

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ, ЯКІ КОДУЮТЬ α -ІНТЕРФЕРОН, ЙОГО РЕЦЕПТОР, ПРОТЕЇНКІНАЗУ R ТА РИБОНУКЛЕАЗУ L В ІНТАКТНІЙ ТА РЕГЕНЕРУЮЧІЙ ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

У статті досліджено роль α -інтерферону (ІФНа) та його мішеней у життєдіяльності клітини за відсутності вірусної інфекції. Використано дві моделі - печінку щурів після часткової гепатектомії (ЧГЕ) і лапаратомії, які імітують перехід до поділу високодиференційованої проліферативно неактивної тканини та реакцію гострої фази. За допомогою зворотної транскрипції - полімеразної ланцюгової реакції - визначали відносний вміст РНК, які кодують ІФНа, рецептор до ІФНа (ІФНР), РНКазу L та протеїнкіназу R (PKR) в складі нефракціонованої РНК печінки через 0,5, 1, 3, 6, 12 год після операцій. Усі досліджувані РНК визначаються в інтактній печінці і за представленістю розташовуються в ряду мРНК ІФНР > мРНК PKR > мРНК РНКазу L > мРНК ІФНа. Рівень експресії мРНК ІФНа в регенеруючій печінці має двохфазний характер зі зниженням на 50 % через 1 год після ЧГЕ і підвищенням на 25 % через 3 год після ЧГЕ порівняно з рівнем в інтактній печінці. У печінці після лапаратомії мРНК ІФНа не виявляється. Рівні інших мРНК тимчасово і незначно зніжуються через 0,5 год і істотно знижуються починаючи з 6-ї год після ЧГЕ. Висловлено припущення, що ІФНа виступає як негативний регулятор реакції гострої фази та процесів, пов'язаних з G1/S переходом гепатоцитів, і як позитивний регулятор деяких невизначених процесів у пререплікативному періоді регенераційного процесу.

Вступ

Цю працю присвячено визначенню експресії α -інтерферону, його рецептора, протеїнкінази R та рибонуклеази L в інтактній та регенеруючій печінці щурів.

Після класичної операції видалення 2/3 печінки у щурів відбувається вторинний розвиток органу, який деякою мірою нагадує формування органу під час внутрішньоутробного періоду. Високодиференційовані клітини, які в інтактній печінці тварин діляться рідко (мітотичний індекс 1/1000), переходять із проліферативно неактивного стану в проліферативно активний.

Унаслідок поділу клітин печінки усіх типів відновлюються маса та функції органу. Цей процес передбачає злагоджену діяльність всіх клітин, яка забезпечується численними медіаторами, зокрема тими, що продукуються клітинами печінки. Відомо, що в процесі формування органів клітини мезенхімального походження за допомогою медіаторів, які вони продукують, управляють ростом та диференціацією клітин епітеліального походження [1]. У печінці клітини епітеліального походження - це гепатоцити. До клітин мезенхімального походження належать синусоїдальні клітини, а саме клітини Купфера, перисинусоїдальні клітини, осідлі лімфоцити

(Ріт-клітини), ендотеліальні клітини. Численні цитокіни, ростові фактори, ейкосаноїди, реакційні проміжні сполуки кисню та оксиду азоту здебільшого продукуються в печінці синусоїдальними клітинами. У регенеруючій печінці щурів різні набори медіаторів функціонують на різних етапах відновлювального процесу [2].

Відомо, що після часткової гепатектомії (ЧГЕ) необхідною умовою для переходу гепатоцитів із фази G_0 в фазу G_1 , є активація клітин Купфера і продукція ними медіаторів, зокрема ФНП α , ТФР, ІІ-І тощо [2]. Клітини Купфера здатні продукувати ще один цитокін - α -інтерферон, а можливу його роль та роль α -інтерферон респонсивних генів у регенераційному процесі не було досліджено. Дані, отримані раніше в нашій лабораторії, засвідчили підвищення активності 2'-5'-олігоаденілат-синтетази на ранньому етапі регенерації [3; 4]. Цей фермент є специфічною мішенню для α -інтерферону [5]. Зважаючи на вищезазначене, а також на величезний перелік генів-мішеней для ІФНа, ми передбачаємо його важливу роль у відновлювальному процесі печінки. ІФНа має більше 100 респонсивних генів, найбільш відомими з яких є гени 2'-5'-олігоаденілат-синтетази, протеїнкінази R, рибонуклеази L, білків р56, р204, головних комплексів гістосумісності. Маючи стільки мішеней, інтерферон не діє сам по собі. Подібно до гормонів, ростових факторів та цитокінів, він зв'язується з рецептором на поверхні клітини і запускає каскад передачі сигналу, що зрештою досягає ядра (те, що зв'язується, називається лігандом). Відомо, що при збільшенні чи зменшенні кількості рецепторів на поверхні клітини при однакових кількостях лігандів спостерігаються різні за інтенсивністю реакції. Тому було вирішено перевірити, чи змінюється, а якщо змінюється, то яким чином, рівень експресії α -інтерферону, його рецептора та двох мішеней, таких як протеїнкіназа R та рибонуклеаза L, в інтактній та регенеруючій печінці щурів.

Щоб визначити рівень експресії генів, використовуються декілька методичних підходів. Ми обрали ПЛР з попередньою зворотною транскрипцією як найкращий з огляду чутливості та економічності.

Нашим першочерговим завданням було підібрати праймери та оптимізувати умови ПЛР-реакції для чотирьох молекул. Наступним завданням було провести денситометрію і навести дані відносно одного з генів домашнього господарства.

Об'єкт та методи досліджень

Об'єктом дослідження було обрано інтактну печінку та печінку після часткової гепатектомії

(ЧГЕ) та лапаротомії. Дві третини печінки видаляли за методом Хігінса - Андерсона [6]. Дослідження проводили через 0,5, 1, 3, 6 та 12 годин після операцій. Перфузію печінки проводили *in situ* фізіологічним розчином.

Метод **виділення РНК з CsCl** [7]. 400 мг тканини печінки розтирали в ступці з рідким азотом, для лізису клітин додавали 4 мл 4М ГПЦ-буфера (4М гуанідин ізотіоціанат, 25 мМ Na-ацетат, рН 6,0, 1 % β -меркаптоетанол). Лізат обробляли ультразвуком і пропускали крізь ін'єкційну голку діаметром 0,7 мм для фрагментації ДНК. Гомогенат нашаровували на 5,7 М розчин CsCl у співвідношенні 1:1, центрифугували в роторі SW-40 протягом 26 годин зі швидкістю 24 тис. об./хв. Під час центрифугування РНК утворює осад на дні пробірок, а ДНК та білки залишаються в супернатанті. Супернатант обережно відбирали, а осад промивали 70-процентним етанолом, що усувало залишки CsCl. Осад розчиняли в ТЕ-буфері, рН 7,6, розчин перенесли в одну мікропробірку, для депротейнізації РНК додавали 1/10 об'єму 2М Na-ацетату, рівний об'єм фенолу і 1/2 об'єму хлороформу. Суміш струшували і центрифугували 15 хв при 10 000 g. Цей етап був потрібний для остаточного очищення препарату РНК від білків. Супернатант відбирали, додавали рівний об'єм ізопропілового спирту і залишали на ніч при -20°C . Після центрифугування впродовж 20 хв при 10 000 g осад розчиняли в ТЕ-буфері, рН 7,6. Концентрацію РНК визначали за оптичною густиною при $\lambda = 260$ нм, а чистоту препарату - за співвідношеннями A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230} . Щоб позбавитися залишків фенолу, до розчину РНК додавали 1/10 об'єму 3М Na-ацетату, 3 об'єми 96-процентного етанолу, залишали на ніч при -20°C , а потім центрифугували при 10 000 g 10 хв. Осад розчиняли у ТЕ-буфері (Трис-ЕДТА), рН 7,6. Для того щоб протягом тривалого часу зберігати РНК, у розчин РНК додавали 1/10 об'єму 3М Na-ацетату і 3 об'єми 96-процентного етанолу.

Метод зворотної транскрипції. Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили в об'ємі 50 мкл. 12,5 мкг РНК розчиняли у воді, яку перед тим було оброблено диетилпірокарбонатом (ДЕПК), додавали 2,5 мкл (0,2 мкг/мкл) випадкових гексамерних праймерів (Pharmacia) та інкубували при 70°C протягом 5 хв для гібридизації праймерів. Додавали 5 мкл 10 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (MBI Fermentas), 10 мкл п'ятикратного буфера (250 мМ Трис-НСІ, рН 8,3, 250 мМ KCl, 250 мМ MgCl_2 , 50 мМ ДТТ) (MBI Fermentas). Через 5 хв інкубації при 25°C додавали 2,5 мкл M-MuLV зворотної транскриптази (200 од./мкл) (MBI Fermentas) та

інкубували 60 хв при 42 °С. Реакцію зупиняли охолодженням на льодяній бані.

Полімеразна ланцюгова реакція. Реакційна суміш для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 50 мкл містила 15 мкл розчину кДНК (для ампліфікації послідовності α -інтерферон-специфічної кДНК) чи 5 мкл розчину кДНК (для ампліфікації послідовностей, специфічних до кДНК рецептора до α/β -інтерферону, РНКаз L, протеїнкінази R), чотири нуклеозидтрифосфати, 0,2 мМ кожний (MBI Fermentas, Литва), 20 пмоль кожного з праймерів (ЗАО Синтол, Росія) і 2,5 од. Taq полімерази в буфері 10 мМ трис-НСІ, рН 8,8, 50 мМ КСІ, 1,5 мМ MgCl₂. Щоб запобігти випаровуванню суміші, її покривали краплиною стерильного мінерального масла.

Реакції ампліфікації фрагментів кДНК складалися з попередньої денатурації (94 °С, 4 хв), 30 циклів ампліфікації та завершальної полімеризації (72 °С, 7 хв). Температурні профілі повторюваних циклів для фрагментів чотирьох типів були різні. Для α -інтерферону та S12-специфічних фрагментів цикл складався з денатурації при 94 °С протягом 1 хв, гібридизації праймерів при 54 °С 1 хв, синтезу при 72 °С 30 с; для РНКаз L-специфічних фрагментів - з денатурації при 94 °С протягом 30 с, гібридизації праймерів при 52 °С 1 хв, синтезу при 72 °С 30 с; для протеїнкінази R-специфічного фрагмента - з денатурації при 94 °С 1 хв, гібридизації праймерів при 57 °С 1 хв, синтезу при 72 °С 40 с; для фрагмента, специфічного до послідовності рецептора ІФНа, 1, - з денатурації при 94 °С 1 хв, гібридизації праймерів при 50 °С 1 хв та синтезу - 72 °С 30 с.

Після завершення ПЛР проводили гелелектрофорез в 2-процентному агарозному гелі та TBE-буфері. Гель містив 1 мкг/мл етидіумброміду. Весь продукт ампліфікації ІФНа-специфічного фрагмента осаджували етанолом, розчиняли і наносили на гель. Продукти ампліфікації фрагментів інших трьох типів використовували для форефу в об'ємі 20 мкл реакційної суміші ПЛР.

Рестрикція. Для визначення відповідності продукту ампліфікації очікуваному продукту проводили рестрикційний аналіз. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 15 мкл ПЛР-продукту, 10 од. спеціально підібраної рестриктази та відповідний буфер. Рестрикцію проводили протягом 2-4 годин при 37 °С. Наступний електрофорез проводили в 2-процентній агарозі та TBE-буфері.

Результати електрофорезу візуалізували на приладі Ultrosan і фотографували цифровим фотоапаратом Canon PowerShot A75. Денситометрію електрофореграм проводили за допомогою програми GelPro.

Результати та їх обговорення

Для того щоб підібрати праймери для ампліфікації фрагментів кДНК, які кодують α -інтерферон, його рецептор, протеїнкіназу R та рибонуклеазу L, було проведено пошук відповідних послідовностей у базі даних NCBI.

Знайдено п'ять послідовностей нуклеїнових кислот: послідовність за номером доступу X00336, яка відповідає гену α -інтерферону 1 шурів і була розшифрована авторами [8]. Ген α -інтерферону є одним з винятків серед генів еукаріот, оскільки не містить інтронів. Тому ДНК-послідовність гена α -інтерферону, так само як і кДНК, може бути використана для підбору праймерів; послідовність ХМ_213649, що відповідає кДНК рецептора до α -інтерферону. Це передбачена послідовність, яку було визначено програмою GNOMON на підставі існуючої бази даних щодо геному шура та розшифрованих послідовностей гена та мРНК, які кодують рецептор до α -інтерферону, в інших організмах; послідовність кДНК за номером NM_0182673, що кодує протеїнкіназу R, було подано авторами [9]; послідовність кДНК РНКаз L за номером NM182673 було подано авторами [10]; послідовність кДНК рибосомального білка S12 було встановлено авторами [11] і подано за номером NM_031709 у базі NCBI.

Праймери для ампліфікації фрагментів отриманих послідовностей наведено в таблиці 1. За допомогою тієї ж програми Vector NTI всі праймери було перевірено на здатність утворювати димери і шпильки. Специфічність праймерів визначали в програмі Blastn. Умови проведення ампліфікації фрагментів було підібрано в програмі Vector NTI.

Для того щоб визначити, чи є продукти ЗТ-ПЛР специфічними, було використано рестрикційний аналіз. За даними програми Vector NTI ампліфіковані послідовності кДНК ІФНа, його рецептора, PKR та РНКаз L мають сайти рестрикції, по яких відповідні рестриктази розрізають продукти на два фрагменти (див. табл.).

Проведений рестрикційний аналіз показав, що за довжиною рестрикції кожного продукту ампліфікації відповідали очікуваним.

Як приклад представлено електрофореграму продукту ампліфікації PKR-специфічної кДНК та його рестриктів (див. рис. 1).

Для оцінки кількості як ампліфікованих продуктів, так і вихідних РНК у складі нефракціонованої клітинної РНК за кожною електрофореграмою за допомогою програми GelPro визначали інтегровану оптичну густину (ЮГ) смуг, які утворюють продукти реакції ЗТ-ПЛР, та інтенсивність смуги, яку утворює фрагмент довжиною 400 п. н. в доріжці GeneRuler™ 100 п.н.

Таблиця. Дані про праймери, довжину продуктів ампліфікації, специфічні рестриктази та довжину рестрикційних фрагментів

Специфічність кДНК, що визначаються	Послідовність праймерів	Продукти ампліфікації, п. н.	Специфічна рестриктаза	Довжина рестрикційних фрагментів
ІФНа	(F)5'-ACCTATTTAAGACACATCCACACAG-3'; (R)5'-TCTTGTTCTGAGGTTATGAGTATG-3';	209	NcoI	102 та 107
Рецептор до ІФНа	(F)5'-TTTGAGAGGGTCTGTCTGGC-3'; (R) 5'- GTGCTTCCCAGCCATAACTC-3';	306	AluI	102 та 204
PKR	(F)5'-GGTCGGAGGGCGACGAGATTTTAG-3'; (R)5'-TTGGGAGTCGGGGTCACACAGTTC-3';	473	Bam H I	393 та 80
РНКаза L	(F) 5'- CGGGATGTGGGAAATGAATC-3'; (R) 5'-TGGAGGCTGAGGAAAGTGTGTT-3'.	369	Hind III	94 та 275
Блок S12	(F)5'-GAAGGCATAGCTGCTGG-3'; (R)5'-CCTCGATGACATCCTTGG-3'.	368		

F - прямий праймер;

R - зворотний праймер.

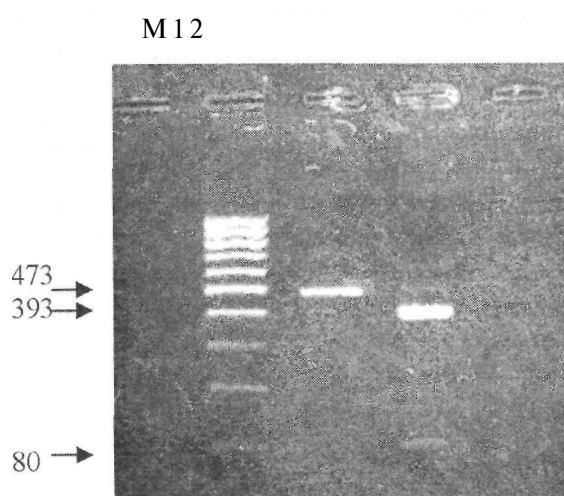


Рис. 1. Електрофореграма продукту реакції ЗТ-ПЛР та його рестриктів, специфічних до протеїнкінази R

М - маркер; 1 - продукт ампліфікації, специфічний до протеїнкінази R, до його рестрикції; 2 - продукт ампліфікації, специфічний до протеїнкінази R, після рестрикції ферментом BamHI.

(Fermentas, Литва). Відомо, що в 1 мкг сумарної ДНК доріжки міститься 65 нг фрагмента довжиною 400 п. н. Оскільки на доріжку гелю наносили 2 мкг тотальної ДНК доріжки, то інтенсивність смуги цього фрагмента, яку приймають за одиницю, відповідала масі 130 нг. Подальші розрахунки було спрямовано на те, щоб визначити, яка кількість специфічного продукту реакції ЗТ-ПЛР утворюється на 1 мкг вихідної нефракціонованої клітинної РНК. При цьому враховували об'єм розчину, який наносили на доріжку гелю, об'єм реакційної суміші після зворотної транскрипції, який використовували для реакції ПЛР, об'єм сумішей для проведення реакцій ЗТ та ПЛР, а також кількість вихідної клітинної РНК, яку брали для реакції ЗТ-ПЛР.

У загальному вигляді масу специфічного продукту реакції ЗТ-ПЛР можна обчислити за формулою:

$$A = \frac{\text{ІОГ смуги продукту} - m - V_2 - V_4}{\text{ІОГ смуги 400 п.н.} - V^* V_y M}$$

де V - об'єм реакційної суміші ЗТ-ПЛР, який наносили на доріжку;

V_2 - загальний об'єм реакційної суміші ЗТ-ПЛР;

V_3 - об'єм реакційної суміші ЗТ, який використовували для реакції ПЛР;

V_4 - загальний об'єм реакційної суміші ЗТ;

M - маса РНК, яку внесено в реакцію ЗТ (в мкг);

m - маса ДНК на електрофореграмі в смугі, яка утворюється фрагментом доріжки GeneRuler™ 400п. н.;

A - маса специфічного продукту реакції ЗТ-ПЛР з 1 мкг нефракціонованої клітинної РНК.

Оскільки продукти реакції ЗТ-ПЛР представлені фрагментами певної довжини, то, використовуючи атомно-молекулярну масу фрагментів і число Авогадро, можна визначити кількість нанограмів, а, відповідно, і кількість вихідних молекул специфічної РНК у нефракціонованій клітинній РНК.

Визначення кількості мРНК у складі 1 мкг нефракціонованої клітинної РНК інтактної печінки розглянемо на прикладі ІФНа-специфічної мРНК. Довжина ампліфікованого дволанцюгового фрагмента становить 209 п. н., його грам-молекулярна маса дорівнює $209 \cdot 330 \cdot 2$ г, де 330 - середня маса нуклеотиду, а коефіцієнт 2 враховує дволанцюгову природу продукту. Інтенсивність смуги, яку утворює ІФНа-специфічний продукт, в 1,4 раза перебільшує інтенсивність смуги, яку утворює фрагмент довжиною 400 п.н. в доріжці GeneRuler™ 100 п. н. Якщо маса фрагмента доріжки в наших експериментах становила 130 нг, то маса ІФНа-специфічного продукту ЗТ-ПЛР становить $130 \cdot 1,4 = 182$ нг.

Маса нефракціонованої РНК, яку брали в реакцію зворотної транскрипції, становила 12,5 мкг на 50 мкл реакційної суміші. У реакцію

ПЛР об'ємом 50 мкл брали 15 мкл суміші після зворотної транскрипції. Всю кількість продукту, отриманого в 50 мкл полімеразної ланцюгової реакції, наносили на гель після його попереднього осадження етанолом і розчинення у воді.

Ампліфікацію цільового фрагмента в реакції ампліфікації описують формулою: $y = \chi \cdot 2^z$, де y - маса або кількість молекул специфічного продукту ПЛР, χ - вихідна маса або кількість молекул, z - кількість циклів ампліфікації. Ампліфікацію фрагментів проводили впродовж 30 циклів, тобто $2 = 2^{30}$.

Число молекул специфічної РНК в 1 мкг вихідної нефракціонованої клітинної РНК (X) описуватиметься формулою:

$X = A \cdot \text{число Авогадро} / 2^{30} \cdot \text{г-моль спец. фрагмента.}$

Ці розрахунки дають уявлення про представленість мРНК, які кодують α -інтерферон, його рецептор, протеїнкіназу R та рибонуклеазу L, в 1 мкг тотальної РНК в інтактній печінці та печінці після ЧГЕ та лапаратомії протягом перших 12 год регенерації.

Автори чітко усвідомлюють, що метод ЗТ-ПЛР не є кількісним. Наведені розрахунки базуються на декількох припущеннях: число циклів ампліфікації знаходиться в лінійній області накопичення продуктів ампліфікації; діапазон оптичної густини смуг охоплює знову ж таки інтервал лінійної залежності інтегральної оптичної густини смуг від кількості продукту ампліфікації; реакція ЗТ проходить із стовідсотковою ефективністю та ін. Отже, автори вважають, що такі розрахунки суттєво підвищують інформативність результатів, проте автори не наполягають на тому, що вони точно визначили кількість специфічних молекул мРНК в 1 мкг нефракціонованої РНК.

Порівняння кількості молекул мРНК α -інтерферону, його рецептора, протеїнкінази R та рибонуклеази L в 1 мкг тотальної РНК в інтактній печінці шурів показало, що найменше представлена мРНК інтерферону,

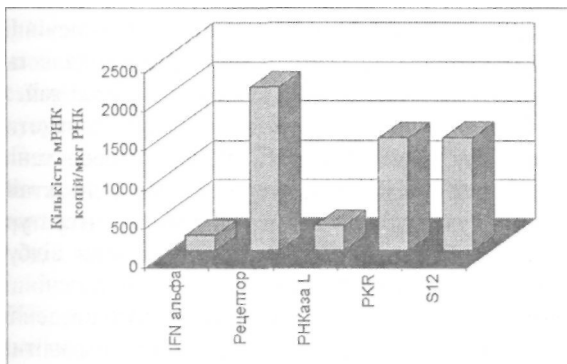


Рис. 2. Кількість мРНК копій в 1 мкг тотальної РНК інтактної печінки

а найбільше - мРНК рецептора до інтерферону. мРНК рибосомального білка S12 та протеїнкінази R перебувають на одному рівні. Рівні мРНК, які кодують α -інтерферон, РНКазу L, PKR, S12 та рецептор, розташовуються у висхідній послідовності.

Щоб оцінити, як змінюється рівень досліджуваних РНК в печінці після операцій, проводили нормалізацію показників інтегральної оптичної густини продуктів реакції ЗТ-ПЛР.

Зазвичай для нормалізації даних використовують одну із РНК, що кодує білки домашнього господарства. Рівень цієї РНК має бути досить стабільним. У такому разі кількість ампліфікованого продукту, який утворюється на базі цієї РНК, корелюватиме з кількістю нефракціонованої РНК, яку було взято до реакції ЗТ-ПЛР. Для кожного препарату нефракціонованої РНК ЮГ смуги цього продукту можна використати для нормалізації показників, що досліджуються. Це дає змогу виключити відмінності, викликані можливою різницею в якості РНК, варіюванням ефективності зворотної транскрипції, похибками при кількісному оцінюванні чи піпетуванні. У нашому дослідженні використано продукт реакції ЗТ-ПЛР для мРНК, яка кодує рибосомальний білок S12.

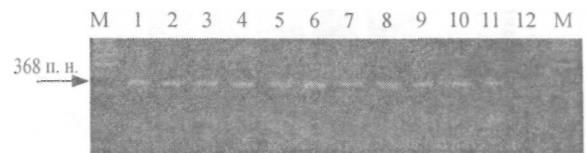


Рис. 3. Електрофореграма продуктів БИ-специфічної реакції ЗТ-ПЛР

М - маркер. На доріжки нанесено продукти реакції ЗТ-ПЛР з РНК, виділеної з інтактної (доріжки 1, 2) та регенеруючої печінки через 0,5 год (доріжки 3, 4), 1 год (доріжки 5, 6), 3 год (доріжки 7, 8), 6 год (доріжки 9, 10) та 12 год (доріжки 11, 12) після ЧГЕ.

мРНК α -інтерферону визначають в інтактній печінці. При прогресії відновлювального процесу її кількість змінюється, причому вона зростає через 3 год після операції.

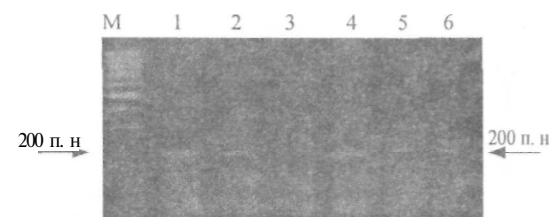


Рис. 4. Електрофореграма продуктів інтерферон-специфічної реакції ЗТ-ПЛР при регенерації

М - маркер. На доріжки нанесено продукти реакції ЗТ-ПЛР з РНК, виділеної з інтактної (доріжка 1) та регенеруючої печінки через 0,5 год (доріжка 2), 1 год (доріжка 3), 3 год (доріжка 4), 6 год (доріжка 5) та 12 год (доріжка 6) після ЧГЕ.

При лапаратомії, коли щурам розрізають черевну порожнину, торкаються печінки і зашивають черевну порожнину, експресія гена α -інтерферону не визначається.

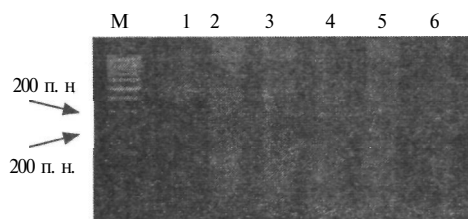


Рис. 5. Електрофореграма продуктів інтерферон-специфічної реакції ЗТ-ПЛР при лапаратомії

М - маркер. На доріжки нанесено продукти реакції ЗТ-ПЛР з РНК, виділеної з інтактної печінки (доріжка 1) та печінки через 0,5 год (доріжка 2), 1 год (доріжка 3), 3 год (доріжка 4), 6 год (доріжка 5) та 12 год (доріжка 6) після лапаратомії.

Рівень мРНК гена рецептора до інтерферону майже не змінюється впродовж 12 год після ЧГЕ.

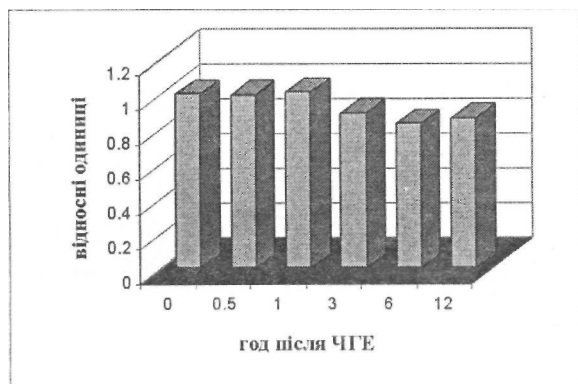


Рис. 6. Рівень рецептор-специфічної мРНК, нормалізованої відносно 512-специфічної мРНК

Що стосується двох інтерферон-індукованих генів, які кодують протеїнкіназу R та рибонуклеазу L, то кількість їх мРНК коливається протягом 12 год регенераційного процесу.

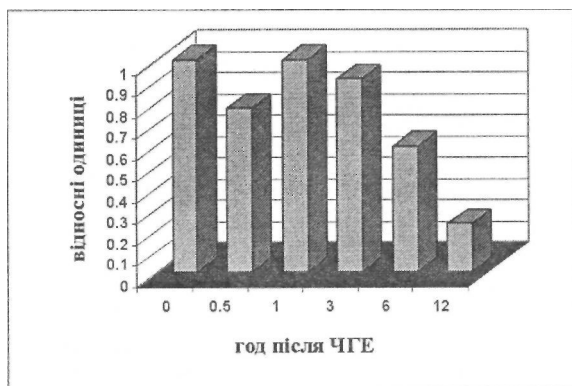


Рис. 7. Рівень PKR-специфічної мРНК, нормалізованої відносно 812-специфічної мРНК

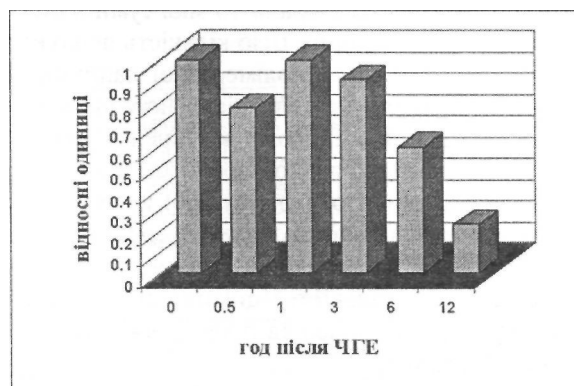


Рис. 8. Рівень РНКазі L-специфічної мРНК, нормалізованої відносно 512-специфічної мРНК

Через 0,5 год спостерігається зниження рівня мРНК порівняно з їх рівнем в інтактній печінці, а через 1-3 год - відновлення доопераційного рівня мРНК цих молекул. Перед синтетичною фазою у гепатоцитах, а саме через 12 год після ЧГЕ, їх кількість знову зменшується.

Підсумовуючи отримані результати, можна стверджувати: усі досліджувані гени, які кодують IFN α t, РНКазу L та PKR, експресуються, щонайменше на рівні мРНК, в інтактній печінці щурів.

Рівень досліджуваних РНК у складі нефракціонованої РНК регенеруючої печінки дещо знижується через 0,5 год після ЧГЕ та істотно знижується через 12 год після операції. Інші зареєстровані зміни мають більш диференційований характер. Відносний вміст РНК, яка кодує IFN α , наполовину зменшується через 1 год після ЧГЕ і на чверть підвищується через 3 год після ЧГЕ порівняно з відповідною величиною в інтактній печінці. Поступове зниження відносного вмісту всіх досліджуваних РНК, яке спостерігається від 6-ї до 12-ї год, найбільшою мірою проявляється для РНК, яка кодує РНКазу L. Інші РНК відповідно до того, наскільки знижується їх відносний вміст у нефракціонованій РНК регенеруючої печінки, розташовуються в спадній послідовності мРНК PKR > мРНК IFN α > мРНК IFNR.

Суттєвих змін зазнає експресія гена IFN α після лапаратомії. За тих же умов реакції ЗТ-ПЛР, які використані в нашому дослідженні для визначення мРНК IFN α в регенеруючій печінці, специфічний продукт ампліфікації не виявляється через 0,5, 1, 3, 6 та 12 год після лапаратомії.

При обговоренні результатів слід зазначити, що виявлена нами на рівні РНК експресія генів РНКазі L, PKR та рецептора IFN α в інтактній печінці узгоджується з існуючими в літературі даними. Експресія РНКазі L у ссавців відбувається в різних тканинах, у тому числі печінці, та в клітинних лініях без попереднього введення тваринам інтерферону або обробки ним клітин генів, які кодують PKR [13; 14; 15] та рецептор до

IFNa/β [16]. Про експресію IFNa в інтактній печінці свідчать не тільки наші дані про наявність IFNa-специфічної РНК у нефракціонованій РНК печінки, а й визначення IFNa-специфічної антивірусної активності в кислотостійкій фракції гомогенату печінки (неопубліковані дані). У миші продукція IFNa і, відповідно, активація макрофагів, які його продукують, відбувається в два етапи. На першому етапі, який називають праймуванням, будь-який специфічний чинник вперше індукуює експресію гена на низькому рівні. Макрофаги при цьому не набувають цитотоксичної активності. На другому етапі повторна дія специфічного чинника зумовлює виражену активацію експресії гена з набуттям макрофагами цитотоксичності [17]. Шури, на відміну від мишей, мають видові особливості активації макрофагів, їх макрофаги вже в ембріональному періоді перебувають у стані праймування. Навіть макрофаги шурів спеціальної лінії, які не мають в організмі мікробів (germ-free), теж праймовані, тобто експресують IFNa [18].

Подальшого обговорення потребують два край принципових результати. По-перше, це вражаюча відмінність між експресією IFNa в регенеруючій печінці та її повною відсутністю в печінці після лапаротомії. До речі, останнє підтверджується відсутністю антивірусної активності в кислотостійкій фракції гомогенату печінки (неопубліковані дані). По-друге, це зменшення відносного вмісту досліджуваних РНК. Воно кількісно незначне і має скороминущий характер через 0,5 год після ЧГЕ і значне (від 40 до 80 %) через 12 год після ЧГЕ, починаючись за нашою часовою шкалою дослідження з 6 год після ЧГЕ. Процес відновлення маси і функції органу після ЧГЕ складний. Умовно реакції, які відбуваються в органі, можна поділити на реакції гострої фази, місцеві та системні, та на компенсаторні реакції. Останні містять реакції підтримки функцій першорядного значення, реакції, пов'язані зі зміною фенотипу, який існував до операції, та реакції відновлення клітинної маси органу [3]. Лапаротомія в печінці зумовлює реакцію гострої фази. Отримані дані свідчать про те, що експресія IFNa виключається щонайменше в обраних нами часових пунктах реакції гострої фази. Водночас експресія α-інтерферону видається необхідною в пререплікативному періоді клітинного циклу печінки, яка регенерує. На сьогодні ми не знаємо, яка функція інтерферону є принципово важливою для пререплікативного періоду і є несумісною з проходженням реакції гострої фази.

Зменшення відносного вмісту досліджуваних РНК у нефракціонованій РНК печінки можна пов'язати з роллю α-інтерферону та його мішеней як негативних регуляторів деяких процесів. Незначне зменшення відносного вмісту дослід-

жуваних РНК, які кодують IFNa, PKR та РНКазу L, через 0,5 год після ЧГЕ можна пов'язати з первинною адаптивною відповіддю органа на видалення його двох третин, яке відбувається в цей час. Первинна відповідь полягає в активації численних функцій органа в межах норми реакції і перевірки достатності цієї адаптивної відповіді для життєдіяльності організму [3]. α-інтерферон через активацію деяких своїх мішеней здатний блокувати білковий синтез. Протеїнкіназа R фосфорилує еукаріотичний фактор ініціації трансляції eIF-2, який у фосфорильованому стані блокує ініціацію трансляції. Продукт гена ISG56 (інтерферон-стимульований ген 56) взаємодіє з субодиницею Р48 третього фактору ініціації трансляції eIF3, що, своєю чергою, також унеможливорює ініціацію трансляції. Продукт іншого гена, транскрипція якого індукується α-інтерфероном, - білок Р204 з родини білків Р200 блокує в ядрі транскрипцію рибосомальної РНК, оскільки зв'язується з транскрипційним фактором UBP1 [19]. Крім того, частина клітинної РНКазы L локалізується в мітохондріях, і її частка зростає після обробки клітин α-інтерфероном. Рибонуклеаза L суттєво зменшує стабільність мітохондріальних РНК і таким чином порушує функцію мітохондрій. Це показано на прикладі РНК, які кодують цитохром b, АТФазу 6 та II субодиницю цитохром оксидази [20], цитохром оксидазу III та деякі інші білки ND5, ND4 і 4L [21]. Враховуючи такий характер дії α-інтерферону та його мішеней, а також припускаючи, що рівень досліджуваних нами РНК узгоджується з рівнем відповідних білків, можна дійти висновку, що первинна адаптивна реакція вимагає пригнічення експресії досліджуваних генів.

Таким же чином можна пояснити зміни в рівні досліджуваних РНК, які відбуваються з 6-ї по 12-ту годину після ЧГЕ. Цей етап відповідає пререплікативному періоду клітинного циклу гепатоцитів. Відомо, що α-інтерферон має антипроліферативну активність не тільки завдяки вищезгаданій здатності блокувати білковий синтез і порушувати функцію мітохондрій, а й завдяки активації супресорів та інгібування активаторів клітинного циклу. В літературі є дані про активацію α-інтерфероном супресора клітинного циклу, р21 [22; 23; 24] та інактивацію циклінів D1 та E [22].

Отримані нами дані свідчать про антипроліферативний ефект α-інтерферону та його мішеней.

Питання про роль α-інтерферону в пререплікативному періоді, про механізм його інактивації на певних етапах пререплікативного періоду, а також впродовж певного періоду гострої фази залишається відкритим. Досліджувані й охарактеризовані нами моделі *in vivo* можуть бути прийнятними для з'ясування цих питань.

Висновки

Гени, які кодують ІФНа, РНКазу L, PKR та рецептор до ІФНа, експресуються на рівні РНК в інтактній печінці щурів.

Експресія на рівні РНК гена, який кодує ІФНа, необхідна для проходження пререплікативного періоду клітинного циклу в регенеруючій печінці щурів і несумісна з початковим етапом реакції гострої фази, який є складовим компонентом регенераційного процесу протягом пререплікативного періоду.

Тимчасове незначне зниження експресії генів, які кодують ІФНа, РНКазу L, PKR та рецептор до ІФНа, через 0,5 год після ЧГЕ і більш виражене зниження експресії в інтервалі 6-12 год після ЧГЕ свідчать про роль ІФНа та досліджуваних його мішеней як негативних регуляторів неіндефікованих процесів у регенеруючій печінці. Отже, впродовж пререплікативного періоду регенераційного процесу ІФНа виконує роль як позитивного, так і негативного регулятора.

1. Гилберт С. Биология развития. - М., 1993-1995. - Т. 1-3.
2. Obolenskaya M. Yu. Cytokines and liver regeneration // EOS - J. Immunology and Immunopharmacology. - 1997. - V. 17. - № 2. - P. 51-58.
3. Оболенская М. Ю., Кэлье М., Сазонова Л. Я. Т 5' олиго(А) синтетазная активность на ранних этапах регенерационного процесса в печени крыс // Биополимеры и клетка. - 1997. - Т. 13. - № 5. - С. 391-396.
4. Obolenskaya M. Yu., Sazonova L., Rybalko S., Bisbal C. RNase L and genome expression during early period of liver regeneration at the rats // Биополимеры и клетка. - 2000. - Т. 16. - № 5. - С. 380-383.
5. Kerrl. M., Brown R. E., Ball L. A. Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment // Nature. - 1974. - V. 250. - № 461. - P. 57-59.
6. Higgins G. M., Anderson R. M. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal // Arch. Pathol. - 1931. - V. 12. - № 1. - P. 186-202.
7. Sambrook E., Fritsch E. E., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. - N.Y.: Cold Spring Harbor, 1989. - 545 p.
8. Dijkema R., Pouwels P., Reus A. de, Schellekens H. Structure and expression in *Escherichia coli* of a cloned rat interferon-alpha gene // Nucl. Acids Res. - 1984. - V. 12. - № 2. - P. 1227-1242.
9. Mellor K., Flowers K. M., Kimball S. R., Jefferson L. S. Cloning and characterization of a cDNA encoding rat PKR, the double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor-2 kinase // Biochim. Biophys. Acta. - 1994. - V. 1219. - № 3. - P. 693-696.
10. Hummer B. T., Hassel B. A. Rattus norvegicus 2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent ribonuclease L (Rnasel) mRNA. - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=32996724>.
11. Lin A., Chan Y. L., Jones R., Wool I. G. The primary structure of rat ribosomal protein S12. The relationship of rat S12 to other ribosomal proteins and a correlation of the amino acid sequences of rat and yeast ribosomal proteins // J. Biol. Chem. - 1987. - V. 262. - № 29. - P. 14343-14351.
12. Silverman R. H. Ribonucleases: Structures and Functions (D'Alessio G., Riordan J. F., eds). - N. Y., 1997. - P. 515-551.
13. Clemens M. J. PKR-a protein kinase regulated by double-stranded RNA // Int. J. Biochem. Cell Biol. - 1997. - V. 29. - № 7. - P. 945-949.
14. Williams B. R. G. PKR; a sentinel kinase for cellular stress // Oncogene. - 1999. - V. 18. - P. 6112-6120.
15. Meurs E., Chong K., Galabru J., Thomas N. S. B., Kerr I. M., Williams B. R. G., Hovanessian A. G. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA activated protein kinase induced by interferon // Cell. - 1990. - V. 62. - P. 379-390.
16. <http://expression.gnf.org/cgi-bin/index.cgi> Gene Expression Atlas
17. Stewart W. E. II, Gosser L. B., Lockart R. Z. Jr. Priming: a non-antiviral function of interferon // J. Virol. - 1971. - V. 7. - № 6. - P. 792-801.
18. Decker T., Lohmann-Matthes M. L., Karck U., Peters T., Decker K. Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages // J. Leukocyte Biology. - 1989. - V. 45. - P. 139-146.
19. Sen G. C. Viruses and interferons // Annu. Rev. Microbiol. - 2001. - V. 55. - P. 255-281.
20. Roy E., Bisbal C., Silhol M., Martinand C., Lebleu B., Salehzada T. The 2-5A/RNase L/RNase L Inhibitor (RNI) Pathway Regulates Mitochondrial mRNAs Stability in Interferon alpha-treated H9 Cells // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - № 51. - P. 48473-48482.
21. Chandrasekaran K., Mehrabian Z., Li X. L., Hassel B. RNase-L regulates the stability of mitochondrial DNA-encoded mRNAs in mouse embryo fibroblasts // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2004. - V. 325. - № 1. - P. 18-23.
22. Nakaji M., Yano Y., Ninomiya T., Seo Y., Hamano K., Yoon S., Kasuga M., Teramoto T., Hayashi Y., Yokozaki H. IFN-alpha prevents the growth of pre-neoplastic lesions and inhibits the development of hepatocellular carcinoma in the rat // Carcinogenesis. - 2004. - V. 25. - № 3. - P. 389-397.
23. Rewms S., Subramaniam M., Howard U. J. A role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in the G1 cell cycle arrest mediated by the type 1 interferons // J. Interferon Cytokine Res. - 1997. - V. 17. - P. 11-15.
24. Sangfelt O., Erickson S., Castro J., Heiden T., Gustafsson A., Einhorn S., Grandér D. Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins // Oncogene. - 1999. - V. 18. - № 18. - P. 2798-2810.

M. Perepelyuk, A. Slonchak, L. Sazonova, O. Gubar, O. Yakunchikova, M. Obolenskaya

EXPRESSION OF GENES THAT ENCODE INTERFERON ALPHA, ITS RECEPTOR, PROTEIN KINASE AND RIBONUCLEASE L IN THE INTACT AND REGENERATING RAT LIVER

The goal of this research is to unravel the role of interferon alpha (IFNa), its receptor (IFNR) and its targets in cellular activity in the absence of viral infection. Two models were used - rat liver after partial hepatectomy (PHE) and after laparotomy, that imitate transition to cell division of highly specialized, pro-

liferatively inactive tissue and acute phase response. With the help of reverse transcription -polymerase chain reaction the relative amount of RNAs, which encode IFNa, IFNR, ribonuclease L (RNase L) and protein kinase R (PKR) was determined in the nonfractionated liver RNA in 0,5, 1, 3, 6, 12h after operations. All studied RNAs are determined in intact liver and in terms of their abundance are arranged in the following line: IFNR mRNA >PKR mRNA >RNase L mRNA >IFNa mRNA. The level of IFNa mRNA after PHE is downregulated at 1h, upregulated at 3h and again downregulated from 6 to 12h after PHE. mRNA of IFNa is not determined in the liver after laparotomy. The levels of the other mRNA temporarily and not durably decrease in 6h after PHE. We suggest that IFNa negatively regulates the acute phase response and G1/S transit and positively regulates not yet detected processes in prereplicative period of regenerative process.