

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

---

**КУКЛІН Андрій Володимирович**

УДК 577.245

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ В ІНТАКТНИХ  
ГЕПАТОЦИТАХ ТА ПЕЧІНЦІ ЩУРА ПІД ЧАС ЇЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ**

03.00.03 – молекулярна біологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ-2016

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії системної біології відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук,  
професор  
**Оболенська Марія Юріївна,**  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач лабораторії системної біології  
відділу ензимології білкового синтезу.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук,  
професор, член-кореспондент НАН України  
**Скок Марина Володимирівна,**  
Інститут біохімії імені О.В.Палладіна НАН України,  
завідувач лабораторії імунології клітинних рецепторів;

доктор біологічних наук,  
професор, член-кореспондент НАН України  
**Стойка Ростислав Стефанович,**  
Інститут біології клітини  
завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу.

Захист відбудеться 25-го жовтня 2016 р. о 10:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано 24 «вересня» 2016 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
к.б.н., с.н.с.

І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Регенерація печінки - це складний процес, що тонко регулюється в часі та просторі факторами різноманітної природи на внутрішньоклітинному, позаклітинному та системному рівнях. Хоча регенерація здебільшого не притаманна високодиференційованим тканинам, регенерація печінки є винятком із цієї закономірності. При моделюванні регенерації печінки шляхом видалення 2/3 органу біля 95% клітин печінки, які в інтактному органі не діляться і знаходяться у фазі G0 поза клітинним циклом, переходять з G0 в G1 фазу і поступово проходять всі наступні фази клітинного циклу, і вже за тиждень маса печінки відновлюється до початкового рівня. Клітини печінки, що регенерує, продовжують виконувати свої специфічні функції для забезпечення життєдіяльності всього організму (Fausto 2001).

На сьогоднішній день відомі численні фактори, які забезпечують перехід клітин печінки від стану спокою до поділу під час регенерації. До них відносяться як мітогени, такі як фактор росту гепатоцитів (Hepatocyte Growth Factor – HGF), епідермальний фактор росту (Epidermal Growth Factor – EGF), фактор росту ендотелію судин (Vascular Endotelium Growth Factor – VEGF), так і молекули, що підсилюють дію ростових факторів шляхом забезпечення компетентності клітин печінки до відповіді на мітогенні сигнали (Bottaro 1991, Moolten 1967, Taniguchi 2001, De l’Hortet 2012). У цьому беруть участь багато факторів, які є компонентами системи вродженого імунітету, як наприклад, фактор некрозу пухлин (TNF $\alpha$ ), інтерлейкін-6 і -4 (IL-6, -4), білки комплементу, а також активатори вродженого імунітету – ліпополісахариди (DeAngelis 2012, Obolenskaya 1994, Fujita 2001, Markiewski 2009). Жоден із факторів, які регулюють регенерацію печінки не є визначальним для успішної регенерації, оскільки нокаут за будь-яким із відповідних генів викликає лише в більшій чи меншій мірі затримку відновлення органу. Це свідчить про надлишковий характер дії регуляторних факторів, що забезпечують успішність відновлення органу навіть при пошкодженні окремих ланок регенераційного процесу, але в той же час не виключає участі інших ймовірних факторів в складній регуляторній мережі відновлення печінки. Дослідження механізмів регуляції регенерації печінки має не тільки фундаментальне, але й суттєве практичне значення, оскільки як хронічний гепатит, так і ушкодження печінки лікарськими та іншими токсичними речовинами призводять до порушення функцій клітин печінки і до регенерації печінки, яка завершується або відновленням функцій або загибеллю клітин в разі незадовільної регенерації (Taub R 2003). Від процесу регенерації також залежить успішність проведення трансплантації печінки, при якій відбувається відновлення печінки як у донора, так і у реципієнта.

Об'єктом дослідження в даній роботі був інтерферон альфа (IFN $\alpha$ ) як найактивніший цитокін системи вродженого імунітету і потенційний регулятор регенерації печінки після її ушкодження. IFN $\alpha$  може бути залучений на початкових стадіях регенераційного процесу, де поряд із іншими компонентами системи вродженого імунітету IFN $\alpha$  може сприяти змінам у фенотипі клітин печінки, необхідним для відповіді на мітогенний сигнал. Раніше нами було показано, що на ранніх етапах після ушкодження печінки в ній зростає противірусна активність IFN $\alpha$  (Pererelyuk 2006) і, крім того, в тотальній РНК тимчасово зростає вміст мРНК *Ifna*. Отримані нами дані свідчать на користь припущення про участь IFN $\alpha$  в регенераційному процесі, проте залишається невідомим, яку саме роль виконує IFN $\alpha$  у відновленні печінки. Дисертаційну роботу присвячено одержанню додаткових доказів щодо експресії *Ifna* на початку регенераційного процесу в печінці, в паренхімних і непаренхімних клітинах печінки, а також дослідженню можливих функцій IFN $\alpha$  в регенерації через з'ясування особливостей експресії його генів-мішеней.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Зміст дисертації відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота виконувалася в рамках теми «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації трансляції 1 вищих еукаріотів» (шифр теми – 2.2.4.9, № державної реєстрації 0105V005340, 2006-2010 рр.). Дослідження також підтримано грантом Українського Науково-Технологічного Центру (УНТЦ) № 4381 за темою «Новітні технології у вивченні функціональної активності інтерферону альфа» (2007-2009 рр.), короткостроковими грантами ЮНЕСКО для проведення досліджень в Інституті онкології імені М. Склодовської-Кюрі (м. Глівіце, Польща, 2009р.), грантом на виконання українсько-індійського науково-дослідного проекту "Роль модифікуючих ензимів родини TRIM в регуляції інтерферону альфа і виживання клітин печінки при регенерації" на 2015 – 2016 рр. за договором № М/208 -2015 і державною цільовою науково-технічною програмою з впровадження і застосування технологій ГРІД на 2009 - 2013 роки «Розробка нових високо-паралельних методів ГРІД для моделювання мереж генної регуляції для системного аналізу відповіді печінки на дію інтерферону альфа» № Г16-46.

**Мета та завдання дослідження.** Охарактеризувати експресію гена *Ifna* та його генів-мішеней в печінці, що регенерує, впродовж пререплікативного періоду.

Відповідно до мети у роботі вирішували такі завдання:

1. Отримати додаткові докази щодо експресії гена *Ifn $\alpha$*  на рівні мРНК в тканині, ізольованих гепатоцитах і непаренхімних клітинах інтактної печінки і печінки після часткової гепатектомії (ЧГЕ) та лапаротомії (ЛАП).
2. Визначити профіль генної експресії в інтактних первинних гепатоцитах під впливом IFN $\alpha$  за умов максимально наближених до ситуації *in vivo* після ЧГЕ.
3. Верифікувати результати експерименту з мікроареями ДНК шляхом аналізу експресії вибіркового генів методом зворотної транскрипції і кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-кПЛР).
4. Ідентифікувати транскрипційні фактори, які в первинних гепатоцитах можуть опосередкувати дію IFN $\alpha$ .
5. Проаналізувати зміни профілю генної експресії в культивованих гепатоцитах залежно від часу культивування й ідентифікувати «ранні гени» для дослідження їх експресії в печінці після часткової гепатектомії і лапаротомії порівняно з інтактною печінкою.
6. Дослідити зміни рівня мРНК *Tbp* і рРНК *18S* як загальних показників рівня транскрипції і трансляції впродовж пререплікативного періоду регенераційного процесу та відповідного часового проміжку реакції гострої фази після лапаротомії.

*Об'єкт дослідження:* Стан первинних гепатоцитів щура, індукованих IFN $\alpha$ , та клітин печінки на ранньому етапі відновлення, індукованого ЧГЕ, та на відповідному за часом етапі реакції гострої фази, зумовленої лапаротомією.

*Предмет дослідження:* Транскриптом в інтактних первинних гепатоцитах до та після впливу екзогенного IFN $\alpha$ , а також експресія «ранніх генів», визначених в експерименті з мікроареями ДНК, і генів, які кодують *Tbp* і *18S* в печінці щурів під час переходу від спокою до проліферації та на початковому етапі реакції гострої фази.

*Методи дослідження:* молекулярно-біологічні (виділення ДНК, РНК, ЗТ-кПЛР, зворотна транскрипція, молекулярне клонування, *in vitro* транскрипція, гібридизація з мікроареями ДНК); цитологічні методи (виділення та культивування первинних гепатоцитів, отримання фракцій паренхімних і непаренхімних клітин печінки); біоінформаційні методи (стандартний набір програм з аналізу результатів експериментів з мікроареями ДНК, визначення диференційно експресованих генів як збагачених функціональних категорій за тестом Фішера, визначення сайтів зв'язування транскрипційних факторів в промоторах диференційно-експресованих генів за використання позиційно-вагових матриць); операції часткової гепатектомії та лапаротомії.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше визначено особливості змін профілю генної експресії в первинних гепатоцитах щура із використанням мікроареїв олігонуклеотидів ДНК із високою щільністю зондів. Показано, що відповідь клітин печінки на квазіфізіологічну дозу IFN $\alpha$  за умов інкубування впродовж 3-х і 6-и год характеризується збалансованістю експресії генів, задіяних у інгібуванні й активації запальних і відновлювальних процесів на відміну від токсичної дії IFN $\alpha$  в більшій концентрації при довготривалому інкубуванні.

Продемонстровано характерні зміни рівня мРНК *Ifna* після ЧГЕ, у двох мажорних популяціях клітин печінки: гепатоцитах та непаренхімних клітинах. Показано, що після ЧГЕ рівень мРНК *Ifna* стрімко зростає в непаренхімних клітинах із максимумом синтезу на 1 год.

Показано, що після ЧГЕ транскрипційна відповідь з боку генів *Isg15*, *Ube1l*, *Ube2l6*, *Usp18* не співпадає у часі з такою з боку гена *Ifna*. Натомість відповідь з боку гена *Pkr* асоціюється з експресією гена *Ifna*.. Під час реакції гострої фази, що запускається лапаротомією, зміни рівня мРНК генів *Isg15*, *Ube1l*, *Ube2l6*, *Trim25*, *Usp18*, також не пов'язані із активацією експресії гена *Ifna*.. Подібні до генів системи ІСГілування зміни в часі після обох операцій характерні для експресії гена-мішені IFN $\alpha$  – *Irf7*. Це засвідчує, що гени системи ІСГілування і ген *Irf7*, відомі як мішені IFN $\alpha$ , можуть регулюватися іншими, незалежними від IFN $\alpha$ , факторами.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати проведених досліджень із симуляції впливу ендогенного IFN $\alpha$  на клітини печінки під час регенерації печінки поглиблюють існуючі дані про участь цього цитокіну у відновлювальних процесах, а також у процесах, які не пов'язані із вірусною інфекцією. Визначений профіль експресії генів в первинних гепатоцитах під дією IFN $\alpha$  було включено у всесвітню базу даних GEO (Gene Expression Omnibus), звідки дані можуть бути використані іншими дослідниками для біоінформаційного дослідження різноманітних аспектів функціонування гепатоцитів під впливом IFN $\alpha$ . Отриманий в роботі екзогенний контроль Luc може використовуватися в інших дослідженнях експресії генів для оцінки ефективності реакції зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції.

**Особистий внесок здобувача.** Результати, викладені у дисертації, одержано автором особисто або за безпосередньої участі у виконанні експериментів. Зокрема, автором самостійно виділено РНК, підбрано праймери до досліджуваних в роботі генів і умови їх ампліфікації, проведено аналіз специфічності ампліконів, реакції ЗТ-кПЛР, молекулярне клонування екзогенного контролю, підготовку зразків РНК (реакції зворотної транскрипції та *in vitro* транскрипції) для експерименту з мікроареями ДНК,

біоінформатичний аналіз результатів експерименту з мікроареями ДНК і промоторів диференційно експресованих генів, а також аналіз онтології генів.

Планування та аналіз результатів експериментів, написання статей та операції ЧГЕ та ЛАП проведено спільно з науковим керівником, д.б.н. М.Ю. Оболенською. ЧГЕ і ЛАП були проведені спільно із студентами Мінею І.Й. (НАУКМА), Полежаєвою Т.А. (КНУ ім. Т. Шевченка) та к.б.н. Перепелюк М.М. Проведення транскрипції для отримання екзогенного контролю проведено спільно із студенткою Жиряковою І.О. (КНУ ім. Т. Шевченка), Виділення та культивування первинних гепатоцитів для експерименту з мікроареями ДНК проведено разом із ст. наук. співр. Макогон Н.В. (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця). Гепатоцити та непаренхімні клітини з інтактною печінки та печінки після ЧГЕ та ЛАП виділено за участі студента Щерби Я. В. (КНУ ім. Т. Шевченка). Експеримент з мікроареями ДНК було проведено на базі Інституту онкології імені Марії-Скłodовської-Кюрі, м. Глівіце, Польща, з к.б.н. М. Очко-Войчеховською і за організаційного сприяння проф. Барбари Яжомб. Обрахунки результатів експерименту з мікроареями ДНК були проведені спільно з к.б.н. Токовенком Б.Т.

З усіма зазначеними колегами автор має спільні публікації.

**Апробація результатів дисертації.** Загальні положення роботи доповідались на поточних наукових семінарах Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та наукових конференціях: конференції молодих науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (20 – 22 вересня 2007 р., Київ, Україна); 8-й Парнасівській конференції (27 – 31 квітня 2011 р., Варшава, Польща); конференції «Запобігання раку- 2008» (6 – 8 березня 2008 р., Санкт-Галлен, Швейцарія); 4-й міжнародній конференції для молодих вчених «Молекулярна біології: поступ та перспективи» (14 – 17 вересня 2011 р., Київ, Україна); Тринадцятому міжнародному симпозиумі для аспірантів «Ритми життя: циклічність в біології» (17 – 19 листопада, Гейдельберг, Німеччина, 17 – 19 листопада, 2011); Одинадцятому Українському біохімічному конгресі (6 – 10 жовтня 2014, Київ, Україна).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах та тези 9 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій, а також один патент на корисну модель.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 154 сторінках машинописного тексту. Вона містить 19 рисунків, 10 таблиць та 3 додатки Список використаної літератури налічує

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження транскриптому в гепатоцитах щура проводили за використання мікроареїв олігонуклеотидів ДНК. Виділення гепатоцитів із інтактною печінки проводили за модифікованим методом (Berry, Friend, 1969), який включав перфузію печінки 0,05% розчином колагенази і очищення, гепатоцитів у ступінчастому градієнті перколу (Amersham, США). Клітини висівали на чашки Петрі, вкриті колагеном, і культивували впродовж 3-х і 6-и год в присутності IFN $\alpha$  щура (250 Од/мл). Контрольну пробу культивували без IFN $\alpha$ . Виділення РНК та підготовку зразків до гібридизації з мікроареями олігонуклеотидів ДНК проводили згідно рекомендацій виробника (Affymetrix, США). Платформа Affymetrix Rat Genome 230 2.0 дозволяє одночасно аналізувати експресію 30000 генів. Аналіз результатів гібридизації проводили у програмному середовищі R за використання пакетів програм Bioconductor та власних скриптів. Функціональний аналіз диференційно-експресованих генів проводили за допомогою інструментів DAVID та GO. Для аналізу промоторів диференційно-експресованих генів застосовували метод позиційно-вагових матриць, що реалізований в інструменті COTRASIF. Самі матриці транскрипційних факторів обирали з баз даних JASPAR і TRANSFAC.

У дослідженні процесу регенерації печінки використовували білих безпородних щурів 4-х – 6-и місячного віку масою 200 – 250 г. Операцію ЧГЕ проводили за класичною методикою (Higgins, Anderson, 1931). Операція ЛАП полягала в розрізі черевної стінки щура. Ми торкалися печінки і зашивали черевну стінку. Зразки брали у інтактних тварин, а також через 1, 3, 6 та 12 год після кожної з операцій. Частки печінки, які видаляли, використовували як індивідуальний контроль для зразка печінки на певний строк після операції.

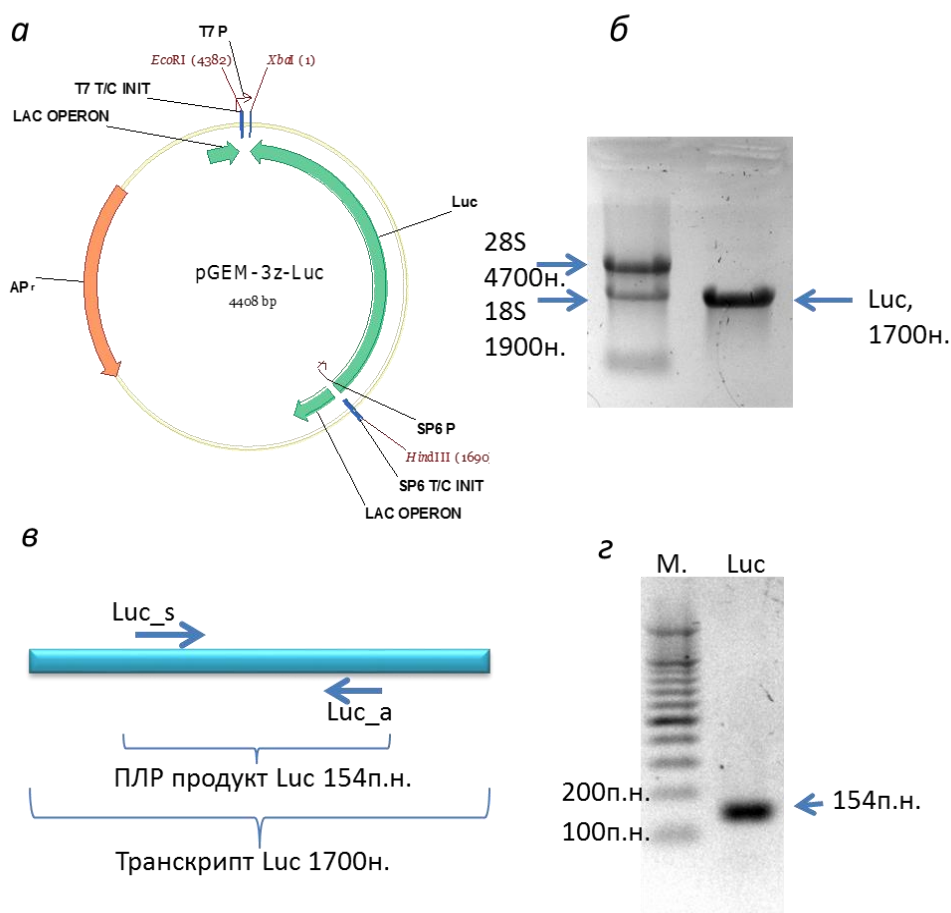
Дослідження експресії гена *Ifna*, його генів-мішеней (*Isg15*, *Ube11*, *Trim25*, *Usp18*, *Ube2l6*, *Pkr* і *Ifr7*), а також генів домашнього господарства *Tbp* та *18S* проводили методом зворотної транскрипції і кількісної полімеризації ланцюгової реакції (ЗТ-кПЛР) за присутності інтеркалюючого барвника SYBR Green I. Для визначення рівня відповідних мРНК у складі тотальної РНК використовували стандартні криві на основі серійних розведень відповідних ампліконів. Для контролю ефективності реакції зворотної транскрипції та ПЛР ми використовували синтетичну екзогенну РНК, послідовності якої не було в геномі щура. Цю РНК отримували шляхом *in vitro* транскрипції фрагменту гена люциферази світлячків, який попередньо було клоновано із плазмиди рGL-3 Basic до вектора рGEM-3z за сайтами рестрикції XbaI та HindIII. Результати ЗТ-кПЛР наводили в абсолютних одиницях (число копій на одиницю маси тотальної РНК) та у вигляді співвідношень значень дослідного і контрольного зразків.

Статистичну обробку даних проводили за непараметричним методом Мана-Уїтні.



## Результати досліджень та обговорення

Синтез чужорідної РНК для екзогенного контролю ефективності реакції зворотної транскрипції і кількісної ПЛР. Ефективність проходження реакцій зворотної транскрипції та ПЛР є ключовими для достовірного визначення експресії генів. Класичний спосіб контролю ефективності між зразками – використання референтних генів, неодмінною умовою якого є їхня стала експресія за умов досліду. Проте, під час регенерації печінки відбувається масштабне перебудування всього метаболізму клітин печінки, що супроводжується глобальною зміною експресії генів, через що важко використовувати класичну нормалізацію експресії з використанням референтних генів. Щоб подолати цю перешкоду ми створили синтетичний РНК-транскрипт – екзогенний контроль, який додавали у однаковій кількості до кожного зразка РНК перед зворотною транскрипцією. Цілісність транскрипту після *in vitro* транскрипції та специфічність продукту ампліфікації було перевірено перед використанням (рис. 1).



**Рис. 1.**  
**1.** Конструкція рекомбінантної плазмиди з фрагментом *Luc* і характеристика *Luc* транскрипту і його амплікону.  
**а)** Конструкція pGEM-3z-Luc; XbaI та HindIII – сайти клонування фрагмента гена *Luc*: EcoRI – сайт лінеаризації плазмиди перед *in vitro* транскрипцією.  
**б)** Транскрипт фрагменту гена *Luc* (1700 н.)

нанесений на гель поряд із тотальною РНК із печінки щура, (28S – 4700 н., 18S – 1900 н.). **в)** Схематичне зображення транскрипту *Luc* та розташування на ньому праймерів. **г)** Електрофореграма амплікону *Luc*; М – маркер розмірів ДНК

Експресія гена *Ifna* в гепатоцитах та непаренхімних клітинах печінки після часткової гепатектомії і лапаротомії. Використавши підхід, при якому контрольні та експериментальні зразки тканини брали від однієї і тієї ж тварини, а також застосовуючи екзогенну РНК для контролю ефективності ЗТ-кПЛР, ми підтвердили наші попередні дані і показали, що концентрація мРНК *Ifna* стрімко підвищується у фракції непаренхімних клітин на першу годину після ЧГЕ із подальшим зниженням до контрольного рівня вже до третьої години. Синтез мРНК *Ifna* в гепатоцитах відбувався із значним запізненням (у порівнянні з непаренхімними клітинами) із максимальним рівнем експресії на 12 год. Під час реакції гострої фази в обох популяціях клітин спостерігали стрімке зниження вмісту мРНК *Ifna* майже до нульового рівня, що свідчить про специфічність синтезу IFN $\alpha$  саме під час відновлювального процесу печінки (рис. 2). Підвищення вмісту мРНК *Ifna* в непаренхімних клітинах на початку регенераційного процесу узгоджується зі збільшенням противірусної активності IFN $\alpha$  в тканині печінки впродовж 0,5 – 3-х год. після ЧГЕ, що було продемонстровано в попередніх роботах лабораторії системної біології.

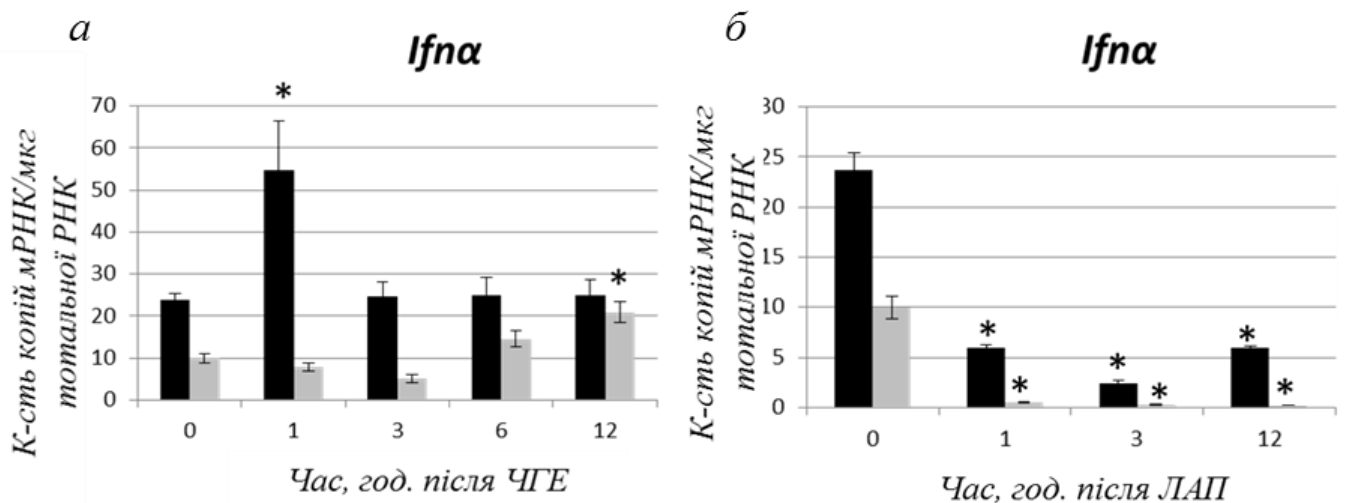


Рис. 2. Зміни вмісту мРНК *Ifna* в непаренхімних клітинах печінки і гепатоцитах після часткової гепатектомії (а) та лапаротомії (б). Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (\*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при  $p \leq 0.05$ . Чорні стовпчики – непаренхімні клітини; сірі – гепатоцити

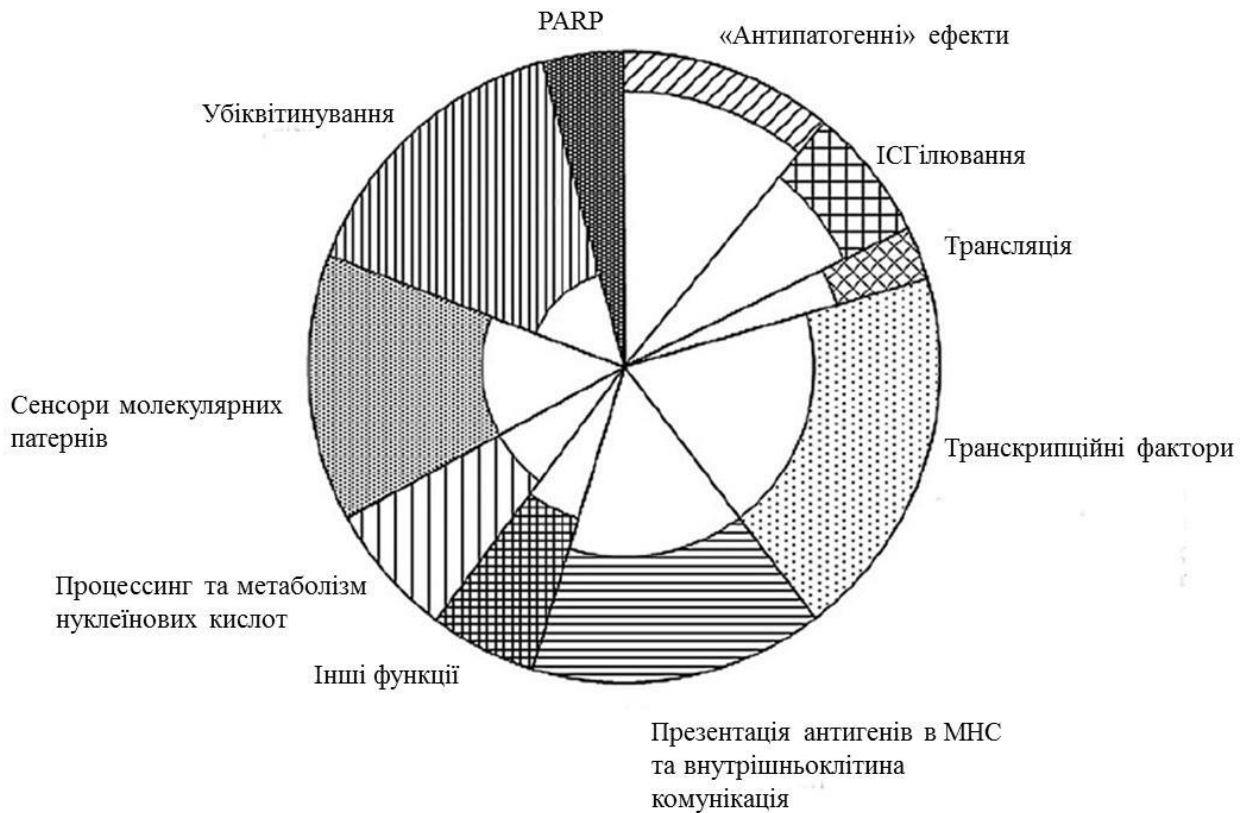
Було з'ясовано, що IFN $\alpha$  специфічно залучений до регенерації печінки, проте яку роль він виконує в цьому процесі залишалось невідомим.

Вплив IFN $\alpha$  на клітини опосередковується через регуляцію численних генів-мішеней, спектр яких специфічний для певного типу клітин і залежить від

доза IFN $\alpha$  і часу його дії. Для того, щоб з'ясувати, як поведуться гени-мішені IFN $\alpha$  і які вони на початку регенераційного процесу, ми вирішили визначити гени-мішені в гепатоцитах, які складають основну масу клітин печінки, за дії IFN $\alpha$  в умовах, максимально наближених до ситуації *in vivo*. Первинні гепатоцити культивували впродовж короткого часу (3 і 6 год) за присутності IFN $\alpha$  в концентрації 250 Од/мл, що відповідає визначеній концентрації IFN $\alpha$  в печінці, яка регенерує. Концентрацію IFN $\alpha$  в печінці було визначено в нашій попередній роботі в експерименті із захисту клітин невриноми Гассероного вузла щура від вірусу везикулярного стоматиту під впливом гомогенатів печінки, яка регенерує.

*Визначення та характеристика змін у транскриптомі первинних гепатоцитів щура під впливом IFN $\alpha$ .* Після 3-х та 6-и год інкубування первинних гепатоцитів із IFN $\alpha$  спостерігали підвищену експресію відповідно 28-и та 124-х диференційно-експресованих генів, серед яких були гени, що кодують як про-, так і протизапальні білки, про- і протиапоптотичні білки, транскрипційні фактори, здатні активувати і пригнічувати експресію різних генів. Це свідчить про збалансовану відповідь гепатоцитів на квазіфізіологічну дію IFN $\alpha$ . Диференційно-експресовані гени було розподілено на 9 функціональних категорій, які кодують: «антипатогенні ефектори», що безпосередньо інгібують розвиток вірусів і бактерій в клітині (Mx1, Mx2, immunity related GTPase family M, interferon gamma induced GTPase та інші); білки, що беруть участь у специфічному впізнаванні нуклеїнових кислот вірусного та бактеріального походження та передачі стресового внутрішньоклітинного сигналу (*Rig1, Mda5, Lpg2*); транскрипційні фактори та коактиватори транскрипції, до яких належать транскрипційні фактори родини IRF (interferon regulated factors), зокрема *Irf1,7,9*, білки *Stat1,2*, ко-активатори ядерних рецепторів *Pric285* і *Ncoa7*. IFN $\alpha$  активує експресію генів, що беруть участь у презентації антигенів (*Tap1, Rt1-n3, Rt1aw2, H28*); відповідальні за міжклітинну комунікацію (*Cxcl10,11, Csf1, G1p2, Pdc11g2*); задіяні у регуляції обміну нуклеїнових кислот (*Adar, Mov10, Oas1i, 1a, Cmpk, Nt5c3, Trex1*) і регуляції трансляції (*Ifit2, Pkr*). Однією з найбільш представлених груп серед диференційно-експресованих генів була група генів, продукти яких відповідальні за посттрансляційну модифікацію білків шляхом ІСГілування та убіквітинуювання (*Herc6, Trim25, Isg15, Usp18, Ubell, Trim21, Xiap, Rnf19b і Rnf114*) (рис. 3).

Розглядаючи функціональні групи диференційно-експресованих генів в контексті їхньої активації залежно від часу культивування з IFN $\alpha$ , було



**Рис. 3. Зміни в представленості диференційно експресованих генів в транскриптомі залежно від часу культивування гепатоцитів з IFN $\alpha$ . Площа великих секторів (заштриховані плюс не заштриховані їх частини) – пропорція генів відповідної функціональної категорії в загальній кількості диференційно експресованих генів після 6 год інкубації з IFN $\alpha$ . Незаштрихована площа внутрішніх секторів – пропорція диференційно-експресованих генів після 3 год інкубації з IFN $\alpha$  в загальній кількості генів відповідної функціональної категорії. Найпершими реагують на дію IFN $\alpha$  гени антипатогенної відповіді, за ними гени системи ІСГілювання. Останніми активуються гени системи убіквітинування і PARP.**

з'ясовано, що найпершими активуються гени, що беруть участь у безпосередній інактивації патогенів всередині клітини, за ними залучаються гени, пов'язані з процесами ІСГілювання, і лише потім активуються гени, що беруть участь у більш глибокому перебудуванні регуляторних і метаболічних процесів, зокрема процесів транскрипції і трансляції.

Визначення шляхів передачі сигналу від рецептора *IFN $\alpha$*  через дослідження промоторів диференційно-експресованих генів. Для передачі сигналу в середину клітини *IFN $\alpha$*  використовує декілька шляхів: Jak/STAT/ISGF3, Jak/STAT, PI3K/AKT і p38/MAPK. Для того, щоб оцінити їхній відносний внесок у регуляцію диференційно-експресованих генів, досліджено промотори диференційно-експресованих генів на наявність сайтів зв'язування транскрипційних факторів ISGF3, димерів STAT, CREB, C/EBP, MAX/MYC, ELK1, SP1, MEF2a, NFAT, ATF, p53, та NF- $\kappa$ B, які є кінцевими ефекторами вищезазначених сигнальних шляхів. Визначено рівень збагачення диференційно-експресованих генів генами з відповідними сайтами зв'язування в промоторах (таблиця 1). Як очікувано, коефіцієнт збагачення найвищий для генів, в промоторній ділянці яких знаходяться сайти зв'язування для фактору ISGF3, який вважається найчастішим передавачем сигналу від *IFN $\alpha$* . Серед диференційно-експресованих генів таких генів в геномі щура найменша кількість, але їх представленість серед диференційно-експресованих генів зростає майже у 9 разів (таблиця 1). Гени з іншими сайтами зв'язування наведені в таблиці в низхідній послідовності їх коефіцієнтів збагачення. Збагачення диференційно-експресованих генів генами з сайтами зв'язування до NF- $\kappa$ B, MAX/MYC і NFAT факторами свідчить про можливу участь PI3K/AKT та p38/MAPK сигнальних шляхів, тоді як збагачення за сайтом зв'язування STAT4 може бути результатом активації JAK/STAT сигнального шляху.

Дослідження експресії генів-мішеней *IFN $\alpha$*  під час регенерації печінки. Одними з найперших генів, які відповідали на дію *IFN $\alpha$* , були гени системи ІСГілування (*Isg15*, *Trim25*, *Ube1L*, *Ube2L6* та *Usp18*), і саме їх було обрано для перевірки їх експресії після часткової гепатектомії і лапаротомії. Крім них, було обрано гени *Pkr* і *Irf7* як найбільш вивчені гени-мішені *IFN $\alpha$* , а також гени домашнього господарства *Tbp* і *18S* рРНК, експресія яких характеризує загальний рівень транскрипції і трансляції.

Аналіз профілів експресії генів системи ІСГілування й профіля експресії *Ifn $\alpha$*  показав, що експресія генів *Isg15*, *Usp18*, *Trim25*, а також *Irf7*, виявилась неасоційованою з експресією гена *Ifn $\alpha$*  після часткової гепатектомії, не зважаючи на літературні дані про те, що вони є типовими генами-мішенями *IFN $\alpha$* . В той же час після лапаротомії концентрація мРНК цих генів стрімко зростала впродовж перших 3-х годин і поверталась до початкового.

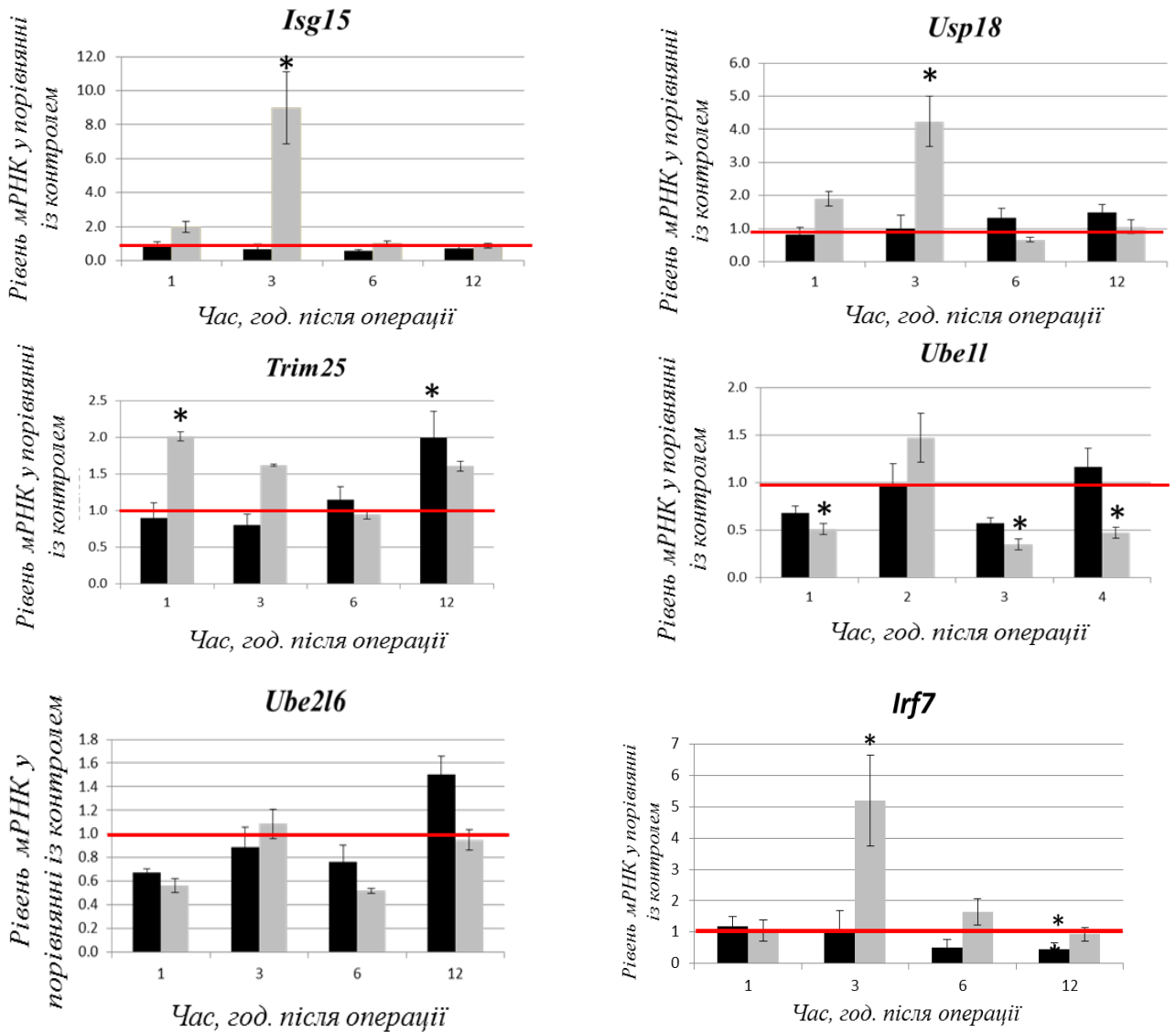
Таблиця 1

**Збагачення диференційно експресованих генів генами з певними сайтами зв'язування транскрипційних факторів в промоторах (точний критерій Фішера).**

#	ТФ	Кількість генів із СЗТФ в промоторі/кількість генів в геномі щура	Обробка IFN $\alpha$ , 3 год.		Обробка IFN $\alpha$ , 6 год.			
			К	Значення - р	К	Значення - р		
1	ISGF3	708/25646	8.62	5/21	0.000206	7.32	20/99	2.53E-12
2	IRF1	2188/25646	3.35	6/21	0.005475	2.25	19/99	0.00040
3	NF- $\kappa$ B	2975/25646	2.05	5/21	0.053727	1.64	19/99	0.00688
4	MAX/MY C	1754/25646	0.70	1/21	0.348329	1.62	11/99	0.03776
5	STAT4	2796/25646	2.18	5/21	0.049399	1.48	16/99	0.03099
6	NFAT	17251/25646	1.20	17/21	0.081171	1.16	77/99	0.00666

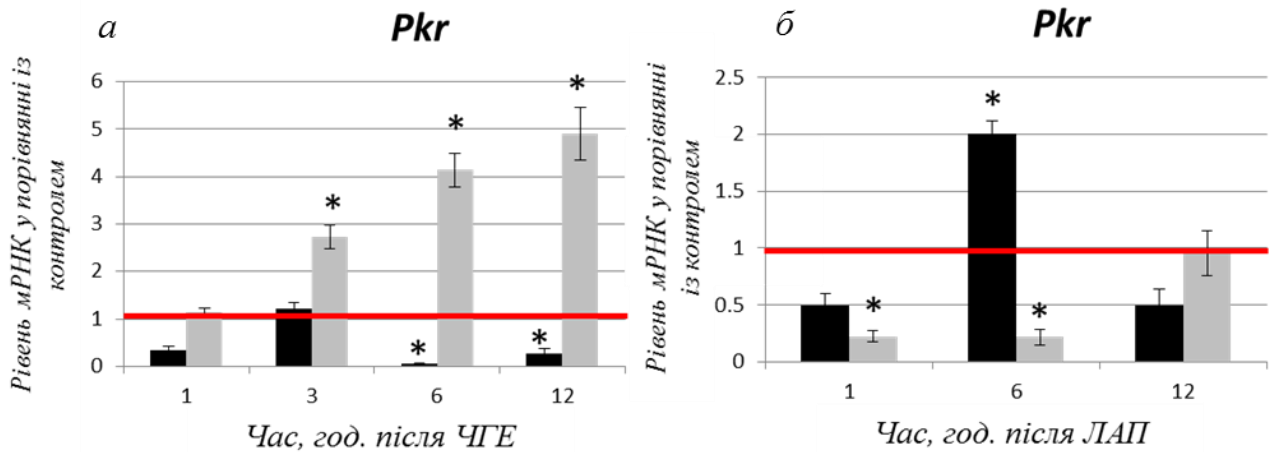
**Примітки:** ТФ – транскрипційний фактор; СЗТФ – сайти зв'язування транскрипційних факторів; ДЕГ – диференційно-експресовані гени; К - коефіцієнт збагачення,  $K = \frac{A \cdot B}{B \cdot \Gamma}$ , де А – диференційно-експресовані гени з певним сайтом зв'язування в промоторах; В - Загальна кількість генів в геномі щура;  $\Gamma$  – Кількість генів, що мають в промоторах даний сайт зв'язування серед всіх генів щура

рівня і навіть нижче нього впродовж наступних годин пререплікативного періоду (рис. 4). Ці дані свідчать, що гени, які в літературі усталено описуються як залежні від IFN $\alpha$ , є такими лише в окремих випадках.



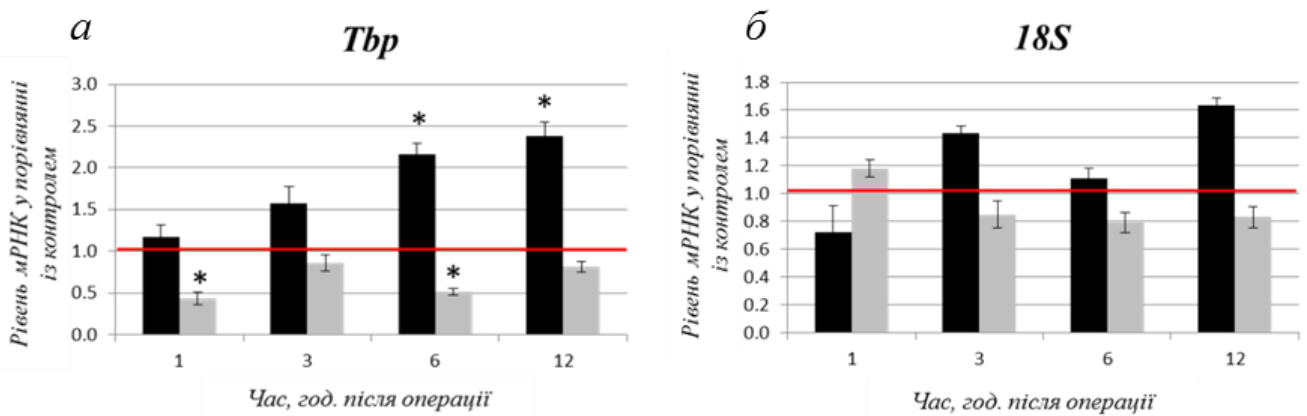
**Рис. 4.** Зміни вмісту мРНК в печінці після часткової гепатектомії (ЧГЕ) і лапаротомії (ЛАП). Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (\*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при  $p \leq 0.05$ . Чорні стовпчики - часткова гепатектомія; сірі – лапаротомія

На відміну від вищезазначених генів, вміст мРНК *Pkr* поступово зростав після ЧГЕ і майже не змінювався після ЛАП (рис. 5).



**Рис. 5.** Зміни вмісту *mPНК Pkr* в непаренхімних клітинах і гепатоцитах після часткової гепатектомії (а) і лапаротомії (б). Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (\*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при  $p \leq 0.05$ . Чорні стовпчики – непаренхімні клітини; сірі – гепатоцити

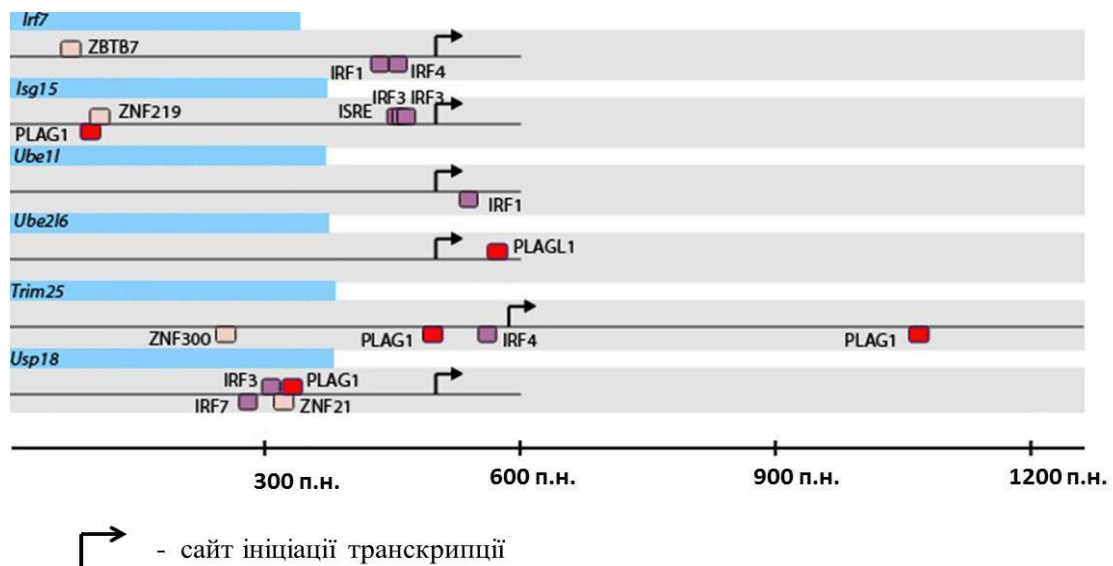
Вміст *mPНК* генів домашнього господарства, *Tbp* *mPНК* і *18S* *pPНК* поступово зростав впродовж всього пре-реплікативного періоду (12 год) після ЧГЕ і був нижчим за вихідний рівень впродовж того ж часового періоду після лапаротомії (рис. 6).



**Рис. 6.** Зміни рівня *mPНК Tbp* (а) та рибосомальної *PНК 18S* (б) в печінці після часткової гепатектомії та лапаротомії. Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (\*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при  $p \leq 0.05$ . Чорні стовпчики - часткова гепатектомія; сірі – лапаротомія



*Аналіз промоторів генів системи ІСГілування.* Щоб пояснити отримані результати, ми детальніше проаналізували промотори генів системи ІСГілування за допомогою інструменту Matinspector і виявили, що промотори цих генів збагачені на сайти зв'язування транскрипційних факторів родини IRF (рис. 7). Представники цієї родини беруть участь у захисних і запальних реакціях і активуються, окрім IFN $\alpha$ , також клітинними сенсорами нуклеїнових кислот вірусного та бактеріального походження. Хоча досліджені гени системи ІСГілування і відносяться до генів-мішеней IFN $\alpha$ , наявні в літературі дані свідчать, що транскрипційні фактори родини IRF, зокрема IRF3, може активуватися незалежно від IFN $\alpha$  та регулювати експресію деяких генів-мішеней IFN $\alpha$ . Раніше вважалося, що ген *Isg15* є класичним геном, який регулюється IFN $\alpha$ . Проте, згодом було показано, що IRF3 може регулювати експресію *Isg15* та низки інших генів-мішеней IFN $\alpha$ , незалежно від шляху передачі сигналу через рецептор IFNAR



**Рис. 7. Сайти зв'язування транскрипційних факторів в промоторах генів системи ІСГілування. Дані були отримані автором із використанням інструменту Matinspector.**

Аналізуючи характер експресії генів системи ІСГілування в контексті експресії генів *Tbp* і *18S*, ми вважаємо, що після часткової гепатектомії, як більш сильного і безперечно якісно відмінного стресового чинника порівняно з лапаротомією, і через глибокі зміни в регуляторних процесах і метаболізмі у клітинах печінки створюються передумови для інтенсифікації транскрипції і трансляції і не залучаються більш швидко діючі і менш кардинальні процеси посттрансляційної модифікації білків за допомогою ІСГілування. Ми вважаємо,

що відповідь на лапаротомію, як на менш сильні і інші за природою стресові чинники, більше орієнтована на модифікацію вже існуючих білків, принаймі за допомогою ІСГілування.

## ВИСНОВКИ

Проведено поглиблене вивчення експресії гена *Ifna* в тканині, паренхімних и непаренхімних клітинах печінки щурів після часткової гепатектомії і впродовж реакції гострої фази після лапаротомії. Для визначення ролі IFN $\alpha$  у відновленні печінки після часткової гепатектомії досліджено як змінюється транскриптом первинних гепатоцитів, культивованих з IFN $\alpha$  в концентрації, яку було визначено в тканині після часткової гепатектомії. Серед диференційно експресованих генів обрано гени системи ІСГілування, які найскоріше реагують на дію IFN $\alpha$ , для визначення вмісту їх мРНК в печінці після обох операцій.

1. Експресія гена *Ifna* у непаренхімних клітинах печінки зростає на початку відновлювального процесу вже через 1 год після часткової гепатектомії і знижена впродовж 12 год після лапаротомії;
2. Вперше охарактеризовано зміни в профілі генної експресії у первинних гепатоцитах під впливом IFN $\alpha$  за умов, наближених до ситуації після часткової гепатектомії. Визначено диференційно-експресовані гени і послідовність активації їх експресії впродовж 3-х і 6-ти год з початку дії IFN $\alpha$ .
3. В інтактних гепатоцитах гени системи ІСГілування є генами ранньої відповіді на квазіфізіологічну дію IFN $\alpha$ .
4. Вперше показано, що після часткової гепатектомії і лапаротомії, експресія «інтерферон-регульованих генів» системи ІСГілування і гена *Irf7* не асоціюється з експресією гена *Ifna* на відміну від «інтерферон-регульованого гена» *Pkr*, експресія якого асоціюється із експресією *Ifna*.
5. Проведений систематичний біоінформаційний аналіз промоторів генів системи ІСГілування засвідчив наявність сайтів зв'язування для транскрипційних факторів родини IRF, зокрема IRF3. Це передбачає участь цих факторів в активації експресії генів після лапаротомії.
6. За результатами аналізу експресії генів *Tbp* і *18S* рРНК, з одного боку, і генів системи ІСГілування, з іншого, сформульовано положення, про те, що більш рання відповідь на часткову гепатектомію реалізується за участі процесів транскрипції і трансляції, а на лапаротомію – за участі тимчасової модифікації білків шляхом ІСГілування.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Критерії оцінки мікромасив-експерименту з дослідження транскриптому гепатоцитів щура під впливом інтерферону альфа / А. Куклін Б. Токовенко, М. Оболенська // **Biopolymers and cell**. – 2013. – Т. 29, №6. – С.521 – 526. *Особистий внесок здобувача – проведення аналізу якості експерименту з мікроареями ДНК із визначення впливу IFNa на профіль генної експресії в первинних гепатоцитах.*
2. Інтерферон альфа та протеїнкіназа Р в процесі відновлення печінки щурів після часткової гепатектомії / М. Перепелюк, А.Куклін, Я.Щерба, Б.Токовенко, Н.Макогон, А.Гоглер, С.Шале, М.Ю. Оболенська // **Biopolymers and cell**. - 2009. – Т.25, №2. – С.145 – 149. *Особистий внесок здобувача – проведення визначення мРНК Ifna та Pkr в регенеруючій печінці та при реакції гострої фази.*
3. Hepatocytes response to interferon alpha levels recorded after liver resection / A. Kuklin, B. Tokovenko, N Makogon, M Oczko-Wojciechowska, B Jarzab, M. Obolenskaya // **J Interferon Cytokine Res**. - 2014. - Vol.34, №2. - P. 90-99. *Особистий внесок здобувача – планування експериментів, виділення та культивування первинних гепатоцитів, виділення РНК та всі етапи підготовки зразків до експериментів з мікроареями ДНК, аналіз промоторів диференційно-експресованих генів, ЗТ-ПЛР верифікація експерименту з мікроареями ДНК.*
4. Визначення генів-мішеней транскрипційного фактора ISGF-3 / Б. Токовенко, О. Драгущенко, А. Куклін, М. Оболенська // **Biopolymers and cell**. – 2009. – Т. 25, №8. – С.398 – 402. *Особистий внесок здобувача – проведення біоінформатичного аналізу промоторів генів-мішеней IFNa.*
5. Expression of ISGylation related genes in regenerating rat liver / A. Kuklin, T. Poliezhaieva, I. Zhyryakova, V. Ogryzko, M. Obolenskaya // **Biopolymers and cell**. – 2015. – Vol. 31, №5. – P.351 – 361. *Особистий внесок здобувача – планування експериментів, всі етапи клонування, in vitro транскрипція екзогенної РНК- контролю, виділення РНК зі зразків регенеруючої печінки та печінки під час реакції гострої фази.*
6. Interferon alpha induced changes in gene expression profile in primary hepatocytes of rat / Abstract of 13th international EMBL PhD symposium “The Rhythm of Life Cycles in biology” // . - 17 – 19 November 2011. - Heidelberg, Germany. - P.74. *Особистий внесок здобувача – планування експериментів, виділення та культивування первинних гепатоцитів, виділення РНК та всі етапи підготовки зразків до експерименту з мікроареями ДНК, аналіз промоторів диференційно-експресованих генів, верифікація експерименту з мікроареями ДНК за допомогою ЗТ-ПЛР..*
7. Changes in gene expression profile in primary culture of rat hepatocytes treated with interferon alpha / A. Kuklin, B. Tokovenko, N Makogon, B Jarzab, M. Obolenskaya // Abstract of the 6th Parnas Conference. – 27 – 31 August 2011. – Warsaw, Poland. – P.20. *Особистий внесок здобувача –*

планування експериментів, виділення та культивування первинних гепатоцитів, виділення РНК та всі етапи підготовки зразків до експерименту з мікроареями ДНК, аналіз промоторів диференційно-експресованих генів, верифікація експерименту з мікроареями ДНК за допомогою 3Т-ПЛР.

8. Novel technologies in the study of IFN alpha activity / В. Tokovenko, А. Kuklin, М. Perepelyuk, М. Obolenskaya // Abstract book of Gliwice Scientific Meetings. – 16 – 17 November 2007. – Gliwice, Poland. – P.46. *Особистий внесок здобувача – проведення експерименту із визначення впливу IFN $\alpha$  на клітини печінки.*
9. Interferon alpha at the early stage of regeneration of rat liver / А. Kuklin, М. Perepelyuk, М. Obolenska // Abstract of the Conference for young scientists, PhD students on molecular biology and genetics, dedicated to 120 anniversaries of M.I. Vavilov. – 20 – 22 September 2007. – Kyiv, Ukraine. – P 21. *Особистий внесок здобувача – клонування ПЛР продуктів досліджуваних генів для їхнього використання в якості стандартів, виділення РНК, Визначення експресії гену Ifn $\alpha$ .*
10. Interferon alpha in rat liver after partial hepatectomy / М. Perepelyuk, А.Кuklin, D.Fedorenko, М.Ю. Obolenskaya // Abstract of the 10th anniversary of Gliwice scientific meetings. – 17 – 18 November 2006. – Gliwice, Poland. – P 51. *Особистий внесок здобувача – клонування ПЛР продуктів досліджуваних генів для їхнього використання в якості стандартів, виділення РНК, Визначення експресії гену Ifn $\alpha$ .*
11. Temporal gene expression profiling in rat hepatocytes treated with quasiphysiological dose of interferon alpha / А. Kuklin, В. Tokovenko, N Makogon, В Jarzab, М. Obolenskaya // Abstract of 7th Conference of young scientists of Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine, dedicated to 175th anniversary of O.Y. Danilevsky. – 28 – 29 May 2013. –Kyiv, Ukraine. – P 10. *Особистий внесок здобувача –планування експериментів, виділення та культивування первинних гепатоцитів, виділення РНК та всі етапи підготовки зразків до експерименту з мікроареями ДНК, аналіз промоторів диференційно-експресованих генів, верифікація експерименту з мікроареями ДНК за допомогою 3Т-кПЛР..*
12. Development of interferon response in primary hepatocytes / А. Kuklin, В. Tokovenko, N Makogon, М Oczko-Wojciechowska, В Jarzab, М. Obolenskaya // The Ukrainian Biochemical Journal Supplement 1. – 2014. – Vol. 86, # 5. – P. 104. *Особистий внесок здобувача –планування експериментів, виділення та культивування первинних гепатоцитів, виділення РНК та всі етапи підготовки зразків до експерименту з мікроареями ДНК, аналіз промоторів диференційно-експресованих генів, 3Т-ПЛР верифікація експерименту з мікроареями ДНК.*
13. Endogeneous interferon alpha during liver transition from quiescence to proliferation / А. Kuklin, М. Perepelyuk, Ya. Tsherba, М. Obolenska // European Journal of Cancer. Supplement. – 2008, – Vol.6, #3, – P.50. *Особистий внесок здобувача – виділення паренхімних та непаренхімних клітин печінки, дизайн праймерів, клонування ПЛР-продукту для побудови стандартних кривих.*

14. Interferon- $\alpha$  and its targets in intact and partially hepatectomized rat liver / M. Perepelyuk, A.Kuklin, O.Jakunchikova, D.Fedorenko, M.Yu. Obolenskaya // Materials of 3ed international young scientists conference "Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution". - 15 – 18 May 2007. - Odesa, Ukraine. - P.215. *Особистий внесок здобувача – клонування ПЛР продуктів досліджуваних генів для їхнього використання в якості стандартів.*
15. Спосіб класифікації індукторів інтерферону за кількісними показниками експресії генів інтерферону : пат. 72028 Україна : МПК А61К 48/00 / Д.Б. Старосила, О.О. Драгущенко, М.М. Перепелюк, І.О. Міня, А.В. Куклін, А.М. Слончак, Т.А. Полежаєва, М.Ю. Оболенська, С.Л. Рибалко. № 201113718; заявл. 21.11.2011 ; опублік. 10.08.2012, Бюл. № 15. *Особистий внесок здобувача – підбір праймерів для ПЛР, визначення експресії генів-мішеней IFN $\alpha$ .*

#### АНОТАЦІЯ

**Куклін А.В. Експресія генів вродженого імунітету в інтактних гепатоцитах та печінці щура під час її регенерації. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2016.

Досліджено експресію генів системи вродженого імунітету в первинних гепатоцитах під впливом IFN $\alpha$  та в печінці щура під час її регенерації та реакції гострої фази, ініційованих відповідно частковою гепатектомією та лапаротомією. Рівень мРНК *Ifna* в непаренхімних клітинах печінки зростав при відновлювальному процесі після часткової гепатектомії і стрімко знижувався після лапаротомії. З метою визначення ролі IFN $\alpha$  у відновленні печінки після часткової гепатектомії досліджено як змінюється транскриптом первинних гепатоцитів, культивованих з IFN $\alpha$  в концентрації, яку було визначено раніше в печінці після часткової гепатектомії. Гени, які індуюються IFN $\alpha$  в первинних гепатоцитах щура за умов, максимально наближених до ситуації в печінці, яка регенерує, кодують як про-, так і протизапальні білки, про- і протиапоптичні фактори, активатори і інгібітори транскрипції, що вказує на збалансовану відповідь гепатоцитів на дію цитокіна за цих умов на відміну від токсичної більш тривалої дії IFN $\alpha$  в більш високій концентрації. Гени системи ІСГілування реагують найскоріше за інших диференційно-експресованих генів на дію IFN $\alpha$ . Біоінформатичним методом показано, що дія IFN $\alpha$  реалізується переважно через внутрішньоклітинний сигнальний шлях Jak/STAT/ISGF3. Показано, що після часткової гепатектомії і лапаротомії, експресія «інтерферон-регульованих генів» системи ІСГілування (*Ube11, Ube2l6, Usp18, Isg15*) і гена *Irf7* не асоціюється з експресією гена *Ifna* на відміну від «інтерферон-регульованого гена» *Pkr*, експресія якого асоціюється із експресією *Ifna*.

Біоінформатичним методам визначено сайти зв'язування транскрипційних факторів в промоторах генів системи ІСГілування й показано, що їх експресія може регулюватися транскрипційним фактором IRF3 і не залежати від дії IFN $\alpha$ . Запропоновано послідовність регуляторних подій, що ведуть до IFN $\alpha$ -залежної регуляції експресії гена *Pkr* під час регенерації печінки та IFN $\alpha$ -незалежної регуляції генів системи ІСГілування під час реакції гострої фази. Продемонстровано якісну різницю між відповіддю клітин печінки на часткову гепатектомію та лапаротомію, що полягає у створенні передумов для посилення транскрипції і трансляції під час відновлення печінки та інтенсифікації модифікації білків шляхом ІСГілування під час реакції гострої фази.

### АННОТАЦІЯ

**Куклин А.В. Експресія генів врожденного імунитета в інтактних гепатоцитах і печини кривс во время регенерации. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2016.

Експресія генів системи врожденного імунитета досліджена в первичних гепатоцитах под действием IFN $\alpha$  и в печени крыс во время регенерации и реакции острой фазы, инициированных частичной гепатэктомией и лапаротомией. Уровень мРНК *Ifna* в непаренхимных клетках печени специфически возрастал после частичной гепатэктомии и стремительно снижался после лапаротомии. Чтобы понять роль IFN $\alpha$  в восстановлении печени после частичной гепатэктомии, мы исследовали транскриптом первичных гепатоцитов, культивированных с IFN $\alpha$  в концентрации, аналогичной после частичной гепатэктомии. Гены, которые индуцируются IFN $\alpha$  в первичных гепатоцитах, кодируют как про-, так и антиапоптотические белки, про- и противовоспалительные факторы, активаторы и ингибиторы транскрипції, активаторы и ингибиторы Т-клеток. Гены системы ІСГілирования реагируют быстрее других дифференциально-экспрессированных генів на действие IFN $\alpha$ . Біоінформатическим методом показано, что в первичных гепатоцитах передача внутриклеточного сигнала от IFN $\alpha$  осуществляется преимущественно по пути Jak/STAT/ISGF3. Показано, что после частичной гепатэктомии и лапаротомии, експресія «интерферон-регулируемых генів» системы ІСГілирования (*Ube11*, *Ube2l6*, *Usp18*, *Isg15*) и гена *Irf7* не ассоциируется с експресією гена *Ifna* в отличие от другого «интерферон-регулируемого гена» *Pkr*, експресія котрого ассоциируется с експресією *Ifna*. Анализ промоторов генів системы ІСГілирования указывает на возможность регуляции транскрипции этих генів транскрипционными факторами семейства IRF, в частности IRF3, вне зависимости от действия IFN $\alpha$ . Предложена последовательность регуляторных событий, которые ведут к IFN $\alpha$ -зависимой регуляции експресії гена *Pkr* во время регенерации печени и IFN $\alpha$ -независимой регуляции генів системы ІСГілирования во время реакции острой

фазы. Продемонстрировано качественную разницу между ранним ответом клеток печени на частичную гепатектомию и лапаротомию, которая заключается в усилении транскрипции и трансляции во время восстановления печени и интенсификации модификации белков путем ИСГилирования во время реакции острой фазы.

### SUMMARY

**Kuklin A.V. Expression of innate immunity related genes in intact hepatocytes and regenerating rat liver. – Manuscript.**

Thesis for a Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

Liver regeneration after partial hepatectomy is a very complex and highly regulated process. Sequential action of different signaling molecules directs quiescent liver cells to proliferate and restore liver mass. The earliest phase of liver regeneration – priming phase, is known to be regulated by a number of innate immunity factors such as IL-6 and TNF $\alpha$  that are crucial for triggering of liver regeneration. In this study, we addressed the question whether interferon alpha (IFN $\alpha$ ), the active player in innate immunity, is involved in the triggering of liver regeneration. We investigated expression of *Ifna* gene in total liver, hepatocytes and non-parenchymal cells after partial hepatectomy and during acute phase response after laparotomy. We revealed early (at 1 h) up-regulation of *Ifna* mRNA abundance after partial hepatectomy and its down-regulation during 12 h after laparotomy. In order to determine which genes might be regulated by IFN $\alpha$  in regenerating liver we investigated the transcriptome of primary hepatocytes cultivated during 3 h and 6 h with quasi-physiological concentration of IFN $\alpha$  (250 U/ml) resembling the previously estimated concentration in regenerating rat liver. IFN $\alpha$  induced up-regulation of differentially expressed genes encoding both activators and inhibitors of apoptosis, inflammation, T-cells activity etc. pointed to the balanced hepatocytes response to quasi-physiological dose of IFN $\alpha$  unlike toxic effect of higher dose of IFN $\alpha$  during longer incubation. Functional annotation and time course analysis of differentially expressed genes showed that different sets of genes respond in a distinct manner to IFN $\alpha$ . The earliest responding genes were “antiviral genes”, whose products directly inactivate pathogens within host cell, followed by ISGylation-related genes, with a subsequent activation of genes encoding transcription factors and others. The differentially expressed genes were enriched with the genes possessing specific transcription factors binding sites in their promoters. It is pointed that Jak/STAT/ISGF3, Jak/STAT, PI3K/AKT and p38/MAPK are involved in intracellular transition of IFN $\alpha$  signal in a descending extent. ISGylation-related genes (*Ube11*, *Ube2l6*, *Usp18*, *Isg15* and *Trim25*) were the earliest responders to IFN $\alpha$  among the differentially-expressed genes in intact hepatocytes. They were selected for investigation of their expression in the liver after partial hepatectomy and laparotomy. The most prominent elevation of their mRNAs abundances was observed

during acute phase response with maximum up-regulation at 1 h for *Trim25* and at 3 h for *Usp18* and *Isg15* and down-regulation after partial hepatectomy. To determine if other IFN $\alpha$ -stimulated genes have the same expression profile we investigated *Pkr* and *Irf7* mRNA abundances. The changes in *Irf7* mRNA abundance were similar to ISGylation-related genes peaking at 3 h during acute phase response and were down-regulated to 12 h after PHE. The *Pkr* abundance increased dramatically to 12 h after PHE. Comparing the time scale of genes expression with that of *Ifn $\alpha$*  abundance we conclude that expression of *Ube11*, *Ube2l6*, *Usp18*, *Isg15* and *Irf7* genes after partial hepatectomy and laparotomy was not associated with expression of *Ifn $\alpha$*  gene unlike *Pkr* gene that was associated. It means that indicated genes that are known as classical IFN-stimulated genes might be responsible for other factors. The detailed *in silico* analysis of these genes promoters revealed the potential regulatory role of transcription factors from IRF family particularly IRF3 which is known to be activated independently from IFN $\alpha$ . The expression of two house-keeping genes, *Tbp* and *18S* rDNA which reflects integral processes of transcription and translation, respectively, revealed the principal difference in the earliest response to both operations. We presume that the earliest response is characterized by an enhanced transcription and translation after partial hepatectomy with concomitant down regulation of post-translational modification by ISG15 and enhanced protein modification by ISG15 at the background of down-regulated total transcription and translation after laparotomy.