

IFN- γ /TLR9-ийн харилцан дэмжих үйлчлэлд зохицуулагч молекулын нөлөө

Т.Балжинням^{1,2}, Ө.Хулан², Ш.Эрхэмбаяр³, Э.Баасансүрэн², Б.Жавхлан², Батхишиг²,
Л.Энхсайхан², Б.Галиндэв², Н.Цэвэлмаа², Б.Байгалмаа², Б.Хонгорзул², Л.Содномцогт²,
Д.Нямбаяр², Г.Батбаатар², Б.Мөнхбат², Н.Мөнхтүвшин¹, Ц.Билэгтсайхан^{1,2}

¹ Эрдэм шинжилгээний төв лаборатори, Анагаах Ухааны Хүрээлэн,

² Анагаахын Шинжлэх Ухааны Үндэсний Их Сургууль, ³ Герантологийн Үндэсний Төв

Үндэслэл

Интерферон гамма (IFN- γ) нь дархлааны үндсэн эсүүдээс ялгардаг дархлааны чухал үүрэгтэй молекул юм. Аливаа өвчний эмгэг жамд нөлөөлөх дархлааны урвалууд, тэдгээрийн харилцан үйлчлэлийг судалснаар олон эмгэгийн үед эзэн биеийн дархлааны урвалд нөлөөлөх замаар шинэ эм, эмчилгээний арга боловсруулахад ач холбогдолтой. Бидний өмнөх судалгаагаар анхдагч дархлааны Toll Like Receptor 9-ийн (TLR9) лиганд болох грам эерэг болон сөрөг бактери, вирус, эсийн доторх шимэгчдэд агуулагдах метилжээгүй цитозин фосфогуанины давтагдсан дараалал бүхий ДНХ-ийн хэсэг (CpG ДНХ) нь IFN- γ -аар өдөөгдөх дархлааны урвалын эцсийн бүтээгдэхүүн азотын дан исэл (NO), түүнийг нийлэгжүүлэгч фермент болох inducible nitric oxide synthase-ын (iNOS) уураг, iNOS уургийн генийн (iNOS мРНХ) түвшинд ихэсгэх нөлөө үзүүлж байсан. Энэ харилцан үйлчлэлийг нь IFN- γ -ийн дохио дамжилтын молекул болох Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) уургийн 727-р байрлал дахь серин (p-S727 STAT1), 701-р байрлал дахь тирозины (p-Y701 STAT1) амин хүчлийн үлдэгдлийн фосфоржилтыг нэмэгдүүлснээр тайлбарлаж болно. CpG ДНХ нь IFN- γ -ийн дохио дамжилтыг дэмжсэнээр олон эмгэгийн тавиланд эерэг болон сөргөөр нөлөөлөх боломжтой. Энэхүү CpG ДНХ нь IFN- γ -ийн идэвхжлийг дэмжих болон дарангуйлах үүрэгтэй зохицуулагч уургууд дахь нөлөөг илрүүлж, гол үүрэгтэй уургийн тодорхойлсноор бактери, вирусийн гаралтай халдварт өвчин, архаг үрэвсэлт эмгэгийн эмчилгээний практикт ашиглах боломж бүрдэх юм.

Зорилго

IFN- γ /TLR9-ийн харилцан дэмжих үйлчлэлд эерэг болон сөрөг зохицуулагч уургуудын идэвхжлийг тодорхойлох

Зорилт

1. IFN- γ -аар идэвхжих p-S701 STAT1 уургийн фосфоржилтыг сөргөөр зохицуулагч SOCS1 уургийн нийлэгжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ын нөлөөг тодорхойлох

2. IFN- γ -аар идэвхжих p-S727 STAT1 уургийн фосфоржилтыг эерэгээр зохицуулагч p38 уургийн фосфоржилтонд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ нөлөөг тодорхойлох

Материал, арга аргачлал

Энэхүү судалгааг лабораторийн туршилт шинжилгээний аргаар АШУҮИС-ийн цөм лабораторид хийж гүйцэтгэсэн. Хулганы аортын шугаман эндотель эсийг (END-D) 5%-ийн үхрийн хээлийн ийлдэс (FCS), 1% антибиотикийн холимог (penicillin G, streptomycin, amphotericin B) агуулсан эсийн орчинд (DMEM medium) орчинд 5% CO₂-ийн чийгшилтэй, 37°C хэмд өсгөвөрлөсөн. Эсийн ургалтыг тогтворжих хүртэл 3-аас дээш сэлгүүлсний дараа эсийг хувааж, Эндотель эсийг 10 мкг/мл CpG ДНХ-ээр 1 цаг үйлчилсний дараа 100 нг/мл IFN- γ -аар үйлчилж, 1, 2, 4, 8 цагийн дараа фосфотаза болон протейза дарангуйлагч агуулсан задлагч уусмалаар эсийг задлан уургийг ялган авсан. Ялгасан дээжээс ВСА (Bicinchoninic acid assay) шинжилгээний аргаар уургийн концентрацийг тодорхойлж антиген өвөрмөц анхдагч, хоёрдогч эсрэг

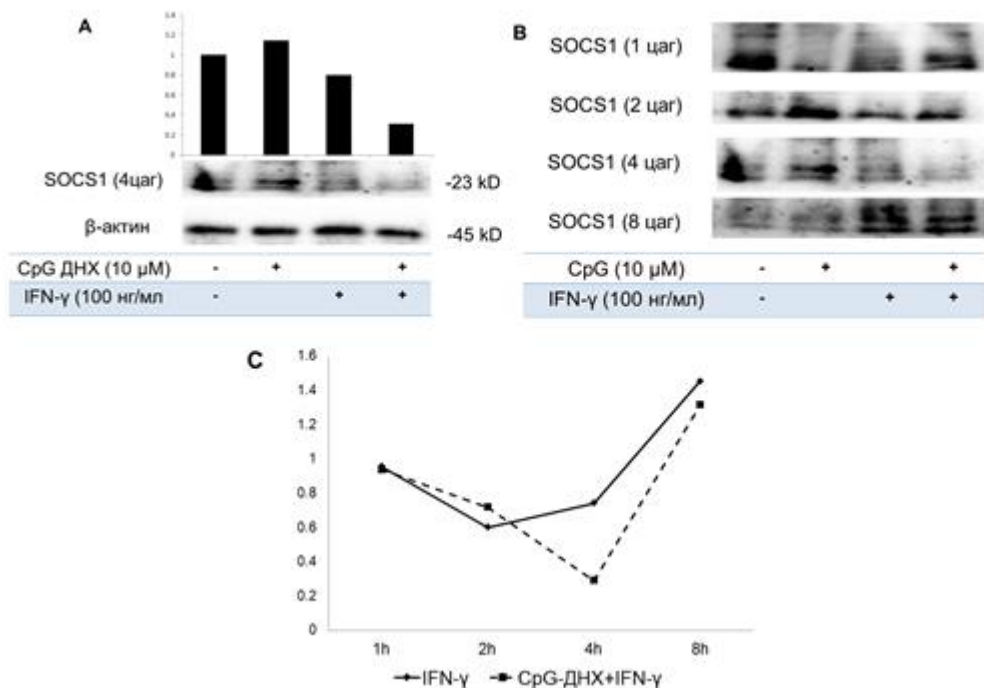
бие ашиглан иммуноблоттингийн шинжилгээг хийсэн. Үр дүнг imageJ програмаар боловсруулсан.

Үр дүн:

1. Сөрөг зохицуулагч SOCS1 уургийн идэвхжилд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

IFN-γ-аар өөрийн рецептортой холбогдсоноор STAT1 уургийн 701-р байрлал дахь тирозиныг фосфоржуулснаар дохио дамжилт эхэлдэг. SOCS1 уураг идэвхжиснээр p-Y701 STAT1 уургийн фосфоржилтыг дарангуйлж IFN-γ-аар идэвхжих дархлааны урвалыг зохицуулдаг. Бид SOCS1 уургийн нийлэгжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг

иммуноблоттингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Иммуноблоттинг шинжилгээний үр дүнгээс эс тайван үед SOCS1 уургийн суурь идэвхжил ажиглагдаж байсан. CpG ДНХ болон IFN-γ-аар үйлчилсэн бүлэгт SOCS1 уургийн экспрессийг ихэсгэж чадсан. Харин CpG ДНХ ба IFN-γ-аар хамт үйлчилсэн бүлэгт SOCS1 уургийн экспресс дан IFN-γ-аар өдөөсөн бүлэгтэй харьцуулахад 4 цагаас эхлэн буурч байсан. (Зураг 1A). Дээрх үр дүнгээс үзэхэд CpG ДНХ нь IFN-γ-аар өдөөгдсөн p-Y701 STAT1 уургийн экспрессийг дарангуйлагч SOCS1 уургийн нийлэгжлийг дарангуйлснаар IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг нэмэгдүүлэх нөлөө үзүүлж байна.



Зураг 1. SOCS1 уургийн идэвхжлийг үнэлсэн иммуноблоттинг шинжилгээний үр дүн: А. Эндотель эсэд SOCS1 уургийн экспрессийн явц. В. Эндотель эсийг CpG ДНХ болон IFN-γ-аар өдөөж SOCS1 уургийн экспрессийг 1, 2, 4, 8 цагуудад тодорхойлсон дүн. С. IFN-γ дангаараа болон CpG ДНХ нэмж үйлчилсэн бүлгүүд дэх SOCS1 уургийн идэвхжлийг харьцуулсан хугацаа хамаарлын график

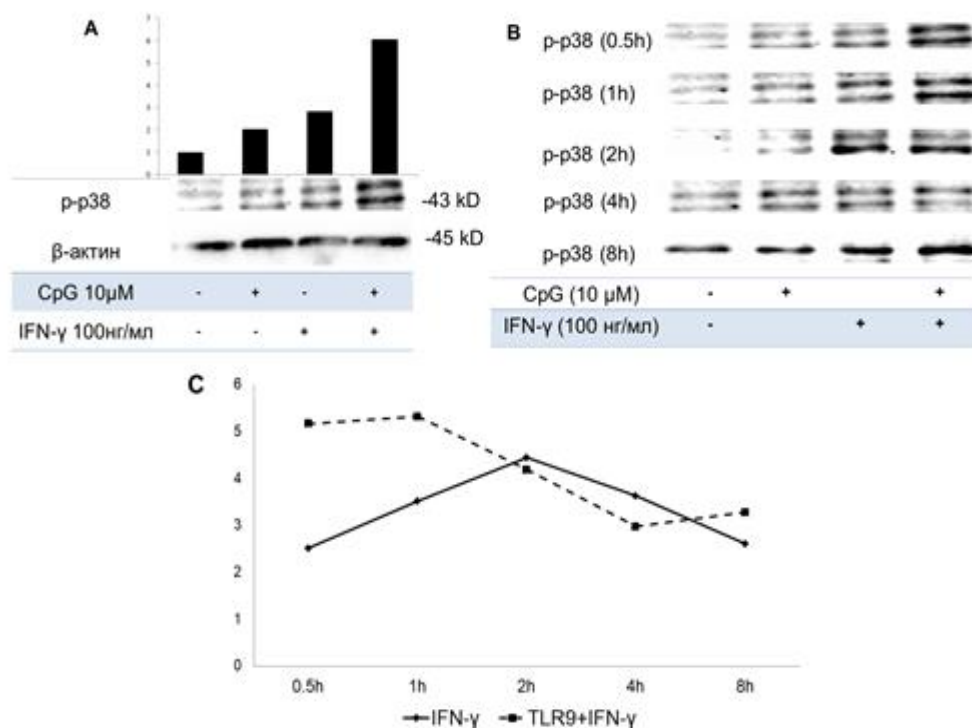
2. Эерэг зохицуулагч p38 уургийн фосфоржилтонд CpG ДНХ-ийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

Бид цаашид STAT1 уургийн өөр нэг идэвхжлийн хэсэг болох 727-р байрлал дахь сериний фосфоржилтыг эерэгээр

зохицуулагч p38 IFN-γ-аар өдөөгдсөн p-S727 STAT1 уургийн фосфоржилтыг дарангуйлагч p38 уургийн нийлэгжилд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ-ийн нөлөөг иммуноблоттингийн шинжилгээгээр тодорхойлсон. Эндотель эсийг 10 мкг/мл

СрG ДНХ-ээр 1 цаг үйлчилсний дараа 100 нг/мл IFN-γ-аар 1, 2, 4, 8 цаг үйлчилж p38 уургийн фосфоржилтыг үнэлсэн. Иммуноблоттинг шинжилгээний үр дүнгээс эс тайван үед p38 уургийн фосфоржилт илрээгүй. СрG ДНХ болон IFN-γ-аар үйлчилсэн бүлэгт p38 уургийн фосфоржилт илэрсэн. Харин СрG ДНХ ба IFN-γ-аар хамт үйлчилсэн бүлэгт p38 уургийн

фосфоржилтыг нэмэгдүүлж байсан (Зураг 2A). Энэхүү IFN-γ/TLR9-ийн дарангуйлах нөлөө нь 1 болон 2 цагуудад илүү тод ажиглагдаж байна (Зураг 2B, 2C). Дээрх үр дүнгээс үзэхэд СрG ДНХ нь IFN-γ-аар өдөөгдсөн p-S727 STAT1 уургийн фосфоржилтыг дэмжигч p38 уургийн идэвхжлийг нэмэгдүүлснээр IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг нэмэгдүүлж байна.



Зураг 2. p38 уургийн фосфоржилтыг тодорхойлсон иммуноблоттинг шинжилгээний үр дүн: А. Эндотель эсийг СрG ДНХ болон IFN-γ-аар 1 цаг үйлчилж p38 уургийн фосфоржилтыг үнэлсэн дүн. В. СрG ДНХ болон IFN-γ-аар сэдээснээс хойш 1, 2, 4, 8 цагуудад p38 уургийн фосфоржилтыг үнэлсэн дүн. С. IFN-γ дангаараа болон СрG ДНХ нэмж үйлчилсэн бүлгүүд дэх p38 уургийн фосфоржилтыг харьцуулсан хугацаа хамаарлын график

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 дамжилтан дахь нөлөөг тодорхойлсон бөгөөд эдгээр лигандууд нь IFN-γ-аар өдөөгдсөн азотын дан ислийн гарц, iNOS уургийн экспрессийн түвшинд ихэсгэж байсан. Цаашид IFN-γ-ийн дохио

дамжилтын молекулын түвшинд судлахад харилцан адилгүй механизмаар нөлөөлдөг болох нь тодорхойлогдсон байна. TLR2 нь p-S727 STAT1-ийн фосфоржуулагч p38 уургийн экспрессийг өдөөж улмаар IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг дэмжиж байсан[1]. Бидний судалгаагаар TLR9-ийн лиганд СрG ДНХ нь p38 уургийн фосфоржилтыг нэмэгдүүлж байсан бөгөөд ингэснээр S727 STAT1-ийг идэвхжүүлэх замаар IFN-γ-ийн дохио дамжилтанд дэмжиж байна. Наоки, Койдэ нарын судалгаанд эндотель эсэд

интерферон гаммагаар өдөөгдсөн азотын дан ислийн гарцыг TLR4-ийн лиганд липополисахарид (LPS) нэмэгдүүлсэн байна. Үүнийг iNOS уураг, iNOS мРНХ-ийн түвшинд шалгаж үзэхэд интерферон гаммагаар өдөөгдсөн iNOS уураг болон генийн экспрессийг LPS нэмэгдүүлсэн. Энэ судалгаанд p38 нь mitogen-activated protein kinases (MAPKs) хамааралт Interferon regulatory factor 1 (IRF1) ихэссэнээр NO гарцыг нэмэгдүүлж байгааг тодорхойлсон байна[2]. Хэвийн үед эсэд iNOS ялгардаггүй, харин судас болон мэдрэлийн эдэд нийлэгжих pNOS болон eNOS уургууд нь Ca⁺ ионы хэмжээнээс шалтгаалж идэвхжил нь илэрч болдог мөн CpG ДНХ нь TLR4-ийн лиганд LPS-тэй хамт үйлчлэхэд iNOS уургийн экспрессийг нэмэгдүүлж буй үр дүнгүүд байдаг ч CpG ДНХ дангаараа NO ялгаралыг өдөөдөг эсэх нь тодорхойгүй байна[3]. Хулганы аортын эндотель шугаман эсийн загварт IFN-γ-аар өдөөгдөх NO гарцад CpG ДНХ нь ихэсгэх нөлөө үзүүлж байгааг илрүүлсэн. NO ялгарлын замуудыг судалсанаар NO-оор нөхцөлдөх дархлааны хэт урвалыг зохицуулах, архаг явцтай өвчнүүдийн үед давхар халдвар авснаас үүсэх эд, эсийн гэмтэл бүхий үрэвслийг зохицуулахад ач холбогдолтой байж болох юм. IFN-γ-аар идэвхжих дохио дамжилт нь STAT уургийн 2 байрлал дахь фосфоржилт чухал нөлөөтэй бөгөөд өөр өөр идэвхжүүлэгч уургуудын тусламжтай тус тусдаа идэвхиждэг байна. Цааш азотын дан ислийн синтезийг нөхцөлдүүлэгч iNOS, IFN-γ-ийн дохио дамжилтын уураг болох p-Y701 STAT1, p-S727 STAT1 уургуудын экспрессийн түвшинд шалгахад CpG ДНХ нь идэвхжүүлэх нөлөө үзүүлж байлаа. CpG ДНХ болон IFN-γ-аар макрофаг эсийг давхар үйлчлэхэд STAT1 уургийн p-S701 STAT1 болон p-S727 STAT1 фосфоржилтыг ихэсгэсэн байдаг[4,5] бөгөөд бидний өмнөх судалгаагаар энэхүү үр дүнг эндотель эс дээр баталж чадсан. TLR9 лиганд болон IFN-γ-аар өдөөгдөх p-S727 STAT1 болон p-S701 STAT1-ын экспрессийг тодорхойлоход 2-4 цаг дээр хамгийн өндөр идэвх үзүүлж байсан бол 8-с дээш цаг дээр идэвх нь буурч байсан ба эдгээр цаг дээр тодорхойлоход ач

холбогдол нь багасч болох юм. Эдгээр үр дүнгээс харахад TLR9 болон IFN-γ-ийн дохио дамжих замын харилцан үйлчлэлд STAT1-ийн супер идэвхжил (p-S727 STAT1, p-S701 STAT1) чухал болохыг харуулж байна. IFN-γ-аар идэвхжиж байгаа Y701 STAT1-ын фосфоржилтонд SOCS1 хамгийн өндөр дарангуйлах нөлөө үзүүлж байсан бөгөөд SOCS1 уургийн үйл ажиллагааны алдагдал болон мутаци өөрчлөлтийн үед IFN-γ-ийн дохио дамжилт нэмэгдэн эмгэг төрөгчийн эсрэг дархлааны урвал нэмэгдэж байсан. Манай судалгаанд TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ нь SOCS1 уургийн идэвхийг 4 цагийн дараагаас эхлэн бууруулж байсан нь энэхүү харилцан үйлчлэлийг тайлбарлаж болох юм[4,6]. Бидний судалгаанд IFN-γ нь iNOS уургийн экспрессийг өдөөж байсан бөгөөд CpG ДНХ-аар нэмж үйлчилэхэд iNOS уургийн экспрессийг IFN-γ-тай харьцуулахад ихэсгэж байгааг илрүүлсэн.

TLR9 нь элэгний В вирүсийг таних чадвартай ба элэгний В вирус нь TLR9-ийн дохио дамжилтын молекулыг саатуулснаар далд урт хугацааны халдвар үүсгэж, улмаар хүндрэлийн шалтгаан болж байна⁷. Үүнээс үзэхэд TLR9 нь дархлаа тогтолцоог идэвхжүүлж бактери, вирүсийн эсрэг өрнөх дархлааны урвалд чухал нөлөөтэй болохыг харуулж байна. Эндотель эсийн TLR-ийн нь судасны хатуурал болон үрэвслийн аль алинд чухал үүрэг гүйцэтгэж оролцдог бөгөөд зүрх судасны өвчний эмчилгээний шинэ бай болох боломжтой. Хүний биеийн нийт TLR бус зөвхөн эндотель эсийн TLR-ийн үйл ажиллагааг голлож саатуулах эсвэл зохицуулах эмчилгээний шинэ стратеги нь илүү эрсдэлгүй бөгөөд ашигтай байж болно.

Дүгнэлт

1. IFN-γ-аар идэвхжих p-S701 STAT1 уургийн фосфоржилтыг сөргөөр зохицуулагч SOCS1 уургийн нийлэгжлийг TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ бууруулснаар IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг нэмэгдүүлж байна.
2. IFN-γ-аар идэвхжих p-S727 STAT1 уургийн фосфоржилтыг эерэгээр зохицуулагч p38 уургийн фосфоржилтыг

TLR9-ийн лиганд CpG ДНХ нэмэгдүүлмсээр IFN-γ-ийн дохио дамжилтыг нэмэгдүүлж байна.

Ном зүй

1. Tsolmongyn Bilegtsaikhan, Koide N, Jambalmaniin 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.

2. Yoo BK, Choi JW, Shin CY, 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. *Neurochemistry international*. May 2008;52(6):1188-1197.

3. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichyangkul S, Sirisinha S. CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). *Clinical and experimental immunology*. Jun 2002;128(3):467-473.

4. Dalpke AH, Eckerle S, Frey M, Heeg K. Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling. *European journal of immunology*. Jul 2003;33(7):1776-1787.

5. Takauji R, Iho S, Takatsuka H, et al. CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *Journal of leukocyte biology*. Nov 2002;72(5):1011-1019.

6. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. May 2011;31(5):980-985.

7. Shahrakyvahed A, Sanchooli J, Sanadgol N, Arababadi MK, Kennedy D. TLR9: an important molecule in the fight against hepatitis B virus. *Postgraduate medical journal*. Jul 2014;90(1065):396-401.

The effect of regulator proteins on the IFN-γ/TLR9 synergistic signal transduction

T.Baljinnyam^{1,2}, O.Khulan², Sh.Erkhembayar³, E.Baasansuren², B.Jawkhlan², Batkhishig², L.Enkhsaikhan², B.Galindew², N.Tsewelmaa², B.Baigalmaa², B.Hongorzul², L.Sodnomtsogt², D.Nyambayar², G.Batbaatar², B.Monhbat², N.Munkhtuwshin¹, Ts.Bilegtsaikhan^{1,2}

¹Core Laboratory, Science Technology Center, MNUMS

²Department of Microbiology and Immunology, SBS, MNUMS

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

Introduction

When human body encounters external pathogens primary/innate immunity cells are activated by recognizing them and secondary/adaptive immunity is activated consecutively. Immune cell surface receptors, called Toll-like receptors (TLRs) recognize and bind pathogens. 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 regulatory proteins on the IFN-γ/TLR9 synergistic signaling pathway.

Materials and Methods:

This study was held in the Core Laboratory, Science Technology Center, Mongolian National University of Medical Sciences (MNUMS). In this study, murine endothelial cell (END-D) culture was used. The negative and positive regulator protein expression was detected by Western blotting.

Result: Result of immunoblotting assay indicated that CpG DNA enhanced IFN- γ positive regulator protein p38 phosphorylation in the endothelial cells. Treatment by TLR9 ligand CpG DNA and IFN- γ increased p38 activation in 0.5 hour and 1 hour. CpG DNA inhibited IFN- γ negative regulator SOCS1

protein expression in 4 hr and 8 hr. Therefore, TLR9 ligand CpG DNA increased IFN- γ signal transduction in the endothelial cell line.

Conclusion

TLR9 ligand CpG DNA has decreased IFN- γ negative regulator protein SOCS1 expression. CpG DNA has increased IFN- γ positive regulator protein p38 phosphorylation.

*Танилцаж санал өгсөн АУ-ны доктор
В.ХАДХҮҮ*