

Вивчення експресії гена *HSP60* на рівні мРНК у тканині серця при дилатаційній кардіоміопатії

Л. М. Капустян, О. Т. Рожко, В. І. Бобик, Д. В. Рябенко¹, Л. Л. Сидорик

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

¹ННЦ «Інститут кардіології ім. академіка М. Д. Стражеско АМН України»
Вул. Народного ополчення, 5, Київ, Україна, 03151

l.m.kapustian@imbg.org.ua

Досліджено експресію гена HSP60 на рівні мРНК у тканинах сердець пацієнтів, хворих на дилатаційну кардіоміопатію (ДКМП), на останній стадії захворювання та сердець мишей з експериментальною патологією, подібною до ДКМП людини. Виявлено, що на початку хвороби експресія гена HSP60 на рівні мРНК значно зростає, а надалі знижується і не відрізняється від норми на кінцевій стадії. Оскільки концентрація білка Hsp60 при цьому підвищена протягом усього захворювання, можна припустити, що відбуваються зміни в регуляції синтезу зазначеного білка на посттранскрипційному рівні або порушення балансу його деградації під час прогресування ДКМП.

Ключові слова: молекулярні шаперони, Hsp60, дилатаційна кардіоміопатія, мРНК.

Вступ. У відповідь на різноманітні патофізіологічні впливи у серці відбувається порушення (remodeling) процесів, які змінюють серцеву функцію і призводять до різних серцевих патологій, з-поміж яких однією з найважчих є дилатаційна кардіоміопатія (ДКМП). Серед чисельної групи генів, що змінюють у цьому разі свою експресію як на рівні мРНК, так і білка, особливої уваги заслуговують гени молекулярних шаперонів. Молекулярні шаперони – це білки, які виконують у клітині різноманітні «домогосподарські» (house-keeping) функції: від згортання білкових молекул та їхнього транспорту у різні компартменти клітини до регуляції апоптозу [1]. Крім того, згадані білки виконують захисні функції в клітині під час дії стресових факторів. При цьому їхні гени актив-

но транскрибуються, а кількість таких білків у клітині стрімко зростає.

Особливий інтерес у цьому сенсі представляє молекулярний шаперон Hsp60, основним компартментом функціонування якого є мітохондрії. Проте, за результатами останніх досліджень кардіоміоцитів, до 30 % вмісту цього білка зосереджено в цитоплазмі [2]. Низкою експериментів продемонстровано потенційну антиапоптичну роль цитоплазматичного Hsp60 кардіоміоцитів [3, 4]. В нашій попередній роботі досліджено зміни кількісного рівня молекулярного шаперону Hsp60 у тканині серця при ДКМП [5]. Виявлено значне зростання сумарного вмісту Hsp60 як у лізатах тканин сердець людей, уражених ДКМП, так і в лізатах тканин сердець мишей з експериментальним захворюванням, подібним до ДКМП людини.

Метою даного дослідження було визначення експресії гена *HSP60* на рівні мРНК у тканині сер-

ця як на останній стадії захворювання (патоморфологічний матеріал людини), так і в динаміці (мишача модель індукованого захворювання, подібного до ДКМП людини).

Матеріали і методи. Використано зразки секційного патоморфологічного матеріалу з лівих шлуночків п'яти сердець хворих, що померли від ДКМП, та п'яти нормальних сердець практично здорових людей, які загинули в результаті нещасного випадку.

Для вивчення рівня експресії *Hsp60* у динаміці захворювання застосовано створену раніше в нашій лабораторії експериментальну модель міозин-індукованого автоімунного пошкодження міокарда мишей лінії BALB/c, подібного до ДКМП людини. Дані про розроблену модель міозин-індукованого пошкодження міокарда опубліковано раніше [6, 7]. Досліджували такі групи тварин: контрольна (здорові миші лінії BALB/c) та експериментальні – через 1, 2, 4 та 6 місяців після індукції захворювання. До кожної групи входило по п'ять тварин.

Роботу з тваринами проведено згідно з правилами Комітету з питань біоетики при Президії НАН України. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом, серця заморожували в рідкому азоті.

Для визначення рівня експресії генів використовують декілька методичних підходів. Ми обрали полімеразну ланцюгову реакцію з попередньою зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) як найкращий з огляду чутливості та економічності метод. Сумарну РНК одержували за допомогою комплексу для виділення РНК «РИБО-золь-А» («AmpliSens», РФ), згідно з рекомендаціями виробника. кДНК отримували, використовуючи стандартний набір для проведення реакції зворотної транскрипції «РЕВЕРТА-L-100» («AmpliSens»).

Реакцію зворотної транскрипції також проводили згідно з рекомендаціями виробника за допомогою зворотної транскриптази M-MLV в об'ємі 20 мкл, додаючи 5 мкг сумарної РНК. Готовий препарат кДНК зберігали при температурі -70°C до використання.

Експресію *HSP60* на рівні мРНК досліджували методом ПЛР кДНК. Для ПЛР-аналізу підібрано праймери, специфічні для гена *HSP60* людини та миші:

прямий – 5'-ATTCCWGCAATGACSATTGC-3' та зворотний – 5'-GAGTTAGAACATGCCRCCTC-3', що дають продукт розміром 306 п. н. Як внутрішній контроль рівня експресії використовували експресію гена *GAPDH* (гліцеральдегідфосфат-дегідрогеназа).

Ампліфікацію кДНК *GAPDH* проводили за допомогою таких праймерів:

прямий – 5'-YGTSATGGGTGTGAACCAAYG-3' та зворотний – 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3', розмір продукту становив 297 п. н. Усі праймери синтезовані НПФ «ЛИТЕХ» (РФ). ПЛР проводили в 25 мкл буфера (20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 75 мМ трис- HCl , рН 8,8, 0,1 % твін-20, 2 мМ MgCl_2), що містив 0,2 мМ dNTPs, 0,6 мкмоль/л кожного праймера та 1 од. Таq ДНК-полімерази («Fermentas», Литва). кДНК ампліфікували за допомогою ампліфікатора фірми «Eppendorf» (Німеччина). Параметри проведення ПЛР: 94°C – 5 хв; 94°C – 45 с, 62°C – 45 с, 72°C – 45 с (30 циклів); 72°C – 5 хв.

Продукти ПЛР розділяли в 2 %-му агарозному гелі, забарвлювали бромистим етидієм, візуалізували за допомогою УФ-транслюмінатора та фотографували. Кількість ампліфікованого продукту визначали після денситометрії електрофореграм за допомогою комп'ютерної програми TotalLab 1.10 і представляли у вигляді добутку площі плями та інтенсивності її свічення. Рівень експресії гена *HSP60* на рівні мРНК розраховували як відношення кількості ампліфікованого продукту (кДНК *Hsp60*) до кількості маркерної кДНК *GAPDH* у тому ж зразку і представляли в умовних одиницях.

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакета статистичних програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Для порівняння показників досліджуваних груп використовували U-критерій Мана-Вітні (Mann-Whitney U-test). Значення $p < 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці. Результати представлено у вигляді Me [25; 75] (Me – медіана; 25 і 75 – 1-й та 3-й квартилі).

Результати і обговорення. Раніше нами досліджено зміни кількісного рівня молекулярного шаперону *Hsp60* у тканині серця при ДКМП [5]. Виявлено значне зростання кількісного вмісту *Hsp60* у тканинах сердець людей, хворих на ДКМП, на останній стадії захворювання. Також відмічено

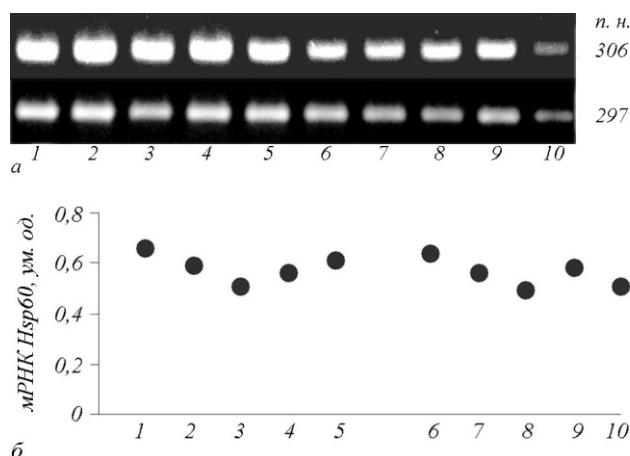


Рис. 1. Аналіз експресії гена *HSP60* на рівні мРНК у тканині серця людини (1–5 – нормальні серця; 6–10 – серця хворих на ДКМП): а – електрофореграма продуктів Hsp60-специфічної (306 п. н.) та GAPDH-специфічної (297 п. н.) реакції ЗТ-ПЛР; б – рівень Hsp60-специфічної мРНК, нормалізованої відносно GAPDH-специфічної мРНК

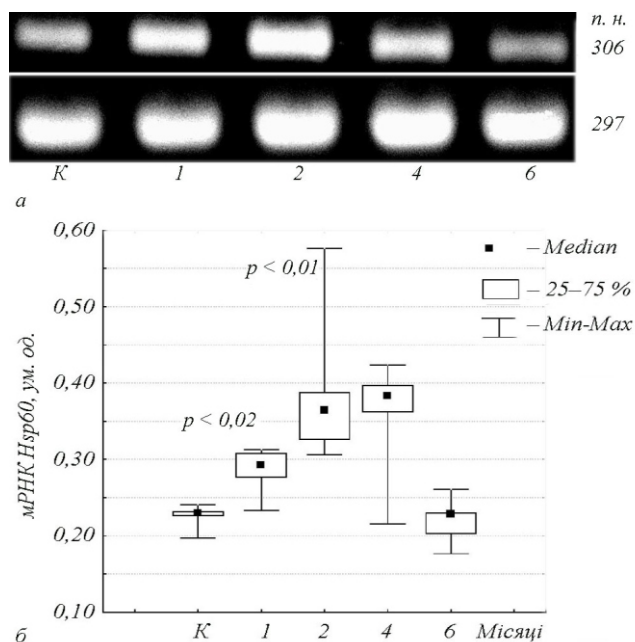


Рис. 2. Аналіз експресії гена *HSP60* на рівні мРНК у тканинах сердець мишей під час розвитку експериментального захворювання, подібного до ДКМП людини: а – електрофореграма продуктів Hsp60-специфічної (306 п. н.) та GAPDH-специфічної (297 п. н.) реакції ЗТ-ПЛР (наведено дані одного з п'яти експериментів); б – рівень Hsp60-специфічної мРНК, нормалізованої відносно GAPDH-специфічної мРНК ($n = 5$)

зростання кількості цього білка у тканинах сердець мишей з експериментальним захворюванням, подібним до ДКМП людини, починаючи з першого місяця після індукції хвороби. Оскільки кількість

білка в клітині визначається балансом між його синтезом та деградацією, наступним нашим завданням було дослідити можливі зміни в експресії гена *HSP60* на рівні мРНК у процесі розвитку зазначеної патології.

Вивчення експресії гена *HSP60* на рівні мРНК показало відсутність суттєвої різниці в експресії мРНК Hsp60 у нормальних людських серцях та серцях людей, хворих на ДКМП, на кінцевій стадії захворювання (рис. 1). Ці результати відрізняються від даних іншого дослідження [8], де показано зростання кількості мРНК Hsp60 у тканині серця при ДКМП. Такі відмінності можна пояснити різним походженням досліджуваного матеріалу. В наших експериментах використано зразки сердець людей, хворих на ДКМП, після їхньої смерті, тоді як у вищезгаданій роботі застосовано трансплантаційний матеріал, який не відповідав кінцевій стадії захворювання.

Щоб прослідкувати за експресією гена *HSP60* на рівні мРНК у процесі розвитку хвороби, ми використали розроблену в нашій лабораторії експериментальну модель аутоімунного міозин-індукованого пошкодження міокарда мишей, подібного до ДКМП людини [6, 7]. Встановлено зростання вмісту мРНК Hsp60 в 1,3 разу на перший (Me = 0,293 [0,276; 0,308]) та в 1,6 разу на другий місяць (Me = 0,364 [0,326; 0,387]) після індукції захворювання порівняно з контролем (Me = 0,229 [0,226; 0,231]) (рис. 2). На четвертий місяць не знайдено суттєвої різниці у порівнянні з контролем, а показники шостого місяця вже майже не відрізнялися від контрольних.

Дані нашого дослідження дають підставу для припущення, що під час розвитку ДКМП спочатку відбувається зростання експресії *HSP60* на рівні мРНК, далі йде її поступове зниження, а на останній стадії хвороби експресія *HSP60* на рівні мРНК вже не відрізняється від норми. Як уже зазначалося, експресія *HSP60* на рівні білка відрізняється від такої на рівні мРНК: підвищений рівень Hsp60 відмічено впродовж усього захворювання. На завершальній стадії патології спостерігається зростання кількості білка Hsp60 на фоні незміненого рівня мРНК Hsp60. Це може бути як результатом інтенсифікації синтезу Hsp60, так і наслідком зни-

ження рівня його утилізації (деградації) в кардіоміоцитах. Для з'ясування цього питання необхідні подальші дослідження.

Висновки. Отримані результати дають можливість припустити, що при дилататійній кардіоміопатії експресія гена *HSP60* на рівні мРНК у тканині серця змінюється з розвитком захворювання: зростає на ранніх етапах та знижується до нормального рівня на кінцевій стадії.

L. M. Kapustian, O. T. Rozhko, V. I. Bobyk, D. V. Ryabenko,
L. L. Sidorik

Investigation of HSP60 gene expression in mRNA level in heart at dilated cardiomyopathy

Summary

The expression of HSP60 in the mRNA level in human hearts at the end-stage of dilated cardiomyopathy (DCM) as well as in the hearts of mice with disease model similar to human DCM was investigated. We observed a significant increase in the Hsp60 mRNA level at the beginning of the disease and decrease to a normal level at the end stage. As the Hsp60 level was increased during the disease up to the end stage we can presume some changes in the regulation of Hsp60 synthesis or its degradation at DCM progression.

Keywords: molecular chaperones, Hsp60, dilated cardiomyopathy, mRNA.

Л. Н. Капустян, О. Т. Рожко, В. И. Бобык, Д. В. Рябенко,
Л. Л. Сидорик

Изучение экспрессии гена *HSP60* на уровне мРНК в ткани сердца при дилатационной кардиомиопатии

Резюме

Исследована экспрессия гена HSP60 на уровне мРНК в ткани сердца больных дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) на последней стадии заболевания и в ткани сердца мышей с экспериментальной патологией, подобной ДКМП человека. Выявлено, что в начале болезни экспрессия гена HSP60 на уровне мРНК значительно возрастает, а потом снижается и не отличается от нормы на конечной стадии. Поскольку концентрация белка Hsp60 при этом повышена на протяжении всего заболевания, можно сделать предположение об изменениях в регуляции синтеза этого белка на уровне трансляции или нарушении его деградации при прогрессировании ДКМП.

Ключевые слова: молекулярные шапероны, Hsp60, дилатационная кардиомиопатия, мРНК.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Reeve J. L. V., Duffy A. M., O'Brien T., Samali A. Don't loose heart – therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease // *J. Cell. Mol. Med.*–2005.–9, N 3.–P. 609–622.
2. Gupta S., Knowlton A. A. Hsp60, Bax, apoptosis and the heart // *J. Cell. Mol. Med.*–2005.–9, N 1.–P. 51–58.
3. Kirchhoff S. R., Gupta S., Knowlton A. A. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury // *Circulation.*–2002.–105.–P. 2899–2904.
4. Shan Y. X., Liu T. J., Su H. F., Samsamshariat A., Mestrlil R., Wang P. H. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells // *J. Mol. Cell. Cardiol.*–2003.–35.–P. 1135–1143.
5. Kapustian L. M., Rozhko O. T., Bobyk V. I., Kroupska I. V., Ryabenko D. V., Khozhaenko Yu. S., Gurtovyy V. A., Usenko V. S., Sidorik L. L. Changes in the content of molecular chaperone Hsp60 in heart tissue at dilated cardiomyopathy // *Biopolymers and Cell.*–2008.–24, N 3.–P. 238–245.
6. Bobyk V. I., Ryabenko D. V., Sergienko O. V., Trunina I. V., Fedorkova O. M., Morozova L. M., Sidorik L. L. Experimental model of autoimmune myosin-induced myocardium injury // *Biopolymers and Cell.*–2007.–23, N 2.–P. 115–122.
7. Ryabenko D. V., Sidorik L. L., Bobyk V. I., Sergienko O. V., Fedorkova O. M., Trunina I. V., Matsuka G. Kh. Morphological features of autoimmune damage of myocardium caused by various human myocardial antigens: comparative experimental examination // *Ukr. J. Rheumatol.*–2000.–N 2.–P. 55–60.
8. Latif N., Taylor P. M., Khan M. A., Yakoub M. H., Dunn M. J. The expression of heat shock protein 60 in patients with dilated cardiomyopathy // *Basic Res. Cardiol.*–1999.–94.–P. 112–119.

УДК 616.127-007.64 + 577.21
Надійшла до редакції 27.08.08