

**РНК-ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ СУБОДИНИЦІ ПРОТЕАСОМИ
ГЕНУ *PSMβ7* ОБМЕЖУЄ ЕКСПРЕСІЮ мРНК *PSMβ1* І *PSMβ5*
ТА ЗНИЖУЄ ПЕПТИДИЛГЛУТАМІЛ ПЕПТИД-ГІДРОЛАЗНУ
АКТИВНІСТЬ ПРОТЕАСОМИ В КУЛЬТИВОВАНИХ
КАРДІОМІОЦИТАХ**

*В. О. КИРИЧЕНКО, Д. О. ПАШЕВІН, Л. В. ТУМАНОВСЬКА,
В. Є. ДОСЕНКО, О. О. МОЙБЕНКО*

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: victoria30@mail.ru*

*Презентовано дані про обмеження експресії некаталітичної протеасомної субодиноці β7 (*PSMβ7*) методом РНК-інтерференції. Біохімічними та генетичними методами встановлено, що обмеження гену *PSMβ7* в кардіоміоцитах призводить до зниження експресії субодиноці β7 в 16 разів. Це спричинює як двократне зменшення експресії мРНК β1-субодиноці протеасоми, так і зниження її активності (пептидилглютаміл пептид-гідролазної) на 72% ($0,48 \pm 0,2$ нМ АМК/хв) порівняно з контролем ($1,7 \pm 0,5$ нМ АМК/хв, $P < 0,05$); при цьому знижується експресія мРНК каталітичної β5-субодиноці (у 21 раз, $P < 0,05$) без зміни її протеолітичної хімотрипсиноподібної активності, а також активності трипсиноподібної β2-субодиноці. Рівень мРНК індукційної субодиноці протеасоми *PSMβ9* також залишається без змін. Активність трипептидилпептидази II не змінюється. Обмеження некаталітичної субодиноці *PSMβ7* специфічно впливає на активність і рівень експресії мРНК каталітичної субодиноці β1 та зменшує експресію *PSMβ5*, не впливаючи на її активність.*

Ключові слова: протеасома, субодиноці протеасоми, РНК-інтерференція, кардіоміоцити.

Велике значення протеасомного протеолізу в нормальному функціонуванні клітин та в патогенезі багатьох захворювань (інфаркт міокарда, артеріальна гіпертензія, пухлинний ріст тощо) [1, 2] робить протеасому вельми привабливою мішенню для найспецифічнішого, ефективного та термінованого методу впливу на експресію генів – РНК-інтерференції. При цьому протеасома є досить «складною мішенню» для РНК-інтерференції, оскільки складається із 14 різних конститутивних субодиноць: 7 α-типу та 7 β-типу, деякі з яких можуть замінюватися на індукційні. Комплекс 20S протеасоми ($\alpha_7\beta_7\alpha_7$) складається із двох ідентичних половинок, кожна з яких містить кільце із семи α- та β-субодиноць. Два внутрішніх β-кільця контактують одне з одним та формують каталітичну порожнину корової частини. Три з цих субодиноць – β1, β2 та β5 забезпечують постглютамілпептидилгідролазну, трипсиноподібну та хімотрипсиноподібну активність відповідно [3]. Оскільки під впливом інтерферону ці субодиноці можуть замінюватися так званими індукційними субодиноцями з аналогічною протеолітичною активністю, індукційні неіндуційні суб-

одиноць є малоперспективним. Крім того, одержані дані про здатність іншого гігантського протеолітичного ензиму – трипептидпептидази II (ТПП II) – виконувати функції протеасоми в умовах пролонгованого застосування хімічних інгібіторів протеасоми [4, 5].

α-Субодиноці беруть участь лише у формуванні тунелоподібної структури протеолітичного комплексу, однак не виявляють власну протеазну активність. Саме складнощі з вибором субодиноці для обмеження, на нашу думку, і обумовлюють незначну кількість робіт із застосуванням РНК-інтерференції генів, що кодують субодиноці протеасоми. Перша робота з вивчення цього питання з'явилася у 2007 році [6], де мішенню обмеження були обрані три індукційні субодиноці. У 2010 році надруковано другу роботу [7], в якій ген β7-субодиноці пригнічувався із застосуванням інтерферуючих РНК в лінії пухлинних клітин MCF-7. Це збільшувало чутливість клітин до цитостатиків. Ми також обрали β7-субодиноцю як мішень, виходячи з наступного. Marques та співавтори [8] встановили, що β7-субодиноця відіграє роль у збірці самого комплексу 20S протеасоми з її попередників. С-кінець β7-субодиноці,

взаємодіючи з β 1-субодиницею сусіднього β -кільця, стабілізує її активну конформацію, регулюючи, таким чином, ПГПГ активність [8, 9].

З огляду на наведене вище, метою роботи було встановлення ефекту зниження експресії протеасомної субодиниці β 7 шляхом використання малих інтерферуючих РНК на функціонування протеолітичних сайтів протеасоми та на експресію інших її субодиниць – β 5, що відповідає за хімотрипсिनоподібну активність, та індукцйбельної субодиниці β 9, а також на активність іншого протеолітичного ензиму – трипептидилпептидази II.

Матеріали і методи

Ізоляція і культивування неонатальних кардіоміоцитів. Культуру кардіоміоцитів одержували від шурів лінії Вістар віком 2 доби за методом Н. Reinecke [10]. Евтаназію тварин проводили шляхом цервікальної дислокації і через поздовжній розріз грудної порожнини виймали серце. Шлуночки відокремлювали від передсердь, відмивали в стерильному буферному сольовому розчині (ммоль/л): HEPES – 20, KCl – 5,4, NaCl – 116,4, глюкоза – 5,5, Na_2HPO_4 – 0,4 та K_2HPO_4 – 0,4 (pH 7,4), далі їх механічно подрібнювали ножицями 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 хвилин при 37 °С, центрифугували (400 g, 1,5 хв), осад ресуспендували в 1 мл середовища для культивування. Кількість живих та загиблих клітин підраховували в камері Горяєва за додавання 0,2%-го трипанового синього. Одержані клітини пересаджували з розрахунку 120 000 клітин на 1 см² поверхні в 16-лункові пластикові планшети для культур клітин на скельця, вкриті 2%-им желатином. Кардіоміоцити культивували в живильному середовищі, до складу якого входило DMEM і середовищі 199 у співвідношенні 4 : 1 з додаванням 15% ембріональної телячої сироватки, NaHCO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль/л, стрептоміцину – 100 мкг/мл, гентаміцину – 0,05 мг/мл та пеніциліну – 100 од./мл при 37 °С в газовому середовищі із вмістом 5% CO_2 та 95% атмосферного повітря.

РНК-інтерференція *in vitro*. РНК для специфічного обмеження гену протеасомної субодиниці PSM β 7 та індіферентні РНК (scrambled siRNA), що не впливають на експресію жодного гену, було синтезовано фірмою Metabion (Німеччина) з наступною послідовністю нуклеотидів:

PSMB7-Sense-5'-GCUAUUGCAGCUGG-CAUCUUU-3',

PSMB7-Antisense-5'-AGAUGCCAGCUG-CAAUAGCUU-3',

Scrambled-Sense-5'-UGUUCAGCGAAAU-AUAACCUU-3',

Scrambled-Antisense-5'-GGUUAUAUUUC-GCUGAACAUU-3'.

Дволанцюгові РНК одержували безпосередньо перед введенням у клітини згідно з протоколом виробника: розчини відповідних сенсових і антисенсорних олігонуклеотидів розводили вдвічі за допомогою буфера для анелінгу, що містив (ммоль/л): HEPES-KOH (pH 7,4) – 30, KCl – 100, MgCl_2 – 2, NH_4Ac – 50. В окрему пробірку вносили рівні об'єми кожного з розчинів і додавали в два рази менший об'єм буфера. Одержану суміш інкубували 1 хв при 90 °С і протягом 45 хвилин охолоджували до кімнатної температури у термоциклері «GeneAmp System 2700». Введення в кардіоміоцити малих інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК субодиниці β 7 чи індіферентних дволанцюгових РНК здійснювали за допомогою набору для трансфекції кардіоміоцитів – Rat Cardiomyocytes Neo Nucleofector Kit (Lonza, Швейцарія) та приладу Nucleofector (Lonza, Швейцарія). Кардіоміоцити в живильному середовищі переносили у пробірки та осаджували шляхом центрифугування 90 сек при 400 g. До клітинного осаду додавали 100 мкл буфера, що містив 85 мкл Rat Cardiomyocyte Nucleofector Solution та 15 мкл розчину Supplement-1 (за рекомендаціями виробника), а також 7,5 мкл розчину контрольних (індіферентних) чи PSM β 7-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 і культивували за наведеною вище схемою протягом доби. Всі операції проводилися при температурі 37 °С.

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 малих інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК PSM β 7 чи індіферентних дволанцюгових РНК, методом електропорації. Концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою спектрофотометру NanoDrop 1000 (NanoDrop, USA). Зворотною транскрипцію проводили із

використанням First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), застосовуючи 1,2–1,5 мкг загальної РНК та гексамерний праймер. Одержана комплементарна ДНК (кДНК) зазнавала генспецифічної ПЛР-ампліфікації. Для оцінки експресії мРНК *PSMβ7* використовували праймери з наступною послідовністю:

прямий (*PSMβ7-F*):

5'-CTGTCCTCACGGAGAAAGTCAC-3',

зворотний (*PSMβ7-R*):

5'-GTCACCCAGAGAGCTATCCAAC-3'.

Експресію гену *PSMβ7* стандартизували відносно експресії гену β-актину (ендогенний контроль), для чого використовували праймери з наступною послідовністю:

прямий (β-actin-F):

5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'

та зворотний (β-actin-R):

5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'.

ПЛР-ампліфікацію гену *PSMβ7* проводили у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містив 40 пмоль кожного праймеру. Об'єм доводили до 20 мкл дейонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклеру «7500 Fast Real-Time PCR System». Програма ампліфікації починалася з попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв при 95 °С та включала 45 циклів, кожен з яких складався з денатурації при 95 °С (19 с), гібридизації та елонгації при 58 °С (1 хв). Для контролю специфічності проводили стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 58 до 95 °С із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК із SYBR Green. Відносний рівень експресії гену *PSMβ7* визначали із застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії = $2^{-\Delta Ct}$, де C_t – пороговий цикл ампліфікації). Для кількісної оцінки експресії гену *PSMβ5* використовували набір TaqMan Gene Expression Assay 7500 Rn01488742_m1, а для оцінки експресії *PSMβ9* – Custom TaqMan Gene Expression Assay 7500. Проби для відповідних генів розроблені на основі послідовності мРНК щура (Applied Biosystems, США). Експресію генів *PSMβ5* та *PSMβ9* нормалізували відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) як ендogenous контролю, використовуючи TaqMan Rodent GAPDH Control Reagent (VIC™Probe). ПЛР-ампліфікація складалася з 50 наступних циклів: початкова денатурація при 95 °С впродовж 20 с з подальшою обробкою при 95 °С протягом 3 с, гібридизація та елонгація – 60 °С, 30 с. Аналіз одержаних даних прово-

дився за допомогою 7500 Fast Real-time PCR Software.

Визначення активності протеасоми та ТПП II в культурі кардіоміоцитів. Для визначення активності протеасоми та ТПП II клітини збирали з чашок, з використанням ультразвукового диспергатора (УЗД-2) руйнували мембрани, після чого центрифугували при 5 000 g 10 хвилин з метою осадити залишки незруйнованих клітинних мембран та ядер. Супернатант інкубували в буфері, що містив 25 ммоль трис-НСІ (рН 7,5) та 1 ммоль дитіотреїтолу. Для вимірювання хімотрипсиноподібної активності протеасоми використовували флуорогенний субстрат Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-аміно-4-метилкумарин; для визначення трипсиноподібної активності використовували Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-аміно-4-метилкумарин; а для пептидил-глутаміл пептид-гідролазної активності – CBZ-Leu-Leu-Glu-7-аміно-4-метилкумарин. Активність ТПП II вимірювали із застосуванням флуорогенного субстрату Ala-Ala-Phe-АМС. Після 30-хвилинної (для трипсиноподібної активності) або 60-хвилинної (для іншої активності та ТПП II) інкубації з одним із зазначених субстратів (у концентрації 6 мкмоль) флуоресценцію продуктів реакції визначали при 380 нм збудження та 440 нм емісії, використовуючи вільний 7-аміно-4-метилкумарин (АМК) як стандарт, на спектрофлуориметрі Hitachi 4000 (Hitachi, Японія). Селективні інгібітори протеасоми – кластолактацистин-β-лактон (2,5 мкмоль) чи MG132 (5 мкмоль) застосовували для визначення долі специфічної протеасомної активності. Для визначення активності ТПП II використовували специфічний інгібітор Ala-Ala-Phe-СМК. Відсоток інгібування гідролізу відповідних субстратів за дії вказаних інгібіторів визначали як протеасомну активність або активність ТПП II та виражали в нмоль АМК на 10⁶ клітин за 1 хвилину.

Статистична обробка даних. Аналіз одержаних даних проводили за допомогою програм Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США) та Microsoft Excel. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного (*M*) та стандартної похибки середнього арифметичного (*m*) для певної вибірки (*n*). Порівняння одержаних величин проводили з використанням параметричного *t*-критерію Стьюдента методом кореляційного та однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) [11]. Зміни вважали статистично достовірними при *P* < 0,05.

Результати та обговорення

Експресія генів протеасомних субодиниць $\beta 7$ (*PSM $\beta 7$*), $\beta 1$ (*PSM $\beta 1$*), $\beta 5$ (*PSM $\beta 5$*) і $\beta 9$ (*PSM $\beta 9$*) в культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів у разі введення siРНК, специфічних до *PSM $\beta 7$* . Методом ПЛР в реальному часі було показано, що за додавання до культури неонатальних кардіоміоцитів малих інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК протеасомної субодиниці $\beta 7$, експресія гену знижується в 16 разів (рис. 1, А), що є підтвердженням ефективності обмеження цього гену.

Рівні експресії трьох інших протеасомних субодиниць: $\beta 1$, що відповідає за пептидил-глутаміл пептид-гідролазну активність; $\beta 5$, що відповідає за хімотрипсиноподібну активність ензиму, та індукційної субодиниці $\beta 9$ (LMP2), що відповідає за трипсиноподібну активність імупротеасоми, змінюються. Рівень мРНК $\beta 1$ -субодиниці протеасоми знижується вдвічі ($P < 0,05$) порівняно з контролем (введення індиферентних siRNA) (рис. 1, Б). Рівень мРНК $\beta 5$ -субодиниці (рис. 1, В) знижується в 21 раз, тоді як $\beta 9$ – майже

не змінювався (рис. 1, Г). Такий ефект може свідчити про залежність експресії конститутивних субодиниць $\beta 1$ і $\beta 5$ від рівня експресії субодиниці $\beta 7$ протеасоми або від активності протеасомного комплексу та про незалежний характер експресії індукційних субодиниць.

Вплив обмеження гену *PSM $\beta 7$* на активність протеасоми та ТПП II в культурі кардіоміоцитів. При обмеженні гену *PSM $\beta 7$* шляхом введення малих інтерферуючих РНК трипсиноподібна та хімотрипсиноподібна активність протеасоми істотно не змінюється (рис. 2, А, Б). В той самий час, пептидилглутаміл пептид-гідролазна активність вірогідно знижується на 72% (рис. 2, В). При цьому активність ТПП II залишається незмінною (рис. 3).

Досить несподіваним виявився той факт, що у разі блокування експресії гену *PSM $\beta 7$* хімотрипсиноподібна активність протеасоми не змінюється, а експресія гену субодиниці $\beta 5$, яка відповідає за цю активність, знижується у 21 раз. Можна припустити, що відсутність змін в активності цієї субодиниці пов'язана з досить тривалим терміном напівжиття протеасоми (24–48 год) [12] або із компенсаторною гіперекспресією індукційної субодиниці

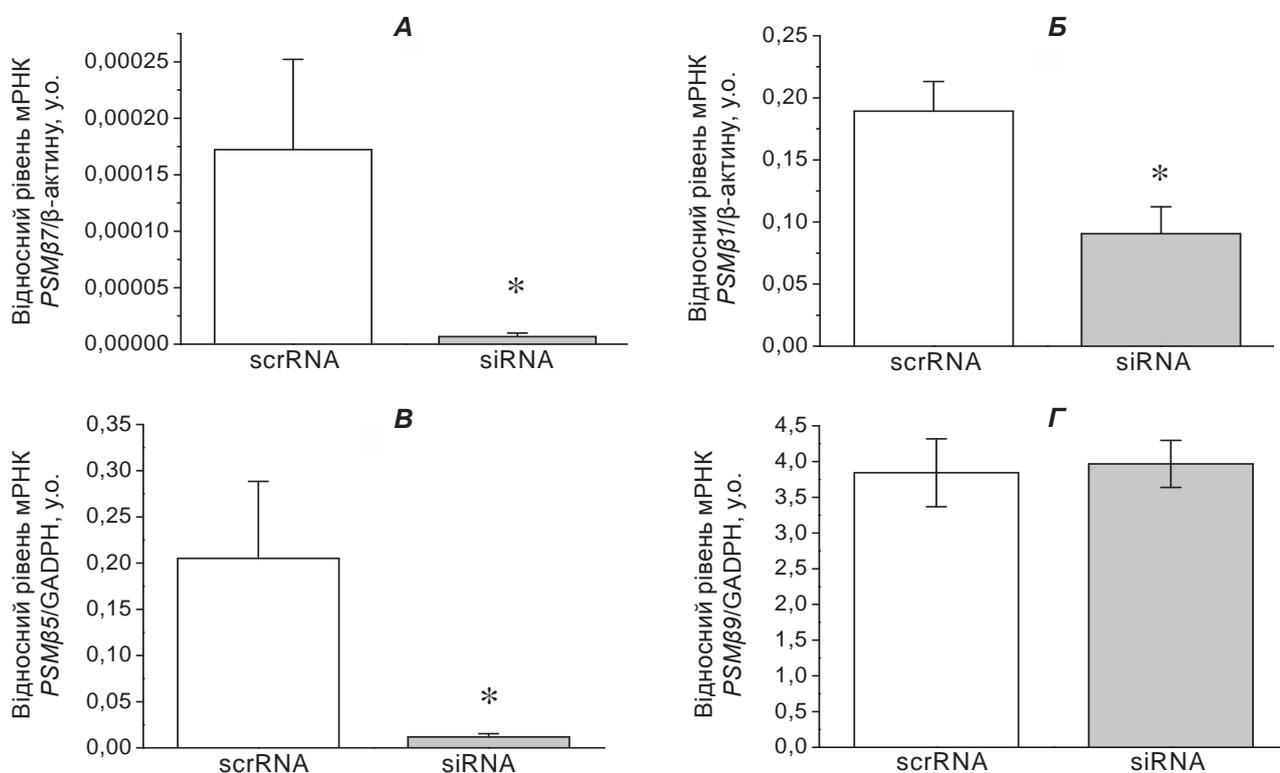


Рис. 1. Зміни експресії мРНК протеасомних субодиниць $\beta 7$ (А), $\beta 1$ (Б), $\beta 5$ (В) та $\beta 9$ (Г) в культурі кардіоміоцитів за введення індиферентних РНК (scrRNA) та малих інтерферуючих РНК, специфічних до *PSM $\beta 7$* (siRNA); $n = 7$, * $P < 0,05$ порівняно з контролем. Тут і на рис. 2, 3 позитивні та негативні розкиди стандартної похибки середнього

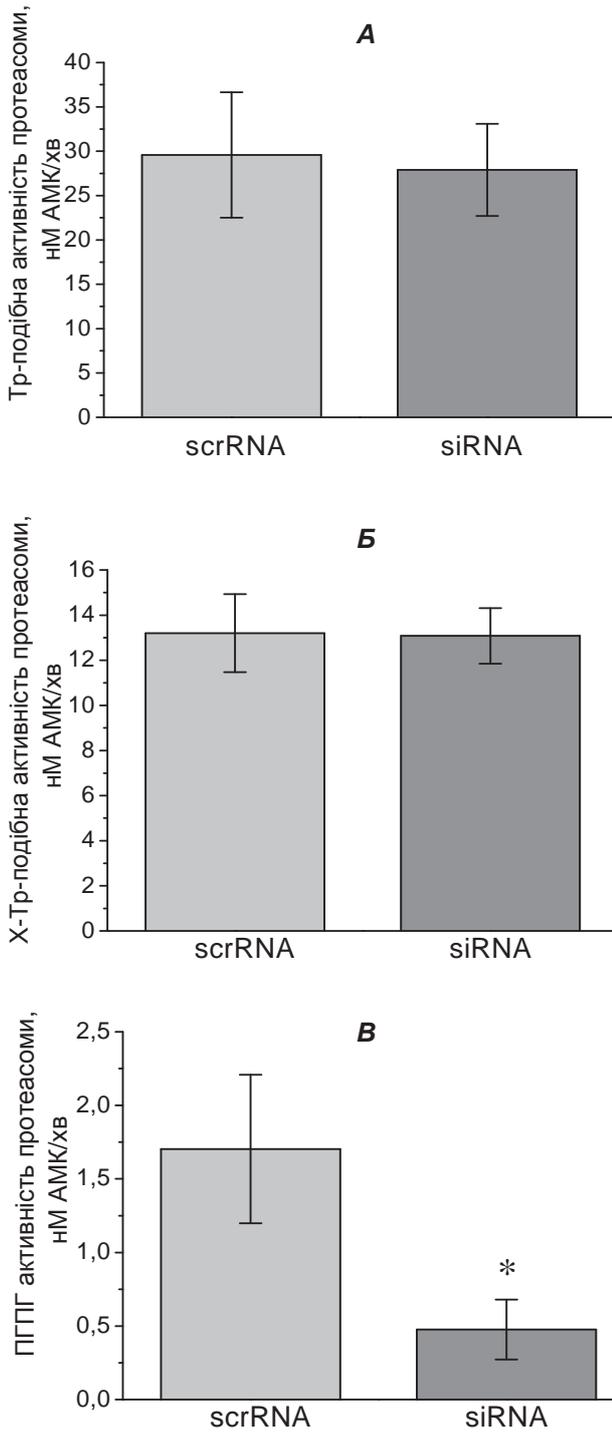


Рис. 2. Трипсиноподібна (А), хімотрипсиноподібна (Б) та пептидглютамил пептид-гідролазна (В) активність протеасоми кардіоміоцитів в умовах специфічного блокування гену *PSMβ7* за допомогою інтерферуючих РНК; $n = 6$, * $P < 0,05$ порівняно з контролем. *ScrRNA* – контрольна культура кардіоміоцитів, в яку було введено індиферентні РНК; *siRNA* – культура, в яку вводили інтерферуючі РНК, специфічні до мРНК-субодиниці протеасоми $\beta 7$

LMP2 внаслідок пригнічення активності протеасомного протеолізу у клітині.

Відомо, що субодиниця $\beta 7$ є необхідною для збірки 20S комплексу протеасоми з попередників – півкомплексів, що містять α -кільце, та 6 субодиниць β -кільця (окрім $\beta 7$). Важливість цієї субодиниці полягає в тому, що вона приєднується в останню чергу та С-кінцем (7 амінокислотних залишків) «заходить» між $\beta 1$ - та $\beta 2$ -субодиницями іншого кільця, стабілізуючи таким чином весь комплекс 20S протеасоми [8]. За неповноцінного функціонування $\beta 7$ -субодиниці накопичуються напівзібрані попередники протеасоми [8, 9]. За цих умов процес гідролізу молекул протеїнів протеасомою унеможлиблюється, оскільки вимагає нативного комплексу 26S протеасоми [13]. Проте короткі пептиди, за допомогою яких визначали активність протеасоми в нашій роботі, можуть бути деградованими як 20S протеасомою за АТФ-незалежним шляхом, так і незібраними її напівкомплексами [14]. З огляду на це, незмінні рівні хімотрипсино- та трипсиноподібної активності під час блокування експресії гену *PSMβ7* можуть вказувати на те, що $\beta 7$ -субодиниця не задіяна у формуванні активних сайтів $\beta 2$ - та $\beta 5$ -субодиниць. Таким чином, залишаючись в активній конформації, вказані субодиниці зберігали свою активність відносно коротких пептидів.

При цьому результати нашої роботи повністю підтверджують визначальне значен-

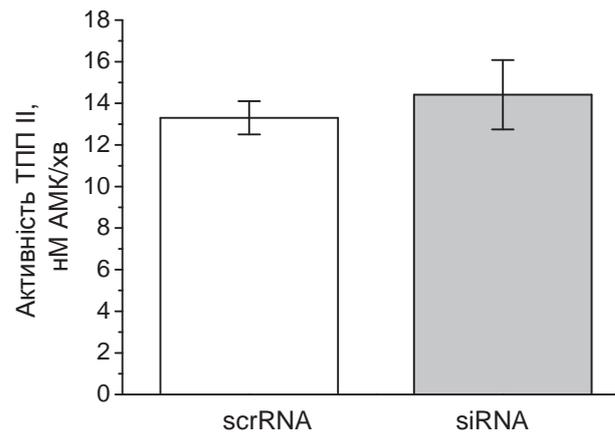


Рис. 3. Активність ТПП II в кардіоміоцитах в умовах специфічного блокування гену *PSMβ7* з використанням інтерферуючих РНК; $n = 6$. *ScrRNA* – контрольна культура кардіоміоцитів, в яку було введено індиферентні РНК; *siRNA* – культура, в яку вводили інтерферуючі РНК, специфічні до мРНК-субодиниці протеасоми $\beta 7$

ня $\beta 7$ -субодиниці у формуванні активного центру $\beta 1$ -субодиниці, бо активність останньої різко знижується при обмеженні *PSM $\beta 7$* . У роботі [9] показано, що делеція 19 залишків С-кінця $\beta 7$ -субодиниці призводить до зниження пептидилглютамил пептид-гідролазної активності на 90%. В наших дослідах значне обмеження гену *PSM $\beta 7$* свідчить не лише про необхідність присутності С-кінця, а і про важливу значимість самої $\beta 7$ субодиниці як у стабілізації активного центру $\beta 1$ -субодиниці, так і, очевидно, в регуляції експресії мРНК даної субодиниці.

Відсутність змін активності ТПП II у разі обмеження $\beta 7$ не дозволяє підтвердити гіпотезу про здатність ТПП II компенсувати нестачу протеасомної активності. Проте не виключено, що зазначений феномен реалізується лише в умовах подовження терміну пригнічення протеасоми, а в наших дослідах ензиматична активність вимірювалася через добу після введення відповідних дволанцюгових РНК. В попередніх роботах [15–17] ефективність обмеження *PSM $\beta 7$* оцінювалося також із застосуванням морфологічних методів (флуоресцентна, електронна мікроскопія, імуноцитохімія), що однозначно вказують на значні функціональні порушення в культивованих кардіоміоцитах. В першу чергу, вони стосуються активації аутофагічної дегенерації клітин та загибелі кардіоміоцитів шляхом некрозу за застосування малих інтерферуючих РНК. Отже, вірогідно, клітина не має ефективних компенсаторних механізмів, які могли би протидіяти обмеженню експресії однієї із субодиниць протеасоми.

Таким чином, одержані дані свідчать, що обмеження гену некаталітичної субодиниці $\beta 7$ протеасоми значно зменшує рівень експресії мРНК каталітичної $\beta 5$ -субодиниці, при цьому не впливаючи на її протеолітичну активність, зменшує активність $\beta 1$ -субодиниці протеасоми та рівень експресії її мРНК. Це можна пояснити тим, що за відсутності $\beta 7$ субодиниці збірка протеасоми порушується. При цьому кількість $\beta 1$ та $\beta 5$ субодиниць очевидно не змінюється, що, у свою чергу, може призводити до зменшення експресії генів зазначених вище субодиниць. Можливість блокування експресії цих субодиниць інтерферуючими РНК до *PSM $\beta 7$* виключена, бо використовувалася послідовність малих інтерферуючих РНК специфічних саме до *PSM $\beta 7$* . З огляду на це, можна зробити висновок, що *PSM $\beta 7$* є вдалою мішенню для впливу на активність протеасомного протеолізу у клітині і дає переваги для

дослідження ролі пептидилглютамил пептид-гідролазної активності протеасоми. При цьому слід визнати, що можливість заміни конститутивних субодиниць на індукційні або, навіть, тимчасові субодиниці протеасоми, що забезпечує хімотрипсиноподібну активність, обумовлює певну невизначеність стосовно ефективності пригнічення протеасомного протеолізу. У зв'язку з цим доцільно було би комбінувати обмеження $\beta 7$ субодиниці з РНК-інтерференцією індукційних або α -субодиниць.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ СУБЪЕДИНИЦЫ ПРОТЕАСОМЫ *PSM $\beta 7$* ОГРАНИЧИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ мРНК *PSM $\beta 1$* И *PSM $\beta 5$* И СНИЖАЕТ ПЕПТИДИЛГЛУТАМИЛ ПЕПТИД-ГИДРОЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАСОМЫ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ

*В. А. Кириченко, Д. А. Пашевин,
Л. В. Тумановская, В. Е. Досенко,
А. А. Мойбенко*

Институт физиологии им. А. А. Богомольца
НАН Украины, Киев;
e-mail: victoria30@mail.ru

Представлено данные об ограничении экспрессии некаталитической протеасомной субъединицы $\beta 7$ (*PSM $\beta 7$*) методом РНК-интерференции. Биохимическими и генетическими методами установлено, что ограничение гена *PSM $\beta 7$* в кардиомиоцитах приводит к снижению экспрессии субъединицы $\beta 7$ в 16 раз. Это приводит как к двукратному уменьшению экспрессии мРНК $\beta 1$ -субъединицы протеасомы, так и к снижению ее активности (пептидилглютамил пептид-гидролазной) на 72% ($0,48 \pm 0,2$ нМ АМК/хв) по сравнению с контролем ($1,7 \pm 0,5$ нМ АМК/хв, $P < 0,05$); при этом снижается экспрессия мРНК каталитической $\beta 5$ -субъединицы (в 21 раз, $P < 0,05$) без изменений ее протеолитической хімотрипсиноподобной активности, а также активности трипсиноподобной $\beta 2$ -субъединицы. Уровень мРНК индукционной субъединицы протеасомы *PSM $\beta 9$* также остается без изменений. Активность трипептидилпептидазы II не изменяется. Ограничение некаталитической субъединицы *PSM $\beta 7$* специфически влияет на активность и уровень экспрессии мРНК каталитической субъединицы $\beta 1$ и уменьшает экспрессию *PSM $\beta 5$* , не влияя на ее активность.

Ключевые слова: протеасома, субъединицы протеасомы, РНК-интерференция, кардиомиоциты.

RNA INTERFERENCE OF PROTEASOME SUBUNIT OF *PSMβ7* GENE RESTRICTS PROTEASOME SUBUNIT *PSMβ1* AND *PSMβ5* mRNA EXPRESSION AND PEPTIDYL-GLUTAMYL PEPTIDE-HYDROLYZING PROTEASOME ACTIVITY IN NEONATAL CARDIOMYOCYTES

V. O. Kyrychenko, D. O. Pashevin,
L. V. Tumanovska, V. E. Dosenko,
O. O. Moibenko

Bogomolets Institute of Physiology, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: victoria30@mail.ru

S u m m a r y

Using small interfering RNA (siRNA) transfection of neonatal cardiomyocytes to inhibit expression of nonproteolytic proteasome β7 subunit, we observed a significant decrease in β1 proteolytic subunit mRNA expression. Proteasome peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing activity decreased to 28% (0.48 ± 0.2 nM AMC/min) compared to control (1.7 ± 0.5 nM AMC/min) ($P < 0.05$). β5 Subunit mRNA expression decreased 21 times ($P < 0.05$) with no changes in its chymotrypsin-like activity. Proteasome trypsin-like activity and activity of another proteolytic enzyme tripeptidyl-peptidase II remained unchanged.

Key words: proteasome, proteasome subunits, RNA-interference, cardiomyocytes.

1. *Konstantinova I. M., Tsimokha A. S., Mittenberg A. G.* // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2008. – **267**. – P. 59–124.
2. *Powell S. R., Divald A.* // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – **85**, N 2. – P. 303–311.
3. *Glickman M. H., Raveh D.* // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**, N 15. – P. 3214–3223.

4. *Naujokat C., Fuchs D., Berges C.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – **1773**, N 9. – P.1389–1397.
5. *Reits E., Neijssen J., Herberts C. et al.* // *Immunity.* – 2004. – **20**, N 4. – P. 495–506.
6. *Dannull J., Leshner D. T., Holzknrecht R. et al.* // *Blood.* – 2007. – **110**, N 13. – P. 4341–4350.
7. *Munkácsy G., Abdul-Ghani R., Mihály Z. et al.* // *Br. J. Cancer.* – 2010. – **102**, N 2. – P. 361–368.
8. *Marques A. J., Glanemann C., Ramos P. C., Dohmen R. J.* // *J. Biol. Chem.* – 2007 – **282**, N 48. – P. 34869–34876.
9. *Ramos P. C., Marques A. J., London M. K., Dohmen R. J.* // *Ibid.* – 2004. – **279**, N 14. – P. 14323–14330.
10. *Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Murry C. E.* // *Circulation.* – 1999. – **100**. – P. 193–202.
11. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
12. *Suervo A. M., Palmer A., Rivett A. J., Knecht E.* // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – **227**, N 3. – P. 792–800.
13. *Zwickl P., Voges D., Baumeister W. et al.* // *Philosoph. Transact.: Biol. Sci.* – 1999. – **354**, N 1389. – P. 1501–1511.
14. *Glickman M. H., Raveh D.* // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**, N 15. – P. 3214–3223.
15. *Кириченко В. О., Нагібін В. С., Тумановська Л. В. та ін.* // *Biopolym. Cell.* – 2010. – **26**, № 2. – С. 153–159.
16. *Dosenko V., Nagibin V., Lisovyy O. et al.* // *Theses of VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology / Yalta, Ukraine 2009.* – *Укр. біохім. журн.* – **81**, № 4 (спец. випуск). – С. 14.
17. *Kyrychenko V., Dosenko V., Tumanovska L., Moibenko O.* // *Theses of the Joint meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies. / Copenhagen, Denmark.* – 27–30 March, 2010. – *Acta Physiologica* – **198**. – P. 192.

Отримано 29.03.2011