

**В.О. Кириченко, В.С. Нагібін, Л.В. Тумановська,  
В.Є. Досенко, В.К. Рибальченко, О.О.Мойбенко**

## **Ефекти заглушення гена убіквітину при аноксії–реоксигенації в культурі кардіоміоцитів**

*Беручи до уваги важливу роль убіквітинзалежного протеасомного протеолізу в обміні функціональних білків кардіоміоцитів (актину, міозину, іонних каналів тощо), становить інтерес дослідження механізмів клітинної смерті при специфічному заглушенні гена убіквітину (UBB) за допомогою РНК-інтерференції та моделюванні аноксії–реоксигенації. Інтерферуючі РНК вводили шляхом електропорації в ізолювані неонатальні кардіоміоцити, після чого первинна культура клітин підлягала дії аноксії (30 хв) з наступною реоксигенацією (1 або 24 год). Відсоток живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних кардіоміоцитів визначали флуоресцентною мікроскопією. Кількісну оцінку експресії UBB і субодиниць протеасоми  $\beta 5$  (PSMB5) та  $\beta 9$  (PSMB9) проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Показано, що при моделюванні аноксії–реоксигенації в режимі 30 хв – 24 год експресія мРНК UBB збільшувалася в 2,1 раза ( $P < 0,05$ ). При введенні в культуру малих інтерферуючих РНК експресія мРНК цього білка зменшувалася в 2,4 раза ( $P < 0,05$ ), при цьому знижувалася експресія мРНК субодиниць протеасоми  $\beta 5$  і  $\beta 9$  в 1,3 ( $P > 0,05$ ) та 1,6 ( $P < 0,05$ ) раза відповідно в порівнянні з контролем (введення індиферентних дволанцюгових РНК). При цьому зменшувалася кількість живих клітин у культурі (70,26 %  $\pm$  1,54 %,  $P < 0,05$ ), збільшувалася кількість некротичних (25,92 %  $\pm$  1,52 %,  $P > 0,05$ ), апоптотичних (4,32 %  $\pm$  0,53 %,  $P > 0,05$ ) і клітин з ознаками аутофагії (38,2 %  $\pm$  3,81 %,  $P < 0,05$ ). При цьому заглушення UBB при аноксії–реоксигенації (30 хв – 1 год) збільшувало кількість живих клітин на 3,7 % і зменшувало кількість некротичних кардіоміоцитів на 4,7 % та не впливало на популяцію апоптотичних та аутофагічних клітин. Отримані результати свідчать про те, що заглушення UBB, експресія якого збільшується при аноксії–реоксигенації, індукує некротичну та аутофагічну загибель інтактних культивованих кардіоміоцитів, однак деякою мірою збільшує резистентність цих клітин до аноксії–реоксигенації.*

*Ключові слова:* убіквітин, РНК-інтерференція, кардіоміоцити.

### **ВСТУП**

Оскільки серце постійно функціонує з великим навантаженням, що потребує інтенсивного синтезу нових протеїнів, то постає нагальна потреба контролю за фолдингом новосинтезованих і своєчасною утилізацією «відпрацьованих» білків. Ефективність виконання такого завдання забезпечується потужною системою контролю за якістю протеїнів, яка складається насамперед із шаперонів та убіквітинзалежного протеасомного протеолізу

(УПП). Функціонування останнього визначається двома основними процесами: убіквітинізацією (ковалентна модифікація білка-мішені за допомогою приєднання ланцюжка низькомолекулярного білка убіквітину) та гідролізом маркованих таким чином білків мультиферментним комплексом під назвою протеасома. Про важливу роль системи УПП для нормальної роботи клітин серця свідчать дані про його порушення при експериментальному відтворенні серцевої патології, зокрема ішемії,

© В.О. Кириченко, В.С. Нагібін, Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, В.К. Рибальченко, О.О.Мойбенко

ішемії–реперфузії та гіпертрофії серця [2, 7, 16], і при реальних захворюваннях людини (кардіоміопатіях, інфаркті міокарда, гіпертрофії) [1, 3]. Зокрема, показано, що активність протеасоми 26S при моделюванні ішемії міокарда суттєво знижується, що пояснюється високою чутливістю цього комплексу до оксидативного ушкодження [2]. При відтворенні аноксії–реоксигенації для кардіоміоцитів встановлено, що активність протеасоми зменшується при аноксії, але швидко відновлюється до контрольного значення після реоксигенації, а застосування інгібіторів протеасоми при цьому дає змогу захистити кардіоміоцити від ушкодження [2]. Введення селективних інгібіторів протеасоми в експерименті *in vivo* при моделюванні ішемії–реперфузії серця також призводило до зменшення розмірів ділянки інфаркту міокарда [16]. При цьому зрозуміло, що адекватна робота протеасоми, а саме специфічність і вибірковість протеолізу, забезпечується системою убіквітинізації, в якій убіквітин займає ключове положення. Він є внутрішньоклітинним, низькомолекулярним, висококонсервативним регуляторним протеїном, що складається з 76 амінокислотних залишків (молекулярна маса 8564,5 Да). Основна його функція полягає у маркуванні білків, що підлягають протеасомній деградації. Встановлено, що убіквітин є важливим не лише для здійснення протеасомного протеолізу, а й відіграє велику роль у правильній компартменталізації білків, внутрішньоклітинній сигналізації, сортуванні трансмембранних білків та їхньому транспорті [18, 19, 20]. В останні роки показано, що убіквітин розглядається як один із перспективних молекулярних маркерів захворювань серця, оскільки його експресія значно підвищується у пацієнтів з гострим інфарктом міокарда та стенокардією [4]. Однак експресія генів, що кодують різні субдиниці протеасоми, не вивчалася, і це не дає можливість об'ек-

тивно оцінити ефективність роботи УПП як цілісної системи деградації внутрішньоклітинних протеїнів.

Мета цієї роботи – вивчити ефекти заглушення гена убіквітину (UBB – від англ. Ubiquitin B) із застосуванням малих інтерферуючих РНК (siRNA) в культивованих кардіоміоцитах, визначити експресію генів, що кодують субдиниці протеасоми (PSMB5 і PSMB9) і дослідити резистентність таких клітин до аноксії–реоксигенації.

## МЕТОДИКА

*Культикування ізолюваних кардіоміоцитів та моделювання аноксії–реоксигенації.* Дослідження проведені на щурах лінії Вістар віком 2 доби. Культуру кардіоміоцитів отримували за методикою Reineske [19]. Тварин знерухомлювали за допомогою цервікальної дислокації, через повздовжній розріз грудної порожнини виймали серце. Шлуночки відокремлювали від передсердь, відмивали в стерильному буферному сольовому розчині (рН 7,4) такого складу (ммоль/л): HEPES – 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4 та K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,4. Після цього їх механічно подрібнювали ножицями на шматочки, розміром приблизно 1 мм<sup>3</sup> та переносили у “свіжу” порцію буфера, що містив 0,34 мг/мл колагенази II типу та 0,6 мг/мл панкреатину. Проводили 3–4 цикли інкубування по 10 хв при 37°C, центрифугували (400 g, 1,5 хв), а осад ресуспендували в 1 мл середовища для культивування, до якого входили середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM) та середовище 199 у співвідношенні 4:1, ембріональна теляча сироватка – 15 %, NaHCO<sub>3</sub> – 4,2 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль/л, стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл і пеніцилін – 100 ОД/мл. Кількість живих і загиблих клітин підраховували в камері Горяєва при додаванні 0,2%-го трипанового синього.

Отримані клітини висаджували з розрахунку 120 000 клітин на 1 см<sup>2</sup> поверхні в 16-лункові пластикові планшети для культур клітин на скло, вкрите 2%-м желатином. Культивування кардіоміоцитів проводили в живильному середовищі, при 37°C у газовому середовищі: 5 % CO<sub>2</sub> та 95 % атмосферного повітря. Через 24 год культивування змінювали живильне середовище та моделювали аноксію–реоксигенацію таким чином: подавання газової суміші, що включала 5 % CO<sub>2</sub> та 95 % Ar протягом 30 хв у ексікаторі з щільно притертою кришкою, куди зазначену газову суміш подавали через стерилізуючий фільтр (діаметр пор фільтра 0,22 мкм) і шар стерильної води, налитий на дно ексікатора. Для моделювання реоксигенації після аноксії замінювали живильне та газове середовища (без аргону) та культивували клітини протягом 1 або 24 год [6].

*РНК-інтерференція in vitro.* РНК для специфічного заглушення UBB, а також індиферентні РНК (Scr siRNA, від англ. scrambled RNA), що не впливають на експресію жодного гена, були синтезовані на замовлення фірмою «Metabion» (Німеччина) і мали таку послідовність нуклеотидів:

UBB-Sense-5`-GGCCAAGAUCAG GAUAAAUU-3`,

UBB-Antisense-5`-UUUAUCCUGGA UCUUGGCCUU-3`,

Scrambled-Sense-5`-UGUUCAGCGAA AUAUAACCUU-3`,

Scrambled-Antisense-5`-GGUUAUAUU UCGCUGAACAUU-3`.

Дволанцюгові РНК отримували безпосередньо перед введенням в клітини, згідно з протоколом виробника: розчини відповідних сенсових і антисенсових олігонуклеотидів розводили двічі за допомогою буфера для анелінгу, що містив (ммоль/л): HEPES-KOH – 30 (рН 7,4), KCl – 100, MgCl<sub>2</sub> – 2, NH<sub>4</sub>Ac – 50. В окрему пробірку вносили рівні об'єми кожного з розчинів і

додавали удвічі менший об'єм буфера. Отриману суміш інкубували 1 хв при 90 °C і протягом 45 хв охолоджували до кімнатної температури у термоциклері “GeneAmp System 2700”. Введення у кардіоміоцити специфічних до мРНК убіквітину чи індиферентних дволанцюгових РНК здійснювали за допомогою набору для трансфекції кардіоміоцитів «Rat Cardiomyocytes Neo Nucleofector Kit» («Lonza», Швейцарія) та приладу Nucleofector («Lonza», Швейцарія). Кардіоміоцити у живильному середовищі переносили у пробірки та осаджували центрифугуванням при 400 g протягом 90 с. До клітинного осаду додавали 100 мкл буфера, що містив 85 мкл розчину для трансфекції кардіоміоцитів щура та 15 мкл розчину «Supplement-1» (за рекомендаціями виробника) а також 7,5 мкл розчину контрольних (індиферентних) чи UBB-специфічних дволанцюгових РНК (20 мкмоль). Вміст пробірок обережно перемішували, переносили в кювети для трансфекції, які поміщали у нуклеофектор і проводили трансфекцію за протоколом виробника. Вміст кювет переносили у нове середовище та культивували за наведеною вище схемою протягом доби. Всі операції проводилися при 37 °C.

*Виділення РНК, зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.* РНК виділяли із використанням набору Trizol RNA-prep («Isogen», Росія) з культур кардіоміоцитів, що зазнавали введення специфічних до мРНК убіквітину чи індиферентних дволанцюгових РНК за допомогою електропорації. Концентрацію виділеної РНК визначали спектрофотометром NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», США). Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили із використанням First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва), застосовуючи 1,2–1,5 мкг загальної РНК і гексамерний праймер. Отримана внаслідок ЗТ комплементарна ДНК (кДНК) зазнавала генспецифічної полімеразної ланцю-

гової реакції (ПЛР)-ампліфікації. Для оцінки експресії мРНК убіквітину ми використовували праймери такої послідовності: прямий: UBB-F 5'-GGCAAGACCATCASCCTG-3', зворотний: UBB-R 5'-CTGAAGAATTAATAGCCA-3'. Експресію UBB стандартизували відносно експресії гена  $\beta$ -актину як ендогенного контролю, для якого використовувалися праймери такої послідовності: прямий:  $\beta$ -actin-F 5'-CTTAGAGG GACAAGTGGCG-3' та зворотний:  $\beta$ -actin-R 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'. ПЛР-ампліфікація UBB проводилася у 10 мкл суміші для ПЛР у реальному часі з барвником (SYBR Green), що містив 40 пмоль кожного праймера. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера «7500 Fast Real-Time PCR System». Програму ампліфікації починали з попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95°C і продовжували 45 циклами, кожен з яких складався з: денатурації при 95°C (19 с), приєднання праймерів та елонгації при 58°C (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 58 до 95°C із реєстрацією зниження інтенсивності флуоресценції комплексів двохланцюгових ДНК з SYBR Green. Визначали відносний рівень експресії гена UBB із застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії =  $2^{-\Delta Ct}$ , де Ct – пороговий цикл ампліфікації). Для кількісної оцінки експресії генів PSMB5 використовували набір TaqMan Gene Expression Assay 7500 Rn01488742\_m1, а для оцінки експресії PSMB9 – Custom TaqMan Gene Expression Assay 7500. Проби для відповідних генів розроблені на основі послідовності мРНК щура («Applied Biosystems», США). Експресію генів PSMB5 та PSMB9 нормалізували відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GADPH) як ендогенного контролю, використовуючи реактив TaqMan Rodent GADPH

Control Reagent (VIC™Probe). ПЛР-ампліфікація складалася з 50 таких циклів: початкова денатурація при 95°C упродовж 20 с, з наступною обробкою при 95°C протягом 3 с, приєднання праймерів та елонгація – 60 °C, 30 с. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення “7500 Fast Real-time PCR Software”.

Визначення кількості живих, некротичних апоптотичних та аутофагічних клітин. Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин визначали прижиттєвим фарбуванням кардіоміоцитів бісбензимідом (Hoechst 33342) та йодидом пропідіуму [6] в концентрації 8,75 мкмоль/л та оцінювали за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200, фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330–380 та 510–560 нм для Hoechst та йодиду пропідіуму відповідно). Для виявлення аутофагічних вакуолей у клітинах використовували специфічний барвник – монодансилкадаверин (прижиттєве забарвлення) в концентрації 100 мкмоль/л (фільтр UV-2A, довжина хвилі збудження 330–380 нм).

Статистична обробка. Отримані цифрові результати обробляли статистично з використанням програми Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) та Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США). Вірогідність відмінностей середніх значень ( $P < 0,05$ ) визначали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експресія UBB в культурі ізольованих кардіоміоцитів при моделюванні аноксії–реоксигенації та при введенні siRNA, специфічних до UBB. За допомогою ПЛР у реальному часі було показано, що моделювання аноксії–реоксигенації (в режимі 30 хв – 24 год) призводить до підвищення експресії мРНК убіквітину в 2,1 раза ( $P < 0,05$ ; рис. 1).

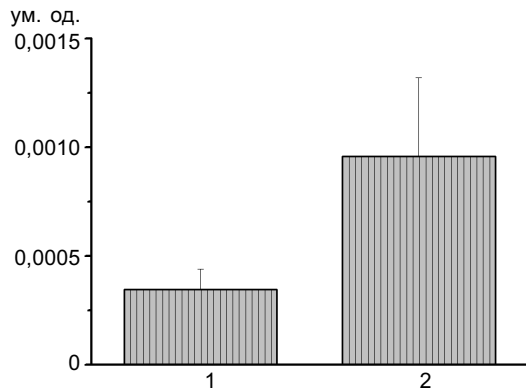


Рис. 1. Експресія мРНК убіквітину в культурі кардіоміоцитів за умов моделювання анексії-реоксигенації (n=5): 1 – контроль, 2 – культура кардіоміоцитів, що підлягали моделюванню анексії-реоксигенації

При введенні в культуру кардіоміоцитів малих інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК убіквітину, експресія цього гена знижувалася в 2,4 раза ( $P < 0,05$ ; рис. 2), що є підтвердженням ефективності його заглушення.

Експресія генів протеасомних субодиниць PSMB5 та PSMB9 в культурі ізольованих кардіоміоцитів при заглушенні UVB. У культурах клітин нами також було визначено рівні експресії двох протеасомних субодиниць:  $\beta 5$ , що відповідає за хімотрипсिनоподібну активність ферменту

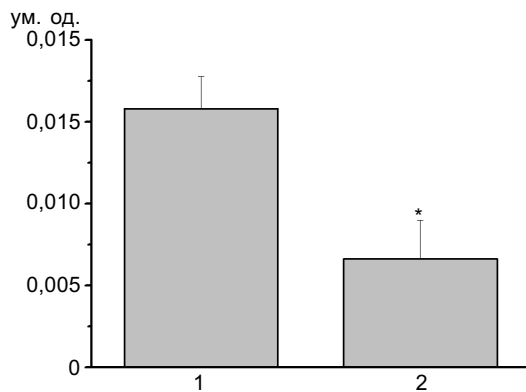


Рис. 2. Експресія мРНК убіквітину в культурі кардіоміоцитів за умов специфічного заглушення цього гена за допомогою інтерферуючих РНК (n=5): 1 – контрольна культура кардіоміоцитів, якій було введено індиферентні РНК; 2 – культура, у яку було введено специфічні інтерферуючі РНК (siRNA) до гена убіквітину. \* $P < 0,05$  у порівнянні з контролем

(рис. 3,а) та індукційної субодиниці  $\beta 9$  (див. рис 3,б). Рівень експресії мРНК указаних субодиниць знижувався в 1,3 ( $P > 0,05$ ) та 1,6 ( $P < 0,05$ ) раза відповідно порівняно з контролем (введення індиферентних siRNA). Такий ефект може опосередковано вказувати на залежність експресії субодиниць протеасоми від вмісту убіквітину в клітині або певних поліубіквітинізованих білків, вміст яких знижується в разі інтерференції UVB.

Співвідношення живих, некротичних, апоптотичних та аутофагічних клітин в культурі кардіоміоцитів при введенні інтерферуючих РНК до убіквітину та при моделюванні анексії-реоксигенації. Заглу-

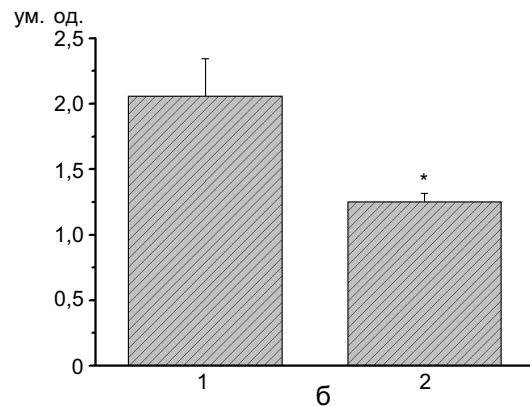
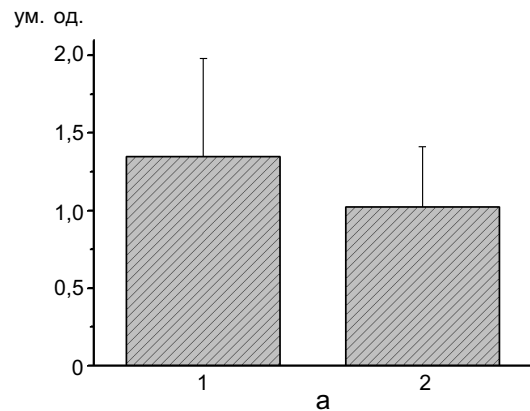


Рис. 3. Експресія генів протеасомних субодиниць PSMB5 (а) та PSMB9 (б) у культурі кардіоміоцитів за умов специфічного заглушення гена убіквітину (n=5). 1 – контрольна культура кардіоміоцитів, якій було введено індиферентні РНК; 2 – культура, у яку було введено специфічні інтерферуючі РНК (siRNA) до гена убіквітину. \* $P < 0,05$  у порівнянні з контролем

шення UBВ у культурі кардіоміоцитів спричиняло зміни у співвідношенні живих клітин і клітин з ознаками різних видів запрограмованої та незапрограмованої клітинної смерті. Так, через добу після введення дволанцюгових РНК, специфічних до мРНК UBВ, кількість живих клітин у культурі зменшувалася до  $70,26 \% \pm 1,54 \%$  ( $P < 0,05$ ) порівняно з контрольними культурами (введення scg siRNA), відсоток живих клітин у яких становив  $75,58 \% \pm 1,54 \%$  (рис. 4,а). Однак при відтворенні аноксії з подальшою реоксигенацією кількість живих клітин у контролі зменшувалася до  $66,58 \% \pm 1,52 \%$  ( $P < 0,05$ ), тоді як попереднє заглушення UBВ у культурах клітин, навпаки, спричиняло протективний ефект – відсоток живих клітин не відрізнявся від контрольних значень –  $70,3 \% \pm 3,39 \%$  ( $P > 0,05$ ).

Негативні наслідки для культури кардіоміоцитів при введенні специфічних інтерферуючих РНК проявлялися в збільшенні кількості клітин, що гинули через некроз – до  $25,92 \% \pm 1,52 \%$  ( $P > 0,05$ ) порівняно з контрольними культурами ( $23,61 \% \pm 1,56 \%$ ; див. рис. 4,б). Проте клітини зі зниженою експресією UBВ проявляли більшу стійкість до пошкоджувальної дії аноксії–реоксигенації та мали тенденцію до зменшення вмісту некротичних клітин до  $21,51 \% \pm 2,42 \%$  ( $P > 0,05$ ) порівняно з культурами, яким вводили індіферентні РНК ( $26,22 \% \pm 1,73 \%$ ).

Кількість апоптотичних клітин в культурі з заглушенням UBВ мала тенденцію до збільшення до  $4,32 \% \pm 0,53 \%$  ( $P > 0,05$ ) порівняно з контролем ( $3,49 \% \pm 0,3 \%$ ; див. рис. 4,в). При відтворенні аноксії–реоксигенації вміст апоптотичних клітин був підвищеним як у культурах, що підлягали трансфекції інтерферуючих РНК ( $6,55 \% \pm 0,55 \%$ ;  $P > 0,05$ ), так і в контрольних культурах ( $6,44 \% \pm 0,6 \%$ ). Тобто кількість апоптотичних клітин суттєво не змінювалася при інтерференції UBВ.

Кількість клітин з ознаками аутофагії

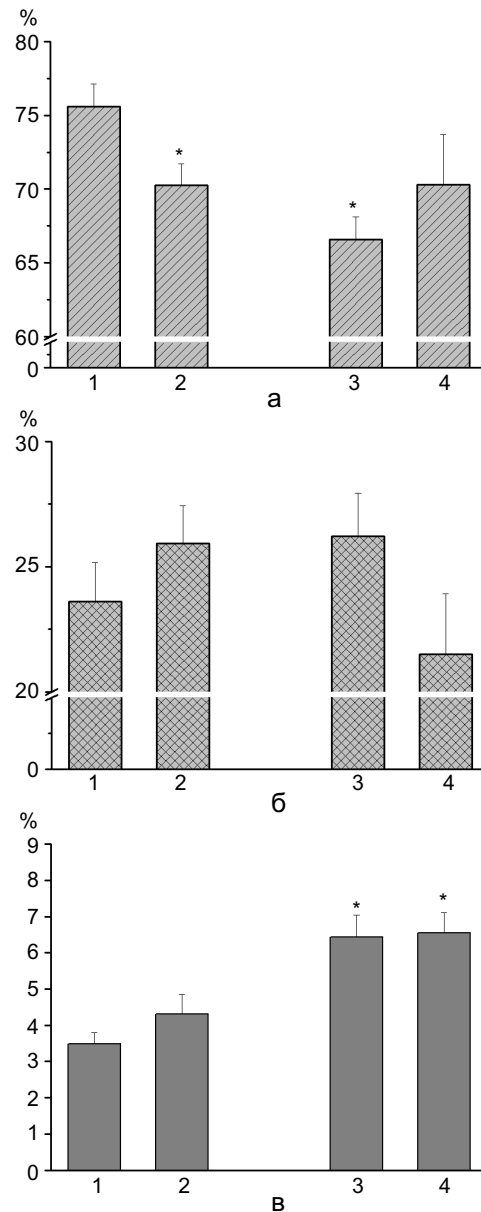


Рис. 4. Зміни кількості живих (а), некротичних (б) та апоптотичних (в) клітин у первинній культурі ізолюваних кардіоміоцитів неонатальних щурів при відтворенні аноксії–реоксигенації на тлі пригнічення експресії гена убіквітину. 1 – контрольні культури, у які було введено індіферентні РНК; 2 – культури, у які було введено специфічні до мРНК убіквітину інтерферуючі РНК; 3 – аноксія–реоксигенація на тлі введення індіферентних РНК; 4 – аноксія–реоксигенація на тлі введення інтерферуючих РНК (n=15). \* $P < 0,05$  порівняно з контрольними культурами, у які було введено індіферентні РНК

після введення інтерферуючих РНК до UVB збільшувалася до  $38,2 \% \pm 3,81 \% (P < 0,05)$  у порівнянні зі введенням індиферентних РНК ( $23,55 \% \pm 1,33 \%$ ; рис. 5). Однак моделювання аноксії–реоксигенації в таких культурах не викликало значного збільшення клітин з ознаками аутофагії, кількість яких становила  $34,08 \% \pm 4,61 \% (P > 0,05)$  порівняно з контрольними культурами при моделюванні аноксії–реоксигенації ( $29,44 \% \pm 3,02 \%$ ).

Отже, заглушення UVB порушувало життєздатність кардіоміоцитів у культурі, що не дивно з огляду на величезне значення процесів убіквітинізації в клітинах. На нашу думку, можливість їх існування можна пояснити лише компенсаторним збільшенням експресії інших убіквітиноподібних протеїнів (малий убіквітиноподібний модифікатор (від англ. small ubiquitin-like modifier) – SUMO та білок, експресія якого знижується в процесі розвитку в попередниках нервових клітин – Nedd8), що також слугують міткою для розпізнавання білкових молекул протеасомою [10, 14, 22].

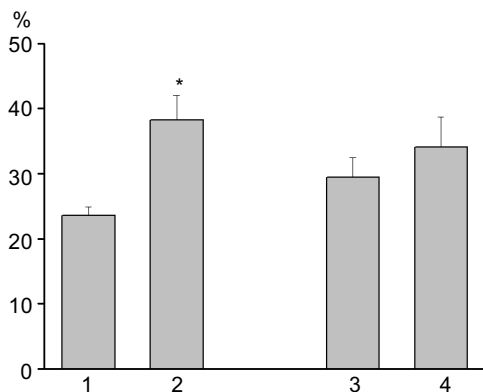


Рис. 5. Зміни кількості клітин з ознаками аутофагії у первинній культурі ізолюваних кардіоміоцитів неонатальних щурів при відтворенні аноксії–реоксигенації. 1 – контрольні культури, у які було введено індиферентні РНК; 2 – культури, у які було введено специфічні до мРНК убіквітину інтерферуючі РНК; 3 – аноксія–реоксигенація на тлі введення індиферентних РНК; 4 – аноксія–реоксигенація на тлі введення інтерферуючих РНК (n=15). \*P<0,05 порівняно з контрольними культурами, у які було введено індиферентні РНК

Проте очевидно, що вказані протеїни не можуть повністю взяти на себе функції убіквітину.

Досить несподіваним для нас виявився той факт, що інтерференція UVB стимулювала більшою мірою незапрограмований вид клітинної смерті – тобто некроз, при тому, що нині немає літературних даних стосовно ролі убіквітину в індукції некрозу. Однак ушкоджені таким чином кардіоміоцити проявляли значно більшу стійкість до аноксії–реоксигенації, що відображалася у збільшенні кількості живих клітин і зменшенні некротичних. Вочевидь, заглушення UVB може розглядатися як особливий варіант прекодиціювання.

Відомо, що практично всі фактори прекодиціювання справляють ушкоджувальний ефект на клітини чи цілий орган, проте забезпечують стійкість до ішемічно–реперфузійного ураження. В наших попередніх роботах було показано, що інгібітори протеасоми індують апоптотичну та аутофагічну клітинну смерть у культурі кардіоміоцитів, але визначають підвищену резистентність клітин до аноксії–реоксигенації в разі пригнічення активності протеасоми безпосередньо перед припиненням оксигенації (раннє прекодиціювання) та у віддаленому періоді (пізнє прекодиціювання), коли термін між аплікацією інгібітора протеасоми становив 24 год [6, 21]. Слід зазначити, що протективний ефект як інтерференції UVB, так і інгібіторів протеасоми досягався внаслідок зменшення кількості саме некротичних клітин. Поясненням цього феномена, на нашу думку, може бути те, що субстратами протеасомного протеолізу є, зокрема, основні антиоксидантні ферменти: супероксиданіондисмутаза та каталаза [3, 7, 8], а, отже, порушення їх убіквітинізації або зменшення деградації протеасомою буде сприяти стабілізації вмісту вказаних білків у клітині. Це внаслідок зменшення оксидативного ушкодження та запобігає руй-

нуванню мембран клітин вільними радикалами і, як наслідок, – некрозу.

Добре відомо, що ішемічне ушкодження клітин призводить до накопичення великої кількості пошкоджених, окиснених білків, що поряд з нестачею вільних амінокислот у клітині є сигналом до активації лізосомного протеолізу, який є кінцевим елементом аутофагії. Показано, що блокування УПП на різних рівнях призводить до значної активації аутофагічних процесів [5, 23]. У наших дослідах показано, що заглушення мРНК убіквітину спричинює значне підвищення вмісту клітин з ознаками аутофагії, проте кількість аутофагічних клітин не відрізняється в контрольній і дослідній групах (введення індиферентних або специфічних siRNA). Такий ефект, на нашу думку, може бути зумовлений тим, що убіквітин є селективним сигналом для аутофагічної деградації різних типів субстратів – від білкових агрегатів до мембранних органел [12]. Більше того, ідентифіковано білки p62 та NBR1 (від англ. neighbor of BRCA1 gene 1), що відіграють роль рецепторів для полібіквітинізованих протеїнів і їх скупчень та здатні здійснювати аутофагічну деградацію останніх [11, 15]. Тому зниження вмісту убіквітину в клітині та мічених ним білків може призводити до обмеження аутофагічної дегенерації.

## ВИСНОВКИ

1. Заглушення експресії UBV із застосуванням малих інтерферуючих РНК викликає зменшення життєздатності кардіоміоцитів і збільшує популяцію некротичних клітин.

2. При аноксії–реоксигенації зниження вмісту мРНК убіквітину зменшує некротичну загибель кардіоміоцитів і збільшує кількість живих кардіоміоцитів.

3. Заглушення експресії UBV спричинює зниження експресії мРНК субодиниць протеасоми  $\beta 5$  та  $\beta 9$ , що робить додатковий внесок до порушення протеасомного

протеолізу в культивованих кардіоміоцитах.

4. Установлений парадоксальний ефект (індукція некротичної та аутофагічної клітинної смерті інтактних кардіоміоцитів і збільшення їх витривалості при аноксії–реоксигенації) інтерференції UBV може бути віднесений до концепції прекодиціювання як підвищеної стійкості ушкоджених клітин, зокрема кардіоміоцитів при патології серця.

**В.А.Кириченко, В.С. Нагибин,  
Л.В. Тумановская, В.Е. Досенко,  
В.К. Рибальченко, А.А. Мойбенко**

## ЭФФЕКТЫ ЗАГЛУШЕНИЯ ГЕНА УБИКВИТИНА ПРИ АНОКСИИ-РЕОКСИГЕНАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КАРДИОМИОЦИТОВ

Принимая во внимание важнейшую роль убиквитин-зависимого протеасомного протеолиза в обмене функциональных белков кардиомиоцитов (актина, миозина, ионных каналов и др.), представляется интересным исследование механизмов клеточной смерти при специфическом заглушении гена убиквитина (UBV) с помощью РНК-интерференции и моделировании аноксии–реоксигенации. Интерферирующие РНК вводили с помощью электропорации в изолированные неонатальные кардиомиоциты, после чего первичная культура клеток подвергалась действию аноксии (30 мин) с последующей реоксигенацией (1 или 24 ч). Процент живых, некротических, апоптотических и аутофагических кардиомиоцитов определяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Количественная оценка экспрессии генов UBV и субъединиц протеасомы  $\beta 5$  (PSMB5) и  $\beta 9$  (PSMB9) проводилась с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Показано, что при моделировании аноксии–реоксигенации в режиме 30 мин – 24 ч экспрессия мРНК убиквитина увеличивалась в 2,1 раза ( $P < 0,05$ ). При введении в культуру малых интерферирующих РНК экспрессия мРНК данного белка уменьшалась в 2,4 раза ( $P < 0,05$ ), при этом снижалась экспрессия мРНК субъединиц протеасомы  $\beta 5$  и  $\beta 9$  в 1,3 ( $P > 0,05$ ) и 1,6 ( $P < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с контролем (введение индиферентных двухцепочечных РНК). При этом уменьшалось количество живых клеток в культуре ( $70,26 \pm 1,54 \%$ ,  $P < 0,05$ ), увеличивалось количество некротических ( $25,92 \pm 1,52 \%$ ,  $P > 0,05$ ), апоптотических ( $4,32 \pm 0,53 \%$ ,  $P > 0,05$ ) и клеток с признаками аутофагии ( $38,2 \pm 3,81 \%$ ,  $P < 0,05$ ). При этом заглушение гена убиквитина при аноксии–реоксигенации (30 мин – 1 ч) увеличивало количество живых клеток на 3,7 % и уменьшало количество некротических кардиомиоцитов на 4,7 % и не влияло на популяцию апоптотических и аутофагических клеток. Полученные



данные свидетельствуют о том, что заглушение гена UBB, экспрессия которого увеличивается при аноксии–реоксигенации, индуцирует некротическую и аутофагическую гибель интактных культивируемых кардиомиоцитов, однако в некоторой степени увеличивает резистентность этих клеток к аноксии–реоксигенации. Ключевые слова: убиквитин, РНК-интерференция, кардиомиоциты.

**V.O. Kyrychenko, V.S. Nagibin,  
L.V. Tumanovska, V.E. Dosenko,  
V.K. Rybalchenko, O.O. Moibenko**

### **EFFECTS OF UBIQUITIN GENE SILENCING IN ANOXIA-REXYGENATION OF NEONATAL CARDIOMYOCYTES**

Ubiquitin-dependent proteasomal proteolysis is crucial in the turnover of cardiomyocytes functional proteins (actin, myosin, ion channels at al), therefore, investigation of cell death after ubiquitin (UBB) gene silencing using RNA interference and anoxia-reoxygenation (AR) modeling appears to be attractive. Cardiomyocytes were transfected by siRNA to ubiquitin gene using electroporation procedure, and then primary culture was treated by 30 min of anoxia and 60 min of reoxygenation. The number of living, necrotic and apoptotic cardiomyocytes was determined by fluorescence microscopy. The level of UBB and proteasome subunits  $\beta 5$  (PSMB5) and  $\beta 9$  (PSMB9) mRNA expression was estimated by real-time PCR. It was shown that UBB mRNA expression was increased by 2.1 times after AR modelling ( $P < 0.05$ ). Small interference RNA injection in cell culture decreased ubiquitin, PSMB5 and PSMB9 expression by 2.4 ( $P < 0.05$ ), 1.3 ( $P > 0.05$ ) and 1.6 ( $P < 0.05$ ) times, respectively, compared with control (scrambled siRNA introduction). At the same time, the number of living cardiomyocytes decreased to  $70.26 \pm 1.54\%$ ,  $P < 0.05$ , and the level of necrotic cells, apoptotic cells and cells with signs of autophagy augmented by  $25.92 \pm 1.52\%$ , ( $P = 0.38$ ),  $4.32 \pm 0.53\%$  ( $P = 0.15$ ) and  $38.2 \pm 3.81\%$  ( $P = 0.001$ ), respectively. Ubiquitin silencing after AR (30 min/1 h) increased the number of living cells by 3.7% and decreased the number of necrotic cells by 4.7% and did not alter the apoptotic and autophagic cells populations. The data obtained indicate that ubiquitin gene silencing, mRNA expression of which augmented during AR, induces necrotic and autophagic death of intact neonatal cardiomyocytes in culture, but enhances the AR resistance of these cells to some extent.

Key words: ubiquitin, RNA-interference, cardiomyocytes.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Пашевін Д.О., Досенко В.С., Биць Ю.В., Мойбенко

О.О. Зміни активності протеасоми в тканинах аорти, серця та лейкоцитах крові в процесі моделювання холестеринного атеросклерозу // *Фізіол. журн.* – 2007. – **53**, №6. – С.3–10.

2. Bulteau A.L., Lundberg K.C., Humphries K.M. Sadek H.A., Szweida P.A., Friguet B., Szweida L.I. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P.30057–30063.
3. Cao C., Leng Y., Liu X., Yi Y., Li P., Kufe D. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases // *Biochemistry.* – 2003. – **42**, №35. – P.10348–10353.
4. Chen S.M., Li Y.G., Wang D.M. Zhang G.H., Tan C.J. Expression of heme oxygenase-1, hypoxia inducible factor-1alpha, and ubiquitin in peripheral inflammatory cells from patients with coronary heart disease // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2009. – **47**, №3. – P.327–333.
5. Ding W.X., Ni H.M., Gao W. Yoshimori T., Stolz D.B., Ron D., Yin X.M. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability // *Amer. J. Pathol.* – 2007. – **171**, №2. – P.513–524.
6. Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V., Zagoriy V.Y., Moibenko A.A., Vaage J. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, preconditioning and postconditioning of isolated cardiomyocytes // *Pathophysiology.* – 2006. – **2**. – P.119–125.
7. Gross E.R., Gross G.J. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – **70**, №2 – P.212–221.
8. Hoffman E.K., Wilcox H.M., Scott R.W., Siman R. Proteasome inhibition enhances the stability of mouse Cu/Zn superoxide dismutase with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurol. Sci.* – 1996. – **139**, №1. – P.15–20.
9. Ikeda F., Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals // *EMBO reports.* – 2008. – **9**, №6. – P.536–542.
10. Kim K.I., Baek S.H. Small ubiquitin-like modifiers in cellular malignancy and metastasis // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2009. – **273**. – P.265–311.
11. Kirkin V., Lamark T., Johansen T., Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets // *Autophagy.* – 2009 – **5**, №5. – P.732–733.
12. Kirkin V., McEwan D.G., Novak I., Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy // *Mol Cell.* – 2009. – **34**, №3. – P.259–69.
13. Kostin S., Pool L., Elsdesser A., Hein S., Drexler H.C., Arnon E., Hayakawa Y., Zimmermann R., Bauer E., Klueckorn W.P., Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts // *Circulat. Res.* – 2003. – **92**, №7. – P.715–724.
14. Kumar S., Yoshida Y., Noda M. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **195**, №1. – P.393–399.

15. Lamark T., Kirkin V., Dikic I., Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets // Cell Cycle. – 2009. – **8**, №13. – P.1986–1990.
16. Luss H., Schmitz W., Neumann J. A proteasome inhibitor confers cardioprotection // Cardiovasc. Res. – 2002. – **54**. – P.140–151.
17. Mearini G., Schlossarek S., Willis M.S., Carrier L. The ubiquitin–proteasome system in cardiac dysfunction // Biochim. et Biophys. Acta. – 2008. – **1782**, №12. – P.749–763.
18. Piper R.C., Luzio J.P. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes // Curr. Opin. Cell Biol. – 2007. – **19**. – P.459–465.
19. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T. Murry C.E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // Circulation. – 1999. – **100**. – P.193–202.
20. Staub O., Rotin D. Role of Ubiquitylation in Cellular Membrane Transport // Physiol. Rev. – 2006. – **86**. – P.669–707.
21. Surovaya O.V., Dosenko V.E., Nagibin V.S., Tumanovskaya L.V., Moibenko A.A. Effects of late postconditioning on gene expression and cell death in neonatal rat cardiomyocyte cultures // Pathophysiology. – 2009. – **16**, №1. – P.47–52.
22. Wang J. SUMO conjugation and cardiovascular development // Front Biosci. – 2009. – **14**. – P.1219–1229.
23. Zhu K., Dunner K.Jr., McConkey D.J. Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells // Oncogene. – 2009. – **29**, №3. – P.451–462.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Київ. нац. у-т ім. Тараса Шевченка  
E-mail: victoria 30@mail.ru*

*Матеріал надійшов до  
редакції 18.01.2010*