

Наслідки РНК-інтерференції генів убіквітину та протеасомної субодиниці 7 у культивованих кардіоміоцитах

В. О. Кириченко, В. С. Нагібін, Л. В. Тумановська, В. К. Рибальченко¹,
В. Є. Досенко, О. О. Мойбенко

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

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033

victoria30@mail.ru

Мета. Зважаючи на значну роль убіквітин-залежного протеасомного протеолізу (УПП) у регуляції кількості білків, що контролюють запрограмовану клітинну смерть (апоптоз та аутофагію), метою роботи було дослідження здатності кардіоміоцитів до виживання при специфічному приглушенні генів убіквітину (UBB) та ключової для збірки протеасоми субодиниці 7 (PSMB7). **Методи.** Застосовано методи РНК-інтерференції (для приглушення генів UBB і PSMB7), флуоресцентної мікроскопії та полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. **Результати.** Показано, що приглушення генів UBB і PSMB7 знижує їхню експресію в 2,4 ($p < 0,05$) та 1,6 рази ($p > 0,05$) відповідно, при цьому зростає кількість некротичних клітин без зміни рівня апоптичних. Кількість клітин з ознаками аутофагії значно збільшується за рахунок порушення УПП і накопичення великої кількості внутрішньоклітинних білків, які деградують внаслідок лізису. **Висновки.** Отримані дані свідчать про те, що приглушення генів UBB і PSMB7 індукує загибель кардіоміоцитів через некроз та аутофагію, не впливаючи на кількість апоптичних клітин.

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

Вступ. Убіквітин-залежний протеасомний протеоліз (УПП) відіграє величезну роль у деградації білків та включає два окремих і послідовних етапи: приєднання до білка-мішені ланцюжка молекул білка убіквітину і деградація мічених таким чином білків 26S протеасомою. При цьому зрозуміло, що адекватна робота протеасоми, а саме – специфічність і вибірковість протеолізу забезпечується системою убіквітинізації, де убіквітин займає ключове положення. Встановлено, що убіквітин є важливим

не лише для здійснення протеасомного протеолізу, йому належить значна роль у правильній компартименталізації білків, внутрішньоклітинній сигналізації, сортуванні трансмембранних білків та їхньому транспорті [1–3].

Про важливу функцію системи УПП для нормальної роботи клітин серця свідчать дані щодо порушення УПП при експериментальному відтворенні серцевої патології, зокрема, ішемії, ішемії-реперфузії та гіпертрофії серця [4–6]. При цьому введення селективних інгібіторів протеасоми в експерименті *in vivo* за умов моделювання аноксії-реок-

сигенації призводить до попередження некротичної та апоптичної загибелі кардіоміоцитів [7]. Проте хімічні інгібітори здатні проявляти неселективний вплив і на інші ферментні системи. Через це важливим є вивчення ролі УПП при різних типах клітинної загибелі за допомогою більш селективного інгібування УПП. На сьогодні одним із найспецифічніших та найефективніших методів цільової (target) генотерапії є технологія РНК-інтерференції. Дволанцюгові РНК при потрапленні в клітину активують низку молекулярних систем (Dicer, RISC та ін.), що забезпечують селективну деградацію мРНК певного гена [8, 9].

З огляду на вищезазначене ми застосували метод РНК-інтерференції для специфічного приглушення генів убіквітину (*UBB*) та протеасомної субодиниці 7 (*PSMB7*), причетної до формування активного комплексу 26S протеасоми, щоб визначити їхній вплив на життєздатність кардіоміоцитів.

Матеріали і методи. Виділення та культивування неонатальних кардіоміоцитів щура. Дослідження проведено на щурах лінії Вістар віком 2 доби. Культуру кардіоміоцитів отримували за методом [10]. Тварин знерухомлювали цервікальною дислокацією, через поздовжній 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_2HPO_4 – 0,4 і K_2HPO_4 – 0,4. Після цього їх механічно подрібнювали ножицями на шматочки розміром приблизно 1 мм³ та переносили у порцію буфера, що містить 0,34 мг/мл колагенази II типу та 0,6 мг/мл панкреатину.

Проводили 3–4 цикли інкубації по 10 хв за температури 37 °C, центрифугували (400 g, 1,5 хв), а осад ресуспендували в 1 мл середовища для культивування, до якого входить середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM) і середовище 199 у співвідношенні 4:1, ембріональна теляча сироватка – 15 %; NaHCO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль/л, стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл та пеніцилін – 100 ОД/мл.

Кількість живих і загиблих клітин підраховували в камері Горяєва при додаванні 0,2 % трипанового синього. Отримані клітини висаджували з розра-

хунку 120000 клітин на 1 см² поверхні в 16-лункові пластикові планшети для культур клітин на скло, вкрите 2 %-м розчином желатину. Кардіоміоцити культивували в поживному середовищі за $t = 37$ °C у присутності 5 % CO_2 та 95 % атмосферного повітря. Через 24 год визначали експресію генів та кількість клітин з ознаками клітинної смерті.

РНК-інтерференція in vitro. РНК для специфічного приглушення гена *UBB*, *PSMB7*, а також індіферентні РНК (scrambled siRNA), що не впливають на експресію жодного гена, синтезовано фірмою «Metabion» (Німеччина). Вони мають таку послідовність нуклеотидів:

UBB-sense-5'-GGCCAAGAUGCCAGGAUAAAUU-3';
UBB-antisense-5'-UUUAUCCUGGAUCUUGGCCUU-3';
PSMB7-sense-5'-GCUAUUGCAGCUGGCAUCUUU-3';
PSMB7-antisense-5'-AGAUGCCAGCUGCAAUAGCUU-3';
Scrambled-sense-5'-UGUUCAGCGAAAUAUAACCUU-3';
Scrambled-antisense-5'-GGUUAUAUUUCGUGAACAAU-3'.

Дволанцюгові РНК отримано безпосередньо перед введенням у клітини згідно з протоколом виробника: розчини відповідних сенсових і антисенсових олігонуклеотидів розводили вдвічі за допомогою буфера для анелінгу, що містить (ммоль/л) HEPES-KOH – 30 (рН 7,4); KCl – 100; MgCl_2 – 2; ацетату амонію – 50. В окрему пробірку вносили рівні об'єми кожного з розчинів і додавали в два рази менший об'єм буфера. Отриману суміш інкубували протягом 1 хв за $t = 90$ °C і охолоджували до кімнатної температури впродовж 45 хв у термоциклері «GeneAmp System 2700».

Специфічні до мРНК убіквітину або індіферентні дволанцюгові РНК вводили у кардіоміоцити за допомогою набору для трансфекції кардіоміоцитів «Rat Cardiomyocytes Neo Nucleofector Kit» («Lonza», Швейцарія) та приладу Nucleofector («Lonza», Швейцарія). Кардіоміоцити у поживному середовищі переносили в пробірки та осаджували центрифугуванням протягом 90 с при 400 g. До клітинного осаду додавали 100 мкл буфера, що містить 85 мкл «Rat Cardiomyocyte Nucleofector Solution» та 15 мкл розчину Supplement-1 (за рекомендаціями виробника), а також 7,5 мкл розчину контрольних (індіферентних) чи *UBB*- або *PSMB7*-специфічних дволанцюгових РНК (20 мкмоль). Вміст пробірок обережно перемішували, переносили в

кювети для трансфекції, які поміщали у нуклеофектор і проводили трансфекцію за протолом виробника. Далі вміст кювет культивували у новому середовищі за наведеною вище схемою протягом доби. Всі операції виконували за температури 37 °C.

Тестування методу електропорації з використанням вектора ртахGFP®. Для контролю процедури трансфекції в кардіоміоцити вводили 2 мкг вектора ртахGFP® (siRNA Test Kit, «Lonza»), який кодує зелений флуоресцентний білок (GFP), а в іншу групу клітин вводили вектор ртахGFP® разом з інтерферуючими РНК, специфічними до гена *gfp*. Клітини культивували за стандартних умов упродовж 24 год, після чого детектували флуоресценцію GFP у кардіоміоцитах з використанням флуоресцентного мікроскопа Nikon Eclipse E200.

Виділення РНК, зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі. РНК виділяли, застосовуючи набір Trizol RNA-prep («Isogen», Росія) з культур кардіоміоцитів, у які методом електропорації введено специфічні до мРНК убіквітину, протеасомної субодиниці 7 або індивідуальні дволанцюгові РНК. Концентрацію виділеної РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 («Thermo Scientific», USA).

Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили із використанням First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва) і 1,2–1,5 мкг загальної РНК, а також гексамерного праймера. Отриману після ЗТ комплементарну ДНК (кДНК) піддавали ген-специфічній ПЛР-ампліфікації. Для оцінки експресії мРНК убіквітину використано праймери наступної послідовності:

прямий – UBВ-F-5'-GGCAAGACCATCACCCCTG-3'

та зворотний –

UBВ-R-5'-CTGAAGAATTAATAGCCA-3';

а для оцінки експресії мРНК PSMB7:

прямий –

PSMB7-F-5'-CTGTCCTCACGGAGAAAGTCAC-3'

та зворотний –

PSMB7-R-5'-GTCACCCAGAGAGSTATCCAAC-3'.

Експресію генів стандартизували відносно експресії гена β -актину як ендогенного контролю, праймери для якого мали такі послідовності:

прямий –

β -актин-F-5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG-3'

та зворотний –

β -актин-R-5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'.

ПЛР-ампліфікацію генів здійснювали у 10 мкл SYBR Green PCR Master Mix, що містить 40 пмоль кожного праймера. Об'єм доводили до 20 мкл деіонізованою водою. Ампліфікацію виконували у термоциклері «7500 Fast Real-Time PCR System». Програма ампліфікації починалася з попередньої активації AmpliTaq Gold® ДНК-полімерази протягом 10 хв за $t = 95$ °C та включала 45 циклів, кожен з яких складався з денатурації за $t = 95$ °C (19 с), приєднання праймерів та елонгації за $t = 58$ °C (1 хв). Для контролю специфічності додавали стадію дисоціації – послідовне підвищення температури від 58 до 95 °C із реєстрацією падіння інтенсивності флуоресценції комплексів дволанцюгових ДНК з SYBR Green. Визначали відносний рівень експресії генів із застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії = 2^{-Ct} , де Ct – пороговий цикл ампліфікації).

Виявлення кількості живих, некротичних, апоптичних та аутофагічних клітин. Кількість живих, некротичних та апоптичних клітин визначали, прижиттєво забарвлюючи кардіоміоцити біс-бензимідом (Hoechst 33342) та йодистим пропідіумом [5] у концентрації 8,75 мкмоль/л, і оцінювали методом флуоресцентної мікроскопії (Nikon Eclipse E200, фільтр D/PI, довжина хвилі збудження 330–380 і 510–560 нм для Hoechst і йодистого пропідію відповідно). Для виявлення аутофагічних вакуолей у клітинах використовували специфічний барвник – монодансилкадаверин (прижиттєво забарвлення) у концентрації 100 мкмоль/л (фільтр UV-2A, довжина хвилі збудження 330–380 нм).

Статистична обробка даних. Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою програм Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США) та Origin 7.5 (OriginLab Corporation, США). Вірогідність відмінностей середніх величин ($P < 0,05$) знаходили за t -критерієм Ст'юдента.

Результати і обговорення. *Контроль методу електропорації.* Через 24 год після введення в культуру неонатальних кардіоміоцитів ртахGFP®, що кодує GFP, спостерігали інтенсивну флуоресценцію у більшості кардіоміоцитів – від 55 до 75 % (рис. 1, а), проте після введення плазміди разом зі

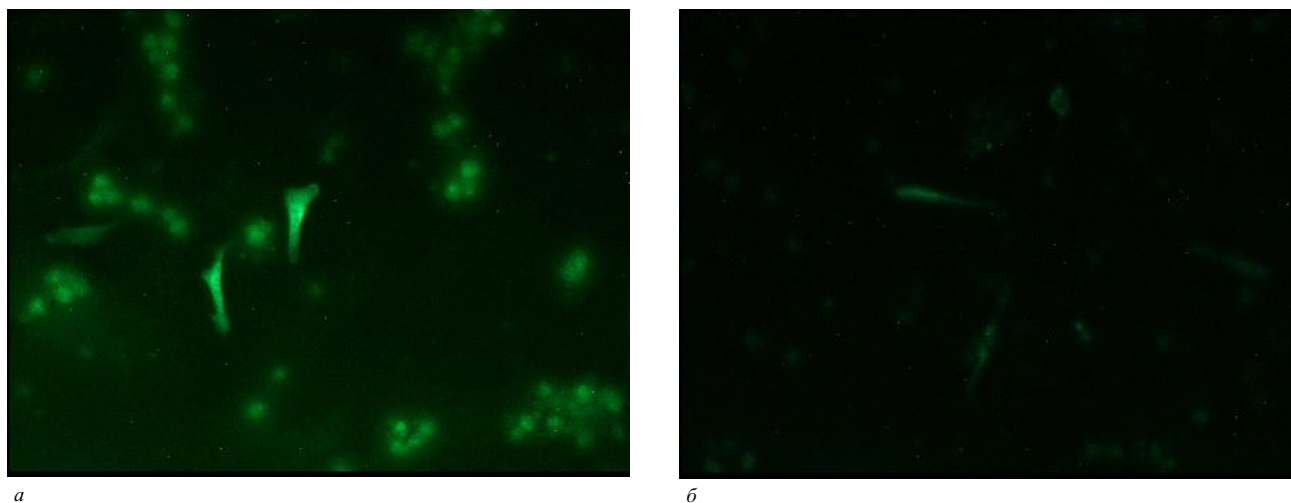


Рис. 1. Тестування методу електропорації з використанням вектора *pmaxGFP*[®], siRNA (siRNA Test Kit, «Lonza», Швейцарія): *a*, *б* – відповідно клітини, які піддавали трансфекції вектором *pmaxGFP* (2 мкг) і вектором *pmaxGFP* та інтерферуючими РНК, специфічними до даного вектора

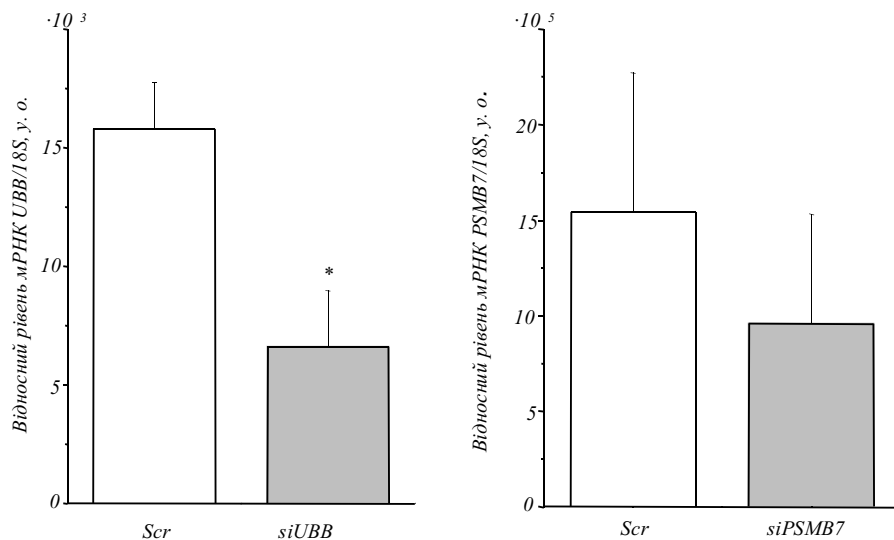


Рис. 2. Рівень експресії мРНК UBB (*a*) та PSMB7 (*б*) відносно рівня експресії гена 18S субодиниці рибосоми у культурі кардіоміоцитів за умов специфічного приглушення цих генів внаслідок дії інтерферуючих РНК; $n = 5$; * $P < 0,05$ у порівнянні з контролем; *Scr* – контрольна культура кардіоміоцитів з введеннями індиферентними РНК; *siUBB* – культура із введенними специфічними siRNA до *UBB*; *siPSMB7* – культура із додаванням інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК субодиниці протеосоми 7

специфічними до GFP інтерферуючими РНК лише в поодиноких клітинах відмічено менш інтенсивну флуоресценцію (рис. 1, *б*).

Наявність флуоресценції GFP, який відсутній за звичайних умов в еукаріотних клітинах, а також падіння інтенсивності флуоресценції при приглушенні гена зазначеного білка інтерферуючими РНК свідчить про ефективність процедури трансфекції та РНК-інтерференції.

Експресія генів UBB і PSMB7 у культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів при введенні специфічних малих інтерферуючих РНК. При дода-

ванні в культуру неонатальних кардіоміоцитів малих інтерферуючих РНК (siRNA), специфічних до мРНК UBB і PSMB7, експресія даних генів знижується в 2,4 ($P < 0,05$) (рис. 2, *a*) та 1,6 разу ($P > 0,05$) (рис. 2, *б*) відповідно, що підтверджує ефективність приглушення зазначених генів.

Співвідношення живих, некротичних, апоптичних і аутофагічних клітин у культурі кардіоміоцитів при введенні інтерферуючих РНК до UBB і PSMB7. приглушення як гена *UBB*, так і *PSMB7* у культурі неонатальних кардіоміоцитів спричиняє зміни у співвідношенні живих клітин і клітин з

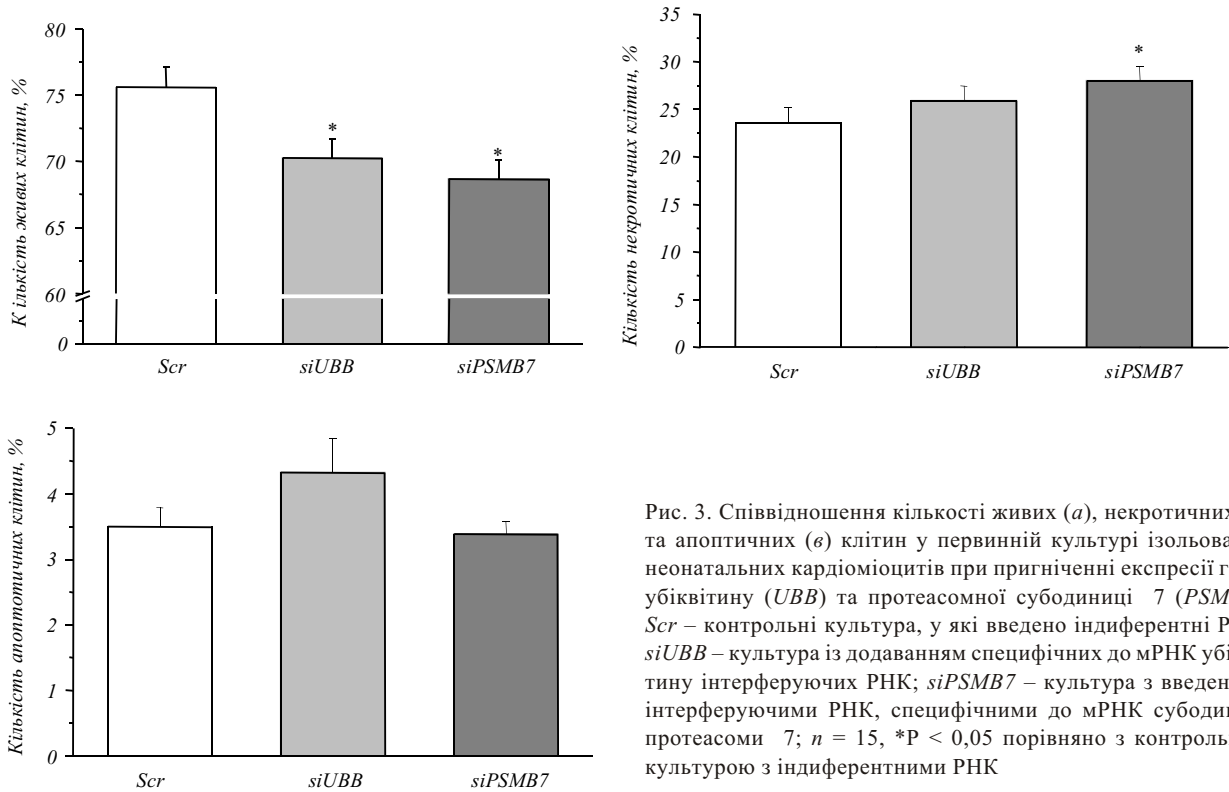


Рис. 3. Співвідношення кількості живих (а), некротичних (б) та апоптотичних (в) клітин у первинній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів при пригніченні експресії генів убіквітину (*UBB*) та протеасомної субодиниці 7 (*PSMB7*). *Scr* – контрольні культура, у які введено індіферентні РНК; *siUBB* – культура із додаванням специфічних до мРНК убіквітину інтерферуючих РНК; *siPSMB7* – культура з введеними інтерферуючими РНК, специфічними до мРНК субодиниці протеасоми 7; $n = 15$, * $P < 0,05$ порівняно з контрольною культурою з індіферентними РНК

ознаками різних видів запрограмованої і незапрограмованої клітинної смерті. Так, через добу після введення дволанцюгових РНК, специфічних до мРНК білка убіквітину, кількість живих клітин у культурі зменшується на 5,3 % ($P < 0,05$) (рис. 3, а), а при введенні інтерферуючих РНК до *PSMB7* – на 7 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольними культурами (введення *scr* siRNA), де відсоток живих клітин складає $75,6 \pm 1,54$ %.

Негативні наслідки для культури кардіоміоцитів при додаванні специфічних інтерферуючих РНК до убіквітину проявляються в зростанні на 2,3 % ($P > 0,05$) кількості клітин, що загинули внаслідок некрозу (рис. 3, б), проте більшою мірою негативним виявилось приглушення гена *PSMB7*, кількість некротичних клітин при цьому зростає на 4,4 % ($P < 0,05$) у порівнянні з контрольними культурами ($23,6 \pm 1,56$ %).

Кількість апоптотичних клітин у культурі із застосуванням гена *UBB* має тенденцію до зростання до $4,32 \pm 0,53$ % ($P > 0,05$) порівняно з контролем ($3,49 \pm 0,3$ %) (рис. 3, в), а при приглушенні гена *PSMB7* вона не змінюється ($3,38 \pm 0,21$ %, $P > 0,05$).

Тобто кількість апоптотичних клітин не зазнає суттєвих змін при інтерференції обох генів.

Популяція клітин з ознаками аутофагії в контролі становить $23,6 \pm 1,33$ % (рис. 4), однак їхня кількість достовірно зростає після додавання як інтерферуючих РНК до убіквітину ($38,2 \pm 3,81$ %, $P < 0,05$), так і інтерферуючих РНК до *PSMB7* ($36,91 \pm 4,38$ %, $P < 0,05$).

Отже, приглушення генів *UBB* і *PSMB7* порушує життєздатність кардіоміоцитів у культурі, що не дивно з огляду на поширення та значущість убіквітин-залежного протеасомного протеолізу в клітинах. Досить несподіваним для нас виявився той факт, що інтерференція гена *PSMB7* в 1,18 разу стимулює незапрограмований вид клітинної смерті, тобто некроз, при тому що на даний час немає жодних літературних даних стосовно ролі протеасоми у розвитку некрозу. Оскільки детекцію некротичних клітин здійснювали із застосуванням методу, який виявляє клітини з пошкодженими мембранами, можна припустити, що при приглушенні досліджуваних генів відбуваються процеси, що призводять до порушення цілісності ліпідного бішару.

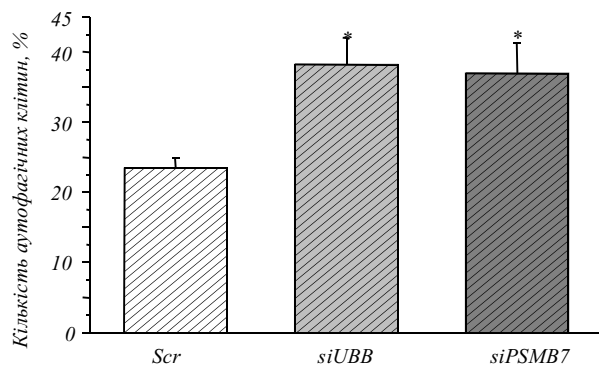


Рис. 4. Зміни кількості клітин з ознаками аутофагії у первинній культурі ізольованих неонатальних кардіоміоцитів при відтворенні аноксії-реоксигенації. *Scr* – контрольна культура із введеними індіферентними РНК; *siUBB* – культура зі специфічними до мРНК убіквітину інтерферуючими РНК; *siPSMB7* – культура з додаванням інтерферуючих РНК, специфічних до мРНК субодиниці протеасоми 7; $n = 15$, * $P < 0,05$ порівняно з контрольними культурами з індіферентними РНК

Можливо, це обумовлено стабілізацією ферментів (фосфоліпаз, сфінгомеліназ та інших ліполітичних ферментів), які здатні спричиняти лізис мембранних ліпідів. За норми такі ферменти деградуються протеасомою [11–13], однак при приглушенні гена *UBB* або протеасоми вони можуть руйнуватися більшою мірою та проявляти свою активність.

Інший механізм розвитку некрозу, скоріш за все, опосередковується порушенням цілісності мітохондріальних мембран за рахунок накопичення білків – субстратів протеасоми, які за нормальних умов причетні до регуляції проникності мітохондріальної пори. Показано, що вплив інгібіторів протеасоми кластолактацистину та бортезомібу змінює проникність мітохондріальної мембрани та мітохондріального потенціалу і сприяє вивільненню цитохрому С і активних форм кисню [14, 15], що спричиняє вторинне пошкодження плазматичної мембрани.

Цікавим видається те, що в наших дослідях не спостерігається змін кількості апоптичних клітин. На даний час функція протеасомного протеолізу у розвитку апоптозу є досить неоднозначною і активно досліджується. Так, доведено роль протеасоми як у реалізації апоптозу (за рахунок розщеплення антиапоптичних білків – інгібітори апоптозу білки IAP, Bcl-2), так і в попередженні розвитку самогубства клітини (руйнування ендегенних проапоптичних білків – Smac/ DIABLO, p53, Bax, t-Bid, p27).

Використання інгібіторів протеасом в одних випадках зупиняє апоптоз [11, 12], а в інших – індукує його розвиток, у тому числі в неонатальних кардіоміоцитах [13, 16–18]. Однак, з огляду на неспецифічність хімічних інгібіторів, використаних у зазначених роботах, не виключено, що вони впливають на апоптоз безпосередньо, а не через пригнічення активності протеасоми [19]. Специфічне ж приглушення генів *UBB* або *PSMB7* протеасоми із застосуванням РНК-інтерференції не впливає на рівень апоптозу в культурі кардіоміоцитів.

З іншого боку, нами показано, що блокування УПП на різних рівнях призводить до значної активації аутофагічних процесів – приглушення гена убіквітину та протеасомної субодиниці спричиняє значне підвищення рівня клітин з ознаками аутофагії. Оскільки для виконання своїх функцій кардіоміоцити потребують швидкого розщеплення «відпрацьованих» білків та вивільнення вільних амінокислот як структурного матеріалу для побудови нових білкових молекул, то навіть часткове обмеження функціонування чи, тим більше, пригнічення протеасомного протеолізу може виявитися для клітини фатальним. Єдиним варіантом виходу клітини з такого складного становища є активація альтернативного шляху деградації білків – внаслідок лізису. При накопиченні в клітині великої кількості нефункціонуючих білків, з одного боку, а також за відсутності вільних амінокислот, з іншого, активується аутофагічний каскад, що забезпечує лізосомне розщеплення білків та їхніх агрегатів.

Отримані дані створюють підґрунтя для продовження не лише фундаментальних досліджень ролі убіквітин-залежного протеасомного протеолізу у функціонуванні клітин серця, але й відкривають нові перспективи для з'ясування значення внутрішньоклітинного протеолізу в патогенезі захворювань серцево-судинної системи.

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

RNA interference of genes of ubiquitin and proteasome 7 subunit in cardiomyocytes culture

Summary

Aim. Ubiquitin (*UBB*) and proteasome 7 subunit (*PSMB7*) genes silencing is interesting due to the crucial role of

ubiquitin-dependent proteasomal system (UPS) in turnover of functional proteins, which controls program cell death (apoptosis, autophagy). **Methods.** We used methods of RNA interference (for UBB and PSMB7 genes silencing), fluorescence microscopy and real-time PCR. **Results.** It was shown that small interference RNA injection in cell culture decreased ubiquitin expression in 2,4 ($P < 0.05$), PSMB7 – in 1,6 times ($P > 0.05$). At the same time, there was augmented level of necrotic cells with no change in number of apoptotic cells. Cells with signs of autophagy were much augmented as consequence of UPS impairment and intracellular proteins accumulation, which degrade in lysosomes. **Conclusions.** The data obtained testify that UBB and PSMB7 genes silencing induces cell necrosis and autophagy without changing number of apoptotic cells.

Keywords: ubiquitin, proteasome, RNA-interference, cardiomyocytes.

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

Последствия РНК-интерференции генов убиквитина и протеасомной субъединицы 7 в культуре неонатальных кардиомиоцитов

Резюме

Цель. Учитывая значительную роль убиквитин-зависимого протеасомного протеолиза (УПП) в регуляции белков, контролирующей запрограммированную клеточную гибель (апоптоз, аутофагия), цель работы состояла в исследовании способности кардиомиоцитов к выживанию при специфическом заглушении генов убиквитина (UBB) и протеасомной субъединицы 7 (PSMB7), отвечающей за сборку 26S протеасомы. **Методы.** Применены методы РНК-интерференции (для заглушения генов UBB и PSMB7), флуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции в реальном времени. **Результаты.** Показано, что заглушение генов UBB и PSMB7 снижает их экспрессию в 2,4 ($P < 0,05$) и 1,6 раза ($P > 0,05$) соответственно, при этом увеличивается количество клеток, погибших вследствие некроза, без изменения уровня апоптических клеток. Содержание клеток с признаками аутофагии значительно возрастает из-за нарушения функционирования УПП и накопления большого количества внутриклеточных белков, деградирующих в результате лизиса. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что заглушение генов UBB и PSMB7 индуцирует некротическую и аутофагическую гибель кардиомиоцитов, не влияя на количество апоптических клеток.

Ключевые слова: убиквитин, протеасома, РНК-интерференция, кардиомиоциты

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Staub O., Rotin D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport // *Physiol Rev.*—2006.—**86**, N 2.—P. 669–707.
2. Ikeda F., Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals // *EMBO Reps.*—2008.—**9**, N 6.—P. 536–542.
3. Piper R. C., Luzio J. P. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes // *Curr. Opin. Cell Biol.*—2007.—**19**, N 4.—P. 459–465.
4. Bulteau A. L., Lundberg K. C., Humphries K. M., Sadek H. A., Szweda P. A., Friguet B., Szweda L. I. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 32.—P. 30057–30063.

5. 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.—**13**, N 2.—P. 119–125.
6. Mearini G., Schlossarek S., Willis M. S., Carrier L. The ubiquitin–proteasome system in cardiac dysfunction // *Biochim. Biophys. Acta.*—2008.—**1782**, N 12.—P. 749–763.
7. Luss H., Schmitz W., Neumann J. A proteasome inhibitor confers cardioprotection // *Cardiovasc. Res.*—2002.—**54**, N 1.—P. 140–151.
8. Sledz C. A., Williams B. R. RNA interference in biology and disease // *Blood.*—2005.—**106**, N 3.—P. 787–794.
9. Siomi H., Siomi M. C. On the road to reading the RNA-interference code // *Nature.*—2009.—**457**, N 7228.—P. 396–404.
10. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Murry C. E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // *Circulation.*—1999.—**100**, N 2.—P. 193–202.
11. Franzen R., Pfeilschiffer J., Huwiler A. Nitric oxide induces neutral ceramidase degradation by the ubiquitin/proteasome complex in renal mesangial cell cultures // *FEBS Lett.*—2002.—**532**, N 3.—P. 441–444.
12. Evdonin A. L., Tsupkina N. V., Nikol'skii N. N., Medvedeva N. D. Effect of EGF on ubiquitination and proteasome-dependent degradation of phospholipase C gamma1 in A431 cells // *Tsitologiya.*—2003.—**45**, N 10.—P. 1013–1018.
13. Marquis H., Goldfine H., Portnoy D. A. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes* // *J. Cell Biol.*—1997.—**137**, N 6.—P. 1381–1392.
14. Perez-Alvarez S., Solesio M. E., Manzanares J., Jordan J., Galindo M. F. Lactacystin requires reactive oxygen species and Bax redistribution to induce mitochondria-mediated cell death // *Br. J. Pharmacol.*—2009.—**158**, N 4.—P. 1121–1130.
15. Ling Y. H., Liebes L., Zou Y., Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells // *J. Biol. Chem.*—2003.—**278**, N 36.—P. 33714–33723.
16. Dallaporta B., Pablo M., Maise C., Daugas E., Loeffler M., Zamzami N., Kroemer G. Proteasome activation as a critical event of thymocyte apoptosis // *Cell. Death Differ.*—2000.—**7**, N 4.—P. 368–373.
17. Fan X. M., Wong B. C., Wang W. P., Zhou X. M., Cho C. H., Yuen S. T., Leung S. Y., Lin M. C., Kung H. F., Lam S. K. Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer // *Int. J. Cancer.*—2001.—**93**, N 4.—P. 481–488.
18. Surova O. V., Nagibin V. S., Tumanovskaya L. V., Dosenko V. E., Moibenko A. A. Effect of a low dose of proteasome inhibitor on cell death and gene expression in neonatal rat cardiomyocyte cultures exposed to anoxia-reoxygenation // *Exp Clin. Cardiol.*—2009.—**14**, N 2.—P. 57–61.
19. Wojcik C. Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? // *Cell Mol. Life Sci.*—1999.—**56**, N 11–12.—P. 908–917.

УДК 616.12:575.113.2 + 577.152.1
Надійшла до редакції 10.01.10