

МОНГОЛ УЛСЫН БОЛОВСРОЛ, СОЁЛ, ШИНЖЛЭХ УХААН, СПОРТЫН ЯАМ
АНАГААХЫН ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ҮНДЭСНИЙ ИХ СУРГУУЛЬ

МӨНХЖАРГАЛЫН БАТХИШИГ

**МАКРОФАГ ТӨСТ RAW264.7 ЭСЭД HCV-ИЙН ЗАРИМ УУРГИЙН
НӨЛӨӨГ ТОДОРХОЙЛСОН ДҮН**

E09120105 Дархлаа судлал

Магистрын зэрэг горилсон нэг сэдэвт бүтээл

Улаанбаатар хот
2018

МОНГОЛ УЛСЫН БОЛОВСРОЛ, СОЁЛ, ШИНЖЛЭХ УХААН, СПОРТЫН ЯАМ
АНАГААХЫН ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ҮНДЭСНИЙ ИХ СУРГУУЛЬ

МӨНХЖАРГАЛЫН БАТХИШИГ

**МАКРОФАГ ТӨСТ RAW264.7 ЭСЭД HCV-ИЙН ЗАРИМ УУРГИЙН
НӨЛӨӨГ ТОДОРХОЙЛСОН ДҮН**

Эрдэм шинжилгээний ажлын удирдагч:

Анагаах ухааны доктор Л.Энхсайхан

Эрдэм шинжилгээний ажлын зөвлөх:

Анагаах ухааны доктор Ц.Билэгтсайхан

Эрдэм шинжилгээний ажлын шүүмжлэгч:

Анагаах ухааны доктор В.Нямцэнгэл

ХУРААНГУЙ

Сэдвийн нэр: RAW264.7 эсэд HCV-ийн зарим уургийн нөлөөг тодорхойлсон дүн

Түлхүүр үг : IFN-γ, дохио дамжилт, iNOS

Үндэслэл; HCV-ын цочмог халдварын эхэн үед вирус биеэс гадагш IFN-γ нэн чухал үүрэгтэй. IFN-оор өдөөгдөгдөх iNOS-ийн бүтээгдхүүн азотын дан исэл вирусын эсрэг үйлдэлтэй ч хяналт зохицуулаггүй нийлэгжил нь эмгэг өөрчлөлтөнд хүргэдэг. HCV нь IFN-γ-ийн дохио дамжилтын аль нэг үе шатанд саатуулах нөлөө үзүүлж ISG генийн илрэлийг бууруулдаг. HCV-ын Core уураг STAT1 уурагтай холбогдон үйл ажиллагааг нь дарангуйлах зэрэг вирусын стратегиуд нь халдвар тэсвэржих болон архаг халдварыг үүсгэдэг. Бидни өмнөх судалгаанд HCV вирус нь IFN-γ-ийн дохио дамжилтийг STAT1, iNOS, iNOS мPHX-ийн түвшинд саатуулсан үр дүн харуулсан.

Зорилго: RAW264.7 эсэд HCV вирусын уургийн нөлөөг тодорхойлох

Материал, арга зүй: Энэхүү судалгаанд бид хулганы макрофаг төст эсийг (RAW264.7) ашиглав. Эсийг 6 нүд бүхий тавганд ургуулж Lipofectamine3000 ашиглан рHCV- Core, рHCV-NS5A болон рHCV-E1 плазмидыг трансфекци хийв. 48 цагийн дараа with IFN-γ-ийн (25 нг/мл) тунгаар үйлчлэв. HCV-ын уургийн болон iNOS уургийн экспрессийг иммуноблоттинг аргаар үнэлж, азотын дан ислийн гарцын бүтээгдхүүн нитритийг Гриесс урвалжаар тодорхойллоо.

Үр дүн: HCV-ын Core NS5A болон E1 уургууд IFN-γ-аар өдөөгдөх iNOS уургийн экспрессийг улам нэмэгдүүлсэн. Сонирхолтой нь E1 уураг дангаараа iNOS уургийн экспрессийг өдөөв.

Дүгнэлт: Хулганы макрофаг эсэд IFN-γ нь HCV-ийн Core болон NS5A уургийн экспрессийг амжилттай бууруулав. Харин E1 уураг вирусийн эсрэг дархлааны механизмийг өдөөхөд илүү үүрэгтэй байна.

ABSTRACT

Title: Effect of some HCV proteins on macrophage-like RAW264.7 cell line

Keyword: HCV, IFN- γ , signaling pathway, iNOS,

Introduction: During acute phase of HCV infection IFN- γ 's action is pivotal for the virus clearance. IFN induced nitric oxide which produced by iNOS has an antiviral action but over expression leads to pathological conditions. HCV somehow interferes IFN- γ 's signaling pathway and reduces ISG gene expression. There is evidence that Core protein binds with STAT1 and inhibit its function. This kind of viral strategies cause viral persistence and results in chronic infection. Our previous study showed HCV interferes IFN- γ 's signaling pathway at the level of STAT1, iNOS, iNOS mRNA expression and NO production.

Purpose: To determine the effect of HCV protein on IFN- γ 's 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, we used murine macrophage cell line (RAW264.7). The cell was seeded in 6-well plate, transfected with pHCV- Core, pHCV-NS5A and pHCV-E1 using Lipofectamine3000 for 48 hours and then treated with IFN- γ (25 ng/ml) for 18 hours. Viral proteins and iNOS expression were detected with Western blot analyses and production of nitric oxide measured by Griess reagent.

Results: When Core, E1 and NS5A protein expressing cell treated with IFN- γ , iNOS expression and nitric oxide production was increased. Surprisingly, E1 protein the induced iNOS expression alone.

Conclusion: IFN- γ is effective against HCV-Core and NS5A protein in murine macrophage cell line and E1 protein played a key role in accelerating IFN- γ mediated antiviral immune response.

ГАРЧИГ

ТОВЧ ХУРААНГУЙ

ГАРЧИГ	3
МОНГОЛ ТОВЧИЛСОН ҮГИЙН ЖАГСААЛТ	5
ГАДААД ТОВЧИЛСОН ҮГИЙН ЖАГСААЛТ	6
ЗУРГИЙН ЖАГСААЛТ	8
УДИРТГАЛ	10
Судалгааны ажлын үндэслэл	10
Судалгааны ажлын зорилго	12
Судалгааны ажлын зорилт	12
Судалгааны ажлын шинэлэг тал	12
Судалгааны ажлын практик ач холбогдол	12
Судалгааны ажлыг хэлэлцүүлсэн байдал	13
НЭГДҮГЭЭР БҮЛЭГ. ХЭВЛЭЛИЙН ТОЙМ	13
1.1. Гепатитын С вирус	13
1.2. HCV-ийн халдварын үед макрофаг эсийн оролцоо	15
1.3. Интерферон	17
1.3.1. IFN-γ ба HCV-ийн эсрэг идэвх	17
1.4. iNOS (NOS2) ба дархлаа тогтолцоо	19
ХОЁРДУГААР БҮЛЭГ. СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН БА АРГА ЗҮЙ	24
2.1 Судалгааны загвар	24
2.2 Судалгааны хүрээ	24
2.3 Судалгааны ажлын хэрэглэгдэхүүн	24
2.4 Судалгааны ажлын арга зүй	25
2.4.1 Компетент эс	25
2.4.2 Трансформаци	26
2.4.3 Плазмид ДНХ ялгах	27
2.4.4 Эсийн өсгөвөр	28

2.4.5 Трансфекци	28
2.4.6 Иммуноблоттинг	29
2.4.7 Азотын ислийн гарцыг тодорхойлох	30
2.5 Үр дүнгийн статистик боловсруулалт	31
2.6 Судалгааны ажлын ёс зүй	31
ГУРАВДУГААР БҮЛЭГ. СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН.....	32
3.1. Core уургийн экспресс, түүнд үзүүлэх IFN-γ-ийн нөлөөг иммуноблоттинг аргаар баталсан дүн.....	32
3.2. NS5A уургийн экспресс, түүнд үзүүлэх IFN-γ-ийн нөлөөг иммуно блоттинг аргаар үнэлсэн дүн.....	32
3.3. E1 уургийн экспресс, түүнд үзүүлэх IFN-γ-ийн нөлөөг иммуноблоттинг аргаар баталсан дүн.....	33
3.4. IFN-γ-аар өдөөгдөх iNOS уургийн идэвхжилд Core, E1 болон NS5A уургийн нөлөө.....	34
3.5. IFN-γ-аар өдөөгдөх азотын дан ислийн гарцад Core, E1 болон NS5A уургийн нөлөө.....	35
3.6. Эзэн эсийн хамгаалах хариу урвал болон вирусийн гэмтээх урвалын харилцан уялдааг тодорхойлсон дүн.....	36
ДӨРӨВДҮГЭЭР БҮЛЭГ. ХЭЛЦЭМЖ	39
СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ДҮГНЭЛТ	44
 НОМЗҮЙ	
ХАВСРАЛТ	
ТАЛАРХАЛ	

НОМ 3ҮЙ

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:74-81.
2. Baatarkhuu O, Kim DY, Ahn SH, et al. Prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus among apparently healthy individuals in Mongolia: a population-based nationwide study. *Liver Int.* 2008;28(10):1389-1395.
3. Baatarkhuu O, Uugantsetseg G, Munkh-Orshikh D, et al. Viral Hepatitis and Liver Diseases in Mongolia. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* 2017;7(1):68-72.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-386.
5. Horner SM, Gale M, Jr. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(9):489-498.
6. Soriano V, Peters MG, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis.* 2009;48(3):313-320.
7. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.* 2005;436(7053):946-952.
8. Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15669-15674.
9. Rehmann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med.* 2013;19(7):859-868.
10. Suthar MS, Ma DY, Thomas S, et al. IPS-1 is essential for the control of West Nile virus infection and immunity. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):e1000757.
11. Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58:391-424.
12. Frese M, Schwarzle V, Barth K, et al. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology.* 2002;35(3):694-703.
13. Garcia JE, Puentes A, Suarez J, et al. Hepatitis C virus (HCV) E1 and E2 protein regions that specifically bind to HepG2 cells. *J Hepatol.* 2002;36(2):254-262.
14. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature.* 2011;472(7344):481-485.
15. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res.* 2010;162(1):95-109.
16. Atik E, Onlen Y, Savas L, Doran F. Inducible nitric oxide synthase and histopathological correlation in chronic viral hepatitis. *Int J Infect Dis.* 2008;12(1):12-15.
17. Garcia-Monzon C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol.* 2000;32(2):331-338.
18. Lake-Bakaar G, Sorbi D, Mazzocchi V. Nitric oxide and chronic HCV and HIV infections. *Dig Dis Sci.* 2001;46(5):1072-1076.
19. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology.* 2004;39(1):5-19.
20. Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, et al. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog.* 2012;8(12):e1003056.
21. Ma J, Chen T, Mandelin J, et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(11):2334-2346.
22. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(46):7413-7420.
23. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-944.
24. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
25. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-6173.

26. Blight K, Trowbridge R, Rowland R, Gowans E. Detection of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization. *Liver*. 1992;12(4 Pt 2):286-289.
27. Caussin-Schwemling C, Schmitt C, Stoll-Keller F. Study of the infection of human blood derived monocyte/macrophages with hepatitis C virus in vitro. *J Med Virol*. 2001;65(1):14-22.
28. Falcon V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, et al. HCV core protein localizes in the nuclei of nonparenchymal liver cells from chronically HCV-infected patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(4):1320-1328.
29. Laskus T, Radkowski M, Adair DM, Wilkinson J, Scheck AC, Rakela J. Emerging evidence of hepatitis C virus neuroinvasion. *AIDS*. 2005;19 Suppl 3:S140-144.
30. Revie D, Braich RS, Bayles D, et al. Transmission of human hepatitis C virus from patients in secondary cells for long term culture. *Virol J*. 2005;2:37.
31. Royer C, Steffan AM, Navas MC, Fuchs A, Jaeck D, Stoll-Keller F. A study of susceptibility of primary human Kupffer cells to hepatitis C virus. *J Hepatol*. 2003;38(3):250-256.
32. Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V, Andre P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends Microbiol*. 2011;19(2):95-103.
33. Radkowski M, Bednarska A, Horban A, et al. Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 1):47-59.
34. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *Biofactors*. 2009;35(1):14-20.
35. Heim MH. Innate immunity and HCV. *J Hepatol*. 2013;58(3):564-574.
36. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(5):375-386.
37. Hertzog P, Forster S, Samarajiwa S. Systems biology of interferon responses. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(1):5-11.
38. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6(12):3051-3064.
39. Jyoti A, Singh AK, Dubey M, et al. Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):417-431.
40. Thom SR, Bhopale VM, Milovanova TN, Yang M, Bogush M, Buerk DG. Nitric-oxide synthase-2 linkage to focal adhesion kinase in neutrophils influences enzyme activity and beta2 integrin function. *J Biol Chem*. 2013;288(7):4810-4818.
41. Boissel JP, Ohly D, Bros M, Godtel-Armbrust U, Forstermann U, Frank S. The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):132-139.
42. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:235-276.
43. Chakrabarti S, Chan CK, Jiang Y, Davidge ST. Neuronal nitric oxide synthase regulates endothelial inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012;91(6):947-956.
44. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837, 837a-837d.
45. Wahl SM, McCartney-Francis N, Chan J, Dionne R, Ta L, Orenstein JM. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? *Cells Tissues Organs*. 2003;174(1-2):26-33.
46. Farlik M, Reutterer B, Schindler C, et al. Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF-kappaB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. *Immunity*. 2010;33(1):25-34.
47. Wienerroither S, Rauch I, Rosebrock F, et al. Regulation of NO synthesis, local inflammation, and innate immunity to pathogens by BET family proteins. *Mol Cell Biol*. 2014;34(3):415-427.
48. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, et al. Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001;33(1):267-276.
49. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, et al. Analysis of successful immune responses in persons cured with hepatitis C virus. *J Exp Med*. 2000; 191(9):1499-1512.
50. ...me R, Spangenberg HC, Von Weizsacker F, Blum HE. [T cell response to hepatitis B and C: from viral elimination to hepatocellular carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2002;127(43):2277-2279.

51. Tambur AR, Ortegel JW, Ben-Ari Z, et al. Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. *Transplantation*. 2001;71(10):1475-1480.
52. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:227-264.
53. Schena FP, Cerullo G, Torres DD, et al. Role of interferon-gamma gene polymorphisms in susceptibility to IgA nephropathy: a family-based association study. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(4):488-496.
54. Sun Y, Lu Y, Li T, et al. Interferon Gamma +874T/A Polymorphism Increases the Risk of Hepatitis Virus-Related Diseases: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0121168.
55. Battegay M, Holdener M, Naef M, Wernli M. Human immunodeficiency and hepatitis C virus coinfection influenced by interferon-gamma. *Immunol Lett*. 2000;71(3):141-142.
56. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(10):2421-2422.
57. Khaliq S, Latief N, Jahan S. Role of different regions of the hepatitis C virus genome in the therapeutic response to interferon-based treatment. *Arch Virol*. 2014;159(1):1-15.
58. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci*. 2017;19(1).
59. Vahedi F, Lee AJ, Collins SE, et al. IL-15 and IFN-gamma signal through the ERK pathway to inhibit HCV replication, independent of type I IFN signaling. *Cytokine*. 2018.
60. Karupiah G, Hunt NH, King NJ, Chaudhri G. NADPH oxidase, Nramp1 and nitric oxide synthase 2 in the host antimicrobial response. *Rev Immunogenet*. 2000;2(3):387-415.
61. Metz P, Dazert E, Ruggieri A, et al. Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication. *Hepatology*. 2012;56(6):2082-2093.
62. Majano PL, Garcia-Monzon C. Does nitric oxide play a pathogenic role in hepatitis C virus infection? *Cell Death Differ*. 2003;10 Suppl 1:S13-15.
63. Lee CH, Choi YH, Yang SH, Lee CW, Ha SJ, Sung YC. Hepatitis C virus core protein inhibits interleukin 12 and nitric oxide production from activated macrophages. *Virology*. 2001;279(1):271-279.
64. Polakos NK, Cornejo JC, Murray DA, et al. Kupffer cell-dependent hepatitis occurs during influenza infection. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1169-1178; quiz 1404-1165.
65. Sene D, Levasseur F, Abel M, et al. Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. *PLoS Pathog*. 2010;6(11):e1001184.