

Інтерферон та протеїнкіназа Р у процесі відновлення печінки щурів після часткової гепатектомії

М. М. Перепелюк, А. В. Куклін, Я. В. Щерба, Б. Т. Токовенко, Н. В. Макогон, А. Гоглер, С. Шале, М. Ю. Оболенська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України
Вул. Академіка Богомольця, 4. Київ, Україна, 01024

²Інститут онкології ім. М. Складовської-Кюрі
Глівіце, Польща

m.m.perepelyuk@imbg.org.ua

Після часткової гепатектомії (ЧГЕ) у клітинах Купфера спостерігається короткочасне виражене зростання експресії гена ІФН α , а в гепатоцитах – підвищення рівня РНК протеїнкінази Р (ПКР), за яким збільшується вміст ІФН α -РНК. Лапаротомія спричиняє в клітинах Купфера та гепатоцитах стрімке зниження концентрації ІФН α -РНК. Вміст мРНК ПКР після операції зменшується. Білок ПКР ви- значається в ядрах і цитоплазмі гепатоцитів в інтактній печінці та печінці після ЧГЕ і лапаротомії в усі досліджувані строки, окрім 6 год після ЧГЕ, коли він присутній у цитоплазмі і майже не виявляється у ядрі. Експресія досліджуваних генів у клітинах обох типів має виражений клітинспецифічний характер і свідчить про активацію та інгібування системи ІФН α відповідно в процесі відновлення печінки після ЧГЕ та реакції гострої фази після лапаротомії.

Ключові слова: інтерферон α , протеїнкіназа Р, регенерація печінки.

Вступ. Регенерація печінки після механічного або токсичного ушкодження є складним багатокомпонентним процесом, який регулюється в часі і просторі та спрямований на відновлення маси органу і його функцій. У попередніх роботах нами вперше показано, що на ранньому етапі регенерації у печінці щурів активується синтез інтерферону альфа (ІФН α) [1], що разом з повідомленнями стосовно участі інших компонентів системи (innate immunity) вродженого імунітету [2] свідчить про важливу роль цієї системи в запуску регенераційного процесу. Мета представленої роботи по-

лягає у детальнішому вивченні ролі ІФН α та його мішеней у відновлювальному процесі печінки з урахуванням складної клітинної будови цього органа.

Тканина печінки складається з клітин різного походження – паренхімних (гепатоцитів) і непаренхімних (ендотеліальних, осілих макрофагів, або клітин Купфера, Pit-клітин, перисинусоїдальних). Для дослідження експресії генів системи ІФН α нами обрано гепатоцити та клітини Купфера. Перші відповідають переважно за роботу «біохімічної лабораторії» організму (печінки), а другі як типові макрофаги виконують захисну функцію і синтезують численні цитокіни та ейкозаноїди [3]. В коло

досліджень входять гени, що кодують ІФН β , протеїназу Р (ПКР), експресія якої серед інших факторів індукується ІФН β , а також ген, що кодує рецептор до ІФН β (ІФНР) як необхідний посередник для передачі сигналу від ІФН β до гена ПКР.

ПКР – це фермент (ЕС 2.7.11.1), який водночас є серин-треоніною кіназою для білків-субстратів і тирозиновою кіназою при автофосфорилуванні, тобто йому притаманна подвійна специфічність [4]. ПКР переходить з ферментативно неактивного в активний стан після фосфорилування та кодується однією копією гена, який знаходиться в локусі 6q11.6-ї хромосоми генома щура і має в промоторі стимульований інтерфероном сайт відповіді (ISRE – interferon-stimulated responsive element) з досить високим коефіцієнтом подібності (0,77) до ISRE-матриці, за даними програми COTRASIF [5].

Окрім кіназної, ПКР виконує функцію адаптора численних внутрішньоклітинних білків. Все це зумовлює його багатофункціональність [4] і сприяє розповсюдженню впливу його індукторів, зокрема ІФН β . Білок ПКР регулює процеси трансляції та передачу різних внутрішньоклітинних сигналів [4]. Він активується дволанцюговою РНК, а також внутрішньоклітинним білком РАСТ/РАХ і 5'-нетрансльованими ділянками деяких мРНК [4]. По відношенню до ІФН β він є одночасно мішенню для індукції ІФН β та опосередкованим індуктором гена ІФН β [4].

У роботі використано дві моделі – печінку щурів після часткової гепатектомії (ЧГЕ) та як контроль – печінку після лапаратомії (ЛАП), що відповідно імітують перехід до поділу високодиференційованої проліферативно неактивної тканини і реакцію гострої фази як складової частини відповіді на ЧГЕ. Дослідження проводили протягом перших 12 год після операцій, що відповідає перехідному та пререплікативному періодам першого клітинного циклу гепатоцитів після ЧГЕ.

Матеріали і методи. Експерименти проведено на самицях нелінійних щурів масою 200–250 г. Операції ЧГЕ та ЛАП виконували за стандартною процедурою [6]. Гепатоцити і клітини Купфера виділяли модифікованим методом Беррі і Френда [7]. Експресію генів визначали на рівні мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у

реальному часі (кПЛР-РЧ) та на рівні білка – Вестерн-блот-аналізом.

РНК виділяли за стандартним методом Хомчинського [8]. Зразки РНК послідовно піддавали ДНКазній обробці та зворотній транскрипції з випадковими гексамерними праймерами [9]. Підбір праймерів для ПЛР і перевірку їхньої якості описано нами раніше [1]. Для побудови стандартної кривої для кПЛР-РЧ специфічні амплікони напруцьовували, очищували та клонували за стандартним методом з подальшим використанням або ампліконів, або рекомбінантної плазмідної ДНК.

Відповідь ПКР на ЧГЕ порівнювали з її реакцією у культивованих гепатоцитах на дію ІФН β . Для цього гепатоцити культивували впродовж доби після виділення в середовищі Вільямса без сироватки, змінювали середовище і культивували протягом 3, 6 та 12 год за присутності 250 од/мл ІФН β («Sigma», США) та без нього. Після інкубації клітини відмивали розчином PBS, виділяли РНК за методом Хомчинського за допомогою реактиву Trizol («Qiagen», США) та проводили кПЛР-РЧ, як описано вище.

Рівень білка ПКР у лізатах клітин, отриманих стандартним методом, оцінювали за допомогою Вестерн-блот-аналізу [9] з антитілами до ПКР-специфічного антигену («Sigma», США). Результати нормалізували за рівнем тотального білка тієї ж проби після його електрофорезу, візуалізації барвником понсо червоним та денситометрії. Локалізацію білка ПКР у клітинах печінки визначали імуногістохімічним забарвленням препаратів тканини печінки, яку за стандартним методом вміщували в парафін [9].

Результати і обговорення. *Рівень ІФН β , ІФНР- і ПКР-специфічних РНК та вміст білка ПКР у гепатоцитах і клітинах Купфера після операцій.* Як видно з рис.1, а, вміст ІФН β -специфічної мРНК суттєво і тимчасово зростає в клітинах Купфера після ЧГЕ. Відомо, що клітини Купфера перебувають у стані праймування щодо продукування ІФН β . Навіть макрофаги щурів спеціальної лінії, які не мають в організмі мікробів (germ-free), теж праймовані, тобто експресують ІФН β [10]. Тому макрофаги щурів завжди готові до термінового продукування ІФН β . Цим можна пояснити швидке

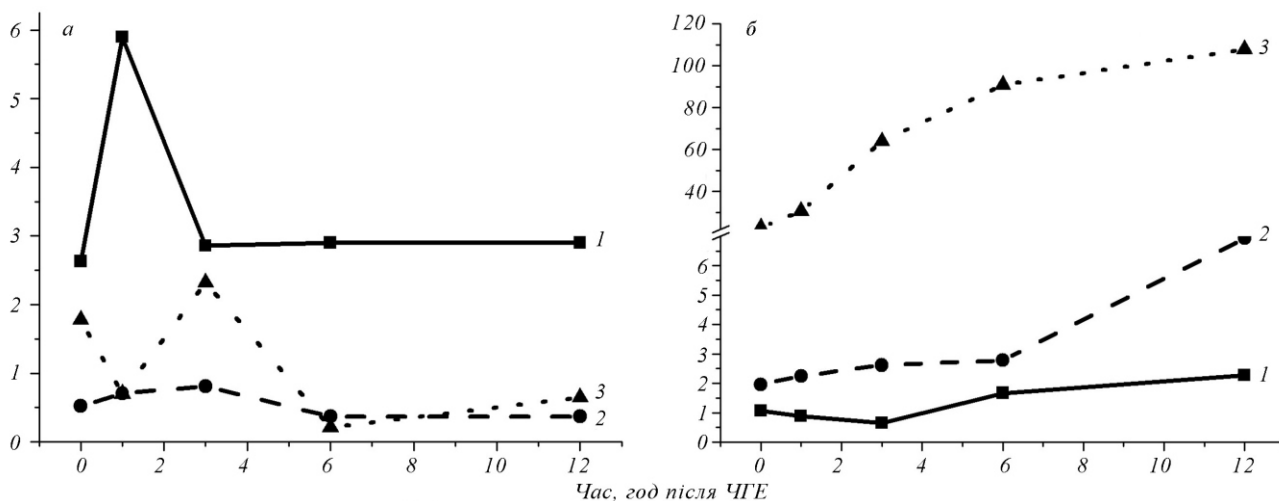


Рис. 1. Рівень досліджуваних РНК у клітинах Купфера (а) та в гепатоцитах (б), виділених із регенеруючої печінки шурів: 1 – ІФН ; 2 – ІФНР1; 3 – протеїнкiназа Р. По осі ординат – амоль специфічної мРНК/мг тотальної РНК

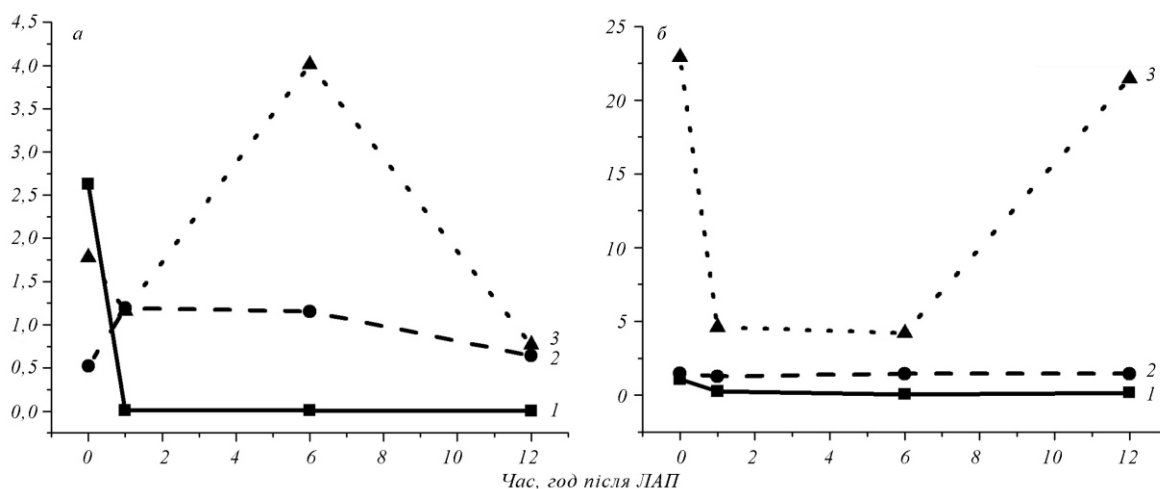


Рис. 2. Рівень досліджуваних РНК у клітинах Купфера (а) та в гепатоцитах (б), виділених із печінки шурів після лапаротомії: 1 – ІФН ; 2 – ІФНР1; 3 – протеїнкiназа Р. По осі ординат – амоль специфічної мРНК/мг тотальної РНК

підвищення експресії гена ІФН в клітинах Купфера у відповідь на ЧГЕ, яке супроводжується зростанням рівня білка за даними біологічного тесту [11]. Останній полягає у визначенні резистентності клітин невриноми гассерового вузла шурів до дії вірусу везикулярного стоматиту після обробки їх ІФН чи рідинами, що містять ІФН. Ми припустили, що синтезований ІФН секретується і зв'язується з рецепторами як на клітинах Купфера, так і на прилеглих клітинах і передає сигнал всередину клітин. Вірогідно, що як типовий індуктор гена ПКР він обумовлює суттєве підвищення концентрації ПКР-РНК у гепатоцитах та незначне коливання – в клітинах Купфера (рис. 1, а, б).

Щоб з'ясувати, наскільки підвищення рівня ПКР-РНК у гепатоцитах може бути зумовлене дією ІФН, ми культивували первинні гепатоцити за присутності ІФН впродовж 12 год. Контролем слугували клітини, необроблені ІФН. Вміст ПКР-РНК в оброблених клітинах досягає піка через 6 год після початку інкубації та знижується через 12 год. Він суттєво не змінюється в необроблених ІФН клітинах.

Порівняння експресії гена ПКР *in vivo* та *in vitro* свідчить про те, що, крім ІФН, інші фактори, найвірогідніше, це сигнали від Toll-like рецепторів [4], можуть бути причетні до експресії гена ПКР протягом досліджуваних 12 год після ЧГЕ.

Упродовж пререплікативного періоду в гепатоцитах спостерігається також підвищення ІФНР1-РНК та ІФН -РНК. Відомо, що зв'язування ІФН з рецептором зменшує період напівжиття рецептора [12] і таким чином сприяє зростанню експресії гена, який його кодує. Збільшення вмісту ІФН -РНК може бути результатом індукуючої дії білка ПКР, який переходить із ядра в цитоплазму та тимчасово акумулюється там.

Експресія досліджуваних генів після лапаратомії принципово відрізняється від їхньої експресії після ЧГЕ. Рівень ІФН РНК стрімко знижується в клітинах Купфера та в гепатоцитах (рис. 2, а, б), що підтверджується падінням концентрації білка за даними біологічного тесту [11]. Пригнічення експресії гена ІФН може свідчити про його роль негативного регулятора в реакції гострої фази. Вміст ІФНР1-РНК не зазнає суттєвих змін. У той же час рівень ПКР-РНК тимчасово підвищується в клітинах Купфера, зумовлюючи відповідне зростання вмісту ПКР (даних не наведено). В гепатоцитах, навпаки, він знижується і повертається до вихідного значення протягом 12 годин. Тобто в клітинах обох типів зміни в експресії гена ПКР після ЧГЕ та ЛАП мають протилежний характер.

Ще одне спостереження стосується невідповідності в змінах рівня ПКР-РНК у гепатоцитах після ЧГЕ і лапаратомії до вмісту білка, який залишається майже постійним після обох операцій (даних не наведено). Причини такої розбіжності поки що не з'ясовані.

Зіставлення експресії досліджуваних генів у клітинах обох типів свідчить про клітинну специфічність експресії відповідних генів і про активацію та інгібування системи ІФН відповідно в процесі відновлення печінки та реакції гострої фази після лапаратомії.

Субклітинна локалізація білка ПКР у клітинах печінки після ЧГЕ та лапаратомії. За даними імуногістохімічного аналізу, білок ПКР виявляється в гепатоцитах як суцільне дрібнодисперсне забарвлення, а в клітинах Купфера – у вигляді інтенсивно коричневих гранул. Привертає увагу той факт, що в гепатоцитах, незважаючи на відсутність суттєвих змін у загальному вмісті білка ПКР після двох операцій, спостерігаються відмінності у його

внутрішньоклітинному розподілі. У печінці інтактних тварин ПКР відмічена в ядрі та цитоплазмі гепатоцитів, що корелює з існуючими відомостями щодо розміщення цього білка в клітині [13]. Після лапаратомії розподіл білка між ядром і цитоплазмою суттєво не змінюється. Однак до 6-ї год після ЧГЕ ядро майже звільняється від білка, який виявляється лише в цитоплазмі. Через 12 год після ЧГЕ він знову визначається в ядрі.

За даними літератури, у цитоплазмі може бути декілька лігандів білка ПКР. Найвивченішими є зв'язок білка ПКР з малою субодиноцею рибосом 40S та його регуляторна роль у процесі трансляції через фосфорилування фактора ініціації трансляції eIF2 [4]. Оскільки при регенерації кількість рибосом зростає для забезпечення білкового синтезу [14], то перехід ПКР із ядра в цитоплазму з можливою участю в регуляції трансляції виглядає правдоподібно, але це припущення потребує експериментальної перевірки. Окрім малої субодиноці рибосом, ПКР може зв'язуватися з різними білками сигнальних шляхів і таким чином модулювати їхню активність [4].

Висновки. Система вродженого імунітету, зокрема, експресія генів ІФН , його мішені гена ПКР та гена ІФНР1 специфічно активується у відповідь на ЧГЕ та інгібується у відповідь на лапаратомію. На виділених клітинах показано, що саме клітини Купфера відповідають за початкове зростання ІФН -специфічної мРНК після ЧГЕ. Лапаратомія спричиняє стрімке падіння концентрації мРНК ІФН в обох типах клітин. Експресія генів ІФН , ПКР та ІФНР1 і їхня відповідь на ЧГЕ та ЛАП мають клітинноспецифічний характер. У процесі переходу гепатоцитів від стану спокою до проліферації відбувається перерозподіл білка ПКР між ядром і цитоплазмою з тимчасовим виявленням білка ПКР лише в цитоплазмі.

M. M. Perepelyuk, A. V. Kuklin, Ia. V. Shcherba, B. T. Tokovenko, N. V. Makogon, A. Gogler, S. Szala, M. Yu. Obolenskaya

Interferon and protein kinase R during rat liver restoration after partial hepatectomy

Summary

The paper is devoted to validation of our hypothesis concerning an obligatory involvement of innate immune response in a liver transition from quiescence to proliferation. Our research is focused

on the expression of IFN α , its receptor (first subunit) and its target – protein kinase R (PKR) during first 12 hours after regenerative stimulus. Two models were used – rat liver after partial hepatectomy (PHE) and after laparotomy, that imitate transition of inactive liver cells to proliferation and acute phase response as a component of liver response to PHE, correspondingly. After PHE a short-term increase in IFN α expression is revealed in Kupffer cells. In hepatocytes PKR – mRNA up-regulation takes place, followed by an increase in IFN α – mRNA production. Taking into account the dual function of PKR as a target and inducer of IFN α , we suggest that secretion of IFN α by Kupffer cells leads to the activation of PKR gene expression in hepatocytes, in which the product of PKR gene in its turn provokes an increase in the IFN α gene expression. After laparotomy the IFN α expression is down-regulated in Kupffer cells and hepatocytes. The expression of PKR – gene is opposite to that, observed after PHE – the level of PKR-RNA decreases in hepatocytes and transiently increases in Kupffer cells. PKR protein is detected in nuclei and cytoplasm in hepatocytes in intact liver and liver after laparotomy while it is concentrated in cytoplasm after 6 hours post-PHE, releasing nuclei from antigen. The expression of all investigated genes is cell-specific. It reveals respectively the activation and inhibition of IFN α system that is characteristic of the liver restoration and acute phase reaction.

Keywords: interferon α , protein kinase R, liver regeneration.

М. М. Перепелюк, А. В. Куклин, Я. В. Щерба, Б. Т. Токовенко, Н. В. Макогон, А. Гоглер, С. Шале, М. Ю. Оболенская

Интерферон α и протеинкиназа Р в процессе восстановления печени крыс после частичной гепатэктомии

Резюме

После частичной гепатэктомии (ЧГЭ) в клетках Купффера наблюдается кратковременный выраженный подъем экспрессии гена ИФН α , а в гепатоцитах повышается количество РНК протеинкиназы (ПКР), вслед за чем возрастает уровень ИФН α -РНК. Лапаротомия в клетках Купффера и гепатоцитах приводит к резкому снижению содержания ИФН α -РНК. Реакция ПКР на операцию является противоположной таковой на ЧГЭ. Белок ПКР определяется в ядрах и цитоплазме гепатоцитов в интактной печени и печени после лапаротомии во все исследованные сроки, кроме 6 ч после ЧГЭ, когда он присутствует в цитоплазме и не выявляется в ядре. Экспрессия исследуемых генов в клетках обоих типов имеет выраженный клеточноспецифический характер и свидетельствует об активации и ингибировании системы ИФН α соответственно в процессе восстановления печени и реакции острой фазы после лапаротомии.

Ключевые слова: интерферон α , протеинкиназа Р, регенерация печени.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Perepelyuk M., Slonchak A., Sazonova L., Gubar O., Yakunchikova O., Obolenskaya M. Expression of genes, which encode IFN α , its receptor, protein kinase R and ribo-

- nuclease L in the intact and regenerating rat liver // Sci. proc. of NaUKNA // Biol. and Ecol.–2005.–**43**.–P. 25–33.
2. Strey C. W., Markiewski M., Mastellos D., Tudoran R., Spruce L., Greenbaum L., Lambris J. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration // J. Exp. Med.–2003.–**198**, N 6.–P. 913–923.
3. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells) // Eur. J. Biochem.–1990.–**192**, N 2.–P. 245–261.
4. Garcia M. A., Gil J., Ventoso I., Guerra S., Domingo E., Rivas C., Esteban M. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action // Microbiol. Mol. Biol. Rev.–2006.–**70**, N 4.–P. 1032–1060.
5. Tokovenko B., Golda R., Protas O., Obolenskaya M., El'skaya A. COTRASIF: conservation-aided transcription factor binding site finder // Nucl. Acids Res., doi 10.1093/nar/gkp084.
6. Higgins G. M., Anderson R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal // Arch. Pathol.–1931.–**12**, N 2.–P. 186–202.
7. Berry M. N., Friend D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study // J. Cell Biol.–1969.–**43**, N 3.–P. 506–520.
8. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium. Thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem.–1987.–**162**.–P. 156–159.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning / Ed. N. Ford.–New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.–Vol. 3.–355 p.
10. 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. Leukoc. Biol.–1989.–**45**, N 2.–P. 139–146.
11. Perepelyuk M. M., Fedorchenko D. B., Rybalko S. L., Obolenskaya M. Yu. Interferon α expression in the rat liver after partial hepatectomy // Biopolymers and Cell.–2006.–**22**, N 4.–P. 283–290.
12. Marijanovic Z., Ragimbeau J., Kumar S., Fuchs S., Pellegrini S. TYK2 activity promotes ligand-induced IFNAR1 proteolysis // Biochem. J.–2006.–**397**.–P. 31–38.
13. Jeffrey I. W., Kadereit S., Meurs E. F., Metzger T., Bachmann M., Schwemmle M., Hovanessian A. G., Clemens M. Nuclear localization of the interferon-inducible protein kinase PKR in human cells and transfected mouse cells // Exp. Cell. Res.–1995.–**218**, N 1.–P. 17–21.
14. Drews J., Brawerman G. Alterations in the nature of ribonucleic acid synthesized in rat liver during regeneration and after cortisol administration // J. Biol. Chem.–1967.–**242**, N 5.–P. 801–808.

УДК 577.245

Надійшла до редакції 15.12.08