчлэхэд SOCS1 уургийн нийлэгжилт ихэссэн харин имиквимод болон IFN-γ-ийг хамт үйлчилсэн бүлэгт SOCS1 уургийн нийлэгжилт дарангуйлагдсан байлаа. Эдгээр үр дүнгээс үзэхэд TLR7/IFN-γ-ийн харилцан дэмжих үйлчлэлд у701-STAT1 уургийн фосфоржилтонд сөрөг зохицуулагч SOCS1 уургийг дарангуйлсанаар дохио дамжилтыг нэмэгдүүлэх нөлөөтэй байна.

Nagase болон Caron (хэвлэлийн жагсаалтад оруулах) нарын (2003) судалгаагаар эозинофиль эсийг IFN-γ-аар үйлчлэхэд TLR7-ийн мPHX-ийн экспресс 10 дахин нэмэгдсэн үр дүн гарсан байсан мөн CD4⁺ Т эс дээр TLR7-ийн лиганд нь IFN-γ-ийн нийлэгжлийг өдөөж байсан нь бидний судалгааны ажилтай бүрэн нийцэж байлаа.

Билэгтсайхан (хэвлэлийн жагсаалтад оруулах) нарын (2012) судалгаанд азотын дан исэл ихэсгэж байгаа механизм нь MyD88 уураг IFN-γ рецептор хоёрын физик хамаарал мөн p38 хамааралт STAT1-ийн 727 дахь сериний фосфоржилтийг нэмэгдүүлж интерферон гаммагийн дохио

дамжилтийг ихэсгэсэн. Интерферон гаммагаар өдөөгдсөн iNOS уураг, iNOS mRNA-ийн экспресс Pam3CSK4-өөр ихсэж байна.

Chun-Feng (хэвлэлийн жагсаалтад оруулах) нарын (2018) судалгаанд TLR7 нь SOCS1 болон SOCS3-ийг нийлэгжлийг өдөөдөг. SOCS1 болон SOCS3 нь TLR7-оор идэвхжиж байгаа нэгдүгээр хэв шинжийн интерфероны нийлэгжлийг дарангуйлдаг. Энэ механизм нь TLR7-ийн дохио дамжилтын молекул болох IRF7-тэй холбогдож гэсэн үр дүнтэй дүйцэж байна[3].

Carlota Recio нарын (2014) судалгаагаар чихрийн шижинтэй хулгана дах SOCS1 уураг нь дарангуйлах нөлөөтэй болохыг баталсан нь бидний судалгааны үр дүнтэй дүйцэж байна[4].

Дүгнэлт:

1. IFN-γ-ийн дохио дамжилтийн у701-STAT1 уургийн фосфоржилтонд имиквимод нь сөрөг зохицуулагч SOCS1 уургийг дарангуйлсанаар дохио дамжилтыг нэмэгдүүлэх нөлөөтэй байна.

2. IFN-γ-ийн дохио дамжилтанд имиквимод нь сөрөг зохицуулагч SHP2 уургийг дарангуйлсанаар дохио дамжилтыг нэмэгдүүлэх нөлөөтэй байна.

Ном зүй

1. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*. Feb 2006;7(2):131-137.

2. Subramaniam PS, Torres BA, Johnson HM. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine*. Aug 21 2001;15(4):175-187.

3. Yu CF, Peng WM, Schlee M, et al. SOCS1 and SOCS3 Target IRF7 Degradation To Suppress TLR7-Mediated Type I IFN Production of Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Journal of*

immunology. Jun 15 2018;200(12):4024-4035.

4. Tsolmongyn B, Koide N, Jambalgaaniin U, 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*. Nov 2013;140(3):352-361.

5. Recio C, Oguiza A, Lazaro I, Mallavia B, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Sep 2014;34(9):1953-1960.

Role of negative regulators on the TLR7 ligand/IFN- γ signaling in the endothelial cells

E.Baasansuren^{1,2}, B.Javkhlan^{1,2}, T.Baljinnyam^{2,3}, U.Khulan², M.Batkhisig², L.Enkhsaikhan², J.Ulziisaikhan², B.Khongorzul¹, B.Baigalmaa¹, B.Galindev¹, N.Tsevelmaa¹, L.Sodnomtsogt¹, D.Nyambayar¹, N.Munkhtuvshin³, B.Munkhbat¹, Ts.Bilegtsaikhan¹

¹Core Laboratory, Science Technology Center, MNUMS

²Department of Microbiology and Immunology, SBS, MNUMS

³Central Scientific Research Laboratory, Institute of Medical Sciences, Mongolia

bilegtsaikhan@mnums.edu.mn

Introduction

Toll like receptors (TLRs) are a class of proteins that key role in the innate immune system. The SOCS1 and SHP2 proteins are negative-feed loop inhibitors of signaling of JAK/STAT and TLRs pathways.

Purpose

To determine negative regulator protein activation which is activated through TLR7 ligand/IFN- γ signal transduction in endothelial cells.

Methods

We used mouse aortic linear endothelial cell (END-D); protein expression was detected by western blotting

Results

We analyzed a time dependent stimulation effects of negative regulator proteins stimulated by TLR7 ligand/IFN- γ in endothelial cell cultures. Imiquimod of 10

$\mu\text{g/ml}$ treatment of 1 hr was followed by 100 ng/ml IFN- γ stimulation for 1-8hr to analysis of negative regulator SOCS1 and SHP2 protein expression.

In untreated cells, there was low activations of negative regulator SOCS1 and SHP2 proteins. IFN- γ stimulation alone had increased SOCS1 and SHP2 protein expressions, also imiquimod treatment highly elevated SOCS1 and SHP2 expressions. However imiquimod and IFN- γ doubled treatment have decreased activation of negative regulator SOCS1 and SHP2 proteins. These findings suggest SOCS1 and SHP2 proteins are inhibitors in the TLR7 ligand/IFN- γ signaling.

Conclusion

Negative regulators, SOCS1 and SHP2 strongly suppressed activations of TLR7 ligand/IFN- γ signaling.

Танилцаж санал өгсөн АУ-ны доктор
Ж.БАЯРМА