

Одержання та характеристика анти-Sgt1 моноспецифічних антитіл

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

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

l.m.kapustian@imbg.org.ua

Описано метод одержання і очищення та охарактеризовано властивості моноспецифічних поліклональних антитіл проти висококонсервативного еукаріотного білка Sgt1, який є важливим чинником регуляції клітинного циклу, бере участь у Hsp90-опосередкованій протеасомній деградації білків і разом з іншими шаперонами і кошаперонами відіграє важливу роль у регуляції про- та антиапоптичних сигнальних шляхів. Вивчення ролі і функцій Sgt1 у комплексах з білками шаперонової родини Hsp90 необхідно для розуміння механізмів регуляції сигнальних процесів, які контролюють життя та смерть клітини, що є критичним у розвитку багатьох серцево-судинних патологій, зокрема, дилатаційної кардіоміопатії.

Ключові слова: моноспецифічні антитіла, Sgt1, шаперони.

Вступ. Вивчення механізмів антистресового захисту кардіоміоцитів є вкрай важливим для розуміння не лише розвитку серцево-судинних патологій, а й для пошуку нових ефективних терапевтичних засобів, які базуються на блокуванні критичних ланок сигнальних апоптичних шляхів кардіоміоцитів. Значну роль в регуляції про- та антиапоптичних сигнальних шляхів клітин міокарда відіграє спеціалізована родина антистресових білків, до якої входять молекулярні шаперони та їхні кошаперони і білки-мішені. Одним із таких потенційних кошаперонів або білків-мішеней може бути нещодавно відкритий білок Sgt1.

Sgt1 вперше описано в дріжджах [1] як важливий чинник регуляції клітинного циклу, що супре-

сує G2 алель білка Skp1, одного з компонентів корового комплексу кінетохору CBF3 [2]. Sgt1 також взаємодіє з Skp1-Cul1-F-box (SCF) E3 убіквітинлігазним комплексом, беручи участь у Hsp90-опосередкованій протеасомній деградації білків [3]. Експресію Sgt1 виявлено в багатьох еукаріотних організмах, серед яких рослини і ссавці [4, 5]. Однак клітинний розподіл, властивості і функції Sgt1 ссавців вивчено недостатньо.

Нещодавні експерименти з дослідження експресії Sgt1 у тканинах людини показали, що він експресований в усіх проаналізованих тканинах, хоча рівень його експресії варіює і є найвищим у мозку, нирках, легенях, кишечнику та серці [6]. Аналізом послідовності Sgt1-білків, виділених з дріжджів, клітин людини, шурів, рису і арабідопсису, виявлено присутність трьох консервативних доменів (тетратрикопептидний повтор (TPR), домен

CHORD-вмісних білків і Sgt1 (CS) та Sgt1-специфічний домен (SGS)), а також двох варіабельних ділянок – VR1 и VR2 [7, 8]. TPR-домен відомий як HSP-зв'язувальний домен, SGS-домен взаємодіє з кальцій-зв'язувальними білками родини S100 [9], а CS-домен має високу гомологію послідовностей з білком p23, відомим як кошаперон, що взаємодіє з Hsp90 [10].

Вивчення ролі і функцій Sgt1 у комплексах з білками шаперонової родини Hsp90 необхідно для розуміння механізмів регуляції сигнальних процесів, які контролюють життя і смерть клітини, що є критичним у розвитку багатьох серцево-судинних патологій, зокрема, дилатативної кардіоміопатії. Для вирішення цієї проблеми необхідно одержати високоафінні, моноспецифічні антитіла, що є складним завданням через високу консервативність (і відповідно низьку імуногенність) молекули Sgt1.

Матеріали і методи. *Препарат* рекомбінантного Sgt1 людини (С-кінцевий фрагмент з молекулярною масою 20 кДа) 95 % чистоти люб'язно надано проф. Г. Філіпек (Ненський Інститут, Польща), препарат білка Hsp90, очищеного з мозку бика, – проф. Я. Кузьницьким (Міжнародний Інститут молекулярної і клітинної біології, Польща). Препарат рекомбінантного білка GroEL одержано нами раніше, як описано [24].

Всю роботу з тваринами (у тому числі імунізацію кролів або одержання лізатів з органів миші) проведено згідно з правилами Етичного комітету України. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Серце зупиняли перфузією охолодженим до $t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ розчином фосфатного буфера (PBS).

Одержання сумарного лізату та цитоплазматичного екстракту з кардіоміоцитів. Сумарний лізат кардіоміоцитів отримували за розробленою нами раніше схемою [11]. Наважку міокарда гомогенізували в буфері такого складу: 25 мМ трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl₂, 250 мМ сахароза, 0,1 % NP-40, 0,1 % дитіотреїтол, 0,1 %-й розчин суміші інгібіторів протеаз («Sigma», США). Ядра відокремлювали центрифугуванням (4000 g, 20 хв). Мітохондрії осаджували центрифугуванням надосаду (10000 g, 20 хв). Надосад містив цитоплазматичну фракцію кардіоміоцитів.

Чистоту білків контролювали за допомогою електрофорезу в денатурувальних умовах у 12 %-му ПААГ за методом Леммлі [12].

Концентрацію білка визначали за Бредфордом [13].

Отримання та очищення поліклональних антитіл до Sgt1. Кролів імунізували за розробленою нами раніше схемою [14]. Через 7 днів після останньої імунізації у тварин брали кров для отримання антисироватки. Імуноглобуліни висолювали при 50 %-му насиченні сироватки сульфатом амонію. Далі їх переосаджували 2–3 рази та зберігали до використання під сульфатом амонію з додаванням 0,3 % азиду натрію при температурі 4 °С.

Хроматографічне очищення імуноглобулінів на колонці з DEAE-Тоуорpearl. Для роботи використано носій DEAE-Тоуорpearl-650М фірми «ТоуоSoda» (Японія). Колонку готували за стандартною методикою. Носій урівноважували Na-фосфатним буфером (PBS), рН 7,2.

Осад імуноглобулінів, отриманий, як описано вище, збирали центрифугуванням (10000 g, 10–15 хв, 4 °С) та розчиняли в мінімальному об'ємі охолодженої дистильованої води. Діалізували проти охолодженої дистильованої води протягом 20 хв та проти PBS (рН 7,2) з додаванням 0,1 мМ ФМСФ протягом ночі при температурі 4 °С. Після цього на колонку об'ємом 2,5 мл наносили 40–50 мг сумарного білка. Колонку промивали 2–3 об'ємами буфера PBS (рН 7,2). Збирали білкові фракції, які не зв'язалися з носієм колонки.

Очищення IgG на Protein G-сефарозі. Використано носій Protein G-сефарозу («Pharmacia», Швеція). Носій у колонці урівноважували буфером PBS, рН 7,2. Об'єм колонки складав 2,5 мл, ємність – 1,5 мг білка на 1 мл сорбенту. Наносили імуноглобуліни, попередньо очищені на DEAE-Тоуорpearl, та залишали для інкубації на 2–3 год за кімнатної температури. Колонку промивали буфером PBS для видалення білка, що не зв'язався з носієм. Далі IgG елюювали 0,2 М гліцином (рН 2,5) з нейтралізацією елюата 1 М розчином трис-НСl, рН 11,0: об'єм фракції елюції становив 500 мкл.

Чистоту отриманих IgG перевіряли методом електрофорезу в ПААГ за денатурувальних умов. Об'єднували фракції білкового піка та діалізували

протягом 12–18 год проти буфера PBS з 0,1 мМ ФМСФ при температурі 4 °С.

Синтез афінної колонки з антигеном. CNBr-активовану сефарозу («Pharmacia») заливали для набрякання 0,1 М карбонатним буфером (рН 8,0). Білок для кон'югації діалізували проти цього ж буфера. Білок іммобілізували на носій протягом 14–16 год на качалці за температури 4 °С (5 мг білка на 1 мл сорбенту). Після інкубації сорбент ретельно відмивали на фільтрі розчином 2 М NaCl, потім – PBS. Для блокування вільних сайтів сорбції до відмитого сорбенту додавали розчин 1 М гліцину (рН 8,0). Інкубували на качалці протягом 2 год за температури 4 °С. Гліциновий буфер замінювали двічі. Після цього сорбент ретельно відмивали 2 М NaCl та переносили в колонку. Колонку промивали PBS, рН 7,2, з 10 % ембріональної сироватки теляти. Останній етап – промивання колонки 10 об'ємами PBS (рН 7,2).

Афінне очищення специфічних антитіл. IgG, очищені на Protein G-сефарозі, діалізували протягом ночі (4 °С) проти PBS, рН 7,2. На афінну колонку об'ємом 2 мл наносили 10–12 мг IgG та інкубували в колонці протягом 3–4 год при кімнатній температурі. Після цього колонку відмивали від білка, що не зв'язався, 0,5 М NaCl у PBS, рН 7,2, потім буфером PBS і зв'язаний білок елюювали розчином 0,2 М гліцину (рН 2,5) з нейтралізацією елюата розчином 1 М трис-НСl, рН 11,0: об'єм фракцій елюції складав 500 мкл. Фракції білкового піка об'єднували та отримані IgG діалізували протягом 12–18 год проти PBS, рН 7,2, з 0,1 мМ ФМСФ при температурі 4 °С. IgG концентрували до 1 мг/мл.

Чистоту отриманих моносспецифічних антитіл перевіряли методом електрофорезу в ПААГ за денатурувальних умов, а специфічність – за допомогою методів імуоферментного аналізу (ELISA) та імуоблотингу (Western blot analysis).

Твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA). Титр антисироватки проти білка Sgt1 і анти-Sgt1 антитіл після всіх етапів очищення визначали за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) з модифікаціями [15]. Антигени іммобілізували протягом ночі при температурі 4 °С в 0,1 М карбонатному буфері, рН 9,0 на планшети для імуоферментного аналізу. Концентрація анти-

генів становила 10 мкг/мл. Далі планшети ретельно відмивали PBS, рН 7,2, що містив 0,1 % твін-20 (PBS-T), та вільні сайти адсорбції блокували буфером PBS-T з 0,5 %-ю желатиною (PBS-T-Gel). Антисироватку або специфічні антитіла у відповідному розведенні в буфері PBS-T-Gel інкубували протягом 2 год при температурі 37 °С. Після ретельного відмивання буфером PBS-T планшети інкубували упродовж 1 год з вторинними антитілами проти IgG кролика, міченими пероксидазою хрому. Після п'ятиразового відмивання тим же розчином продукт реакції візуалізували додаванням субстрату (0,05 мг/мл АВТS з 0,05 % H₂O₂) в 50 мМ цитрат-фосфатному буфері (рН 4,5–5,2) протягом 45 хв при температурі 37 °С і результат реакції кількісно обраховували на ридері фірми «BioLab» (Велика Британія). Достовірним вважали результат, де рівень специфічних антитіл в антисироватці перевищував аналогічні титри антитіл у сироватці неімунізованого кроля на величину 1s (стандартне відхилення).

Імуоблотинг (Western-blot аналіз). Специфічність отриманих анти-Sgt1 антитіл і їхню можливу крос-реактивність у лізатах клітин і органів ссавців визначали за допомогою імуоблотингу (Western-blot) за відомим методом [16] з незначними модифікаціями.

Після електрофоретичного розділення зразків електроперенос поліпептидів на нітроцелюлозну мембрану проводили протягом 2 год, у 20 мМ трис-100 мМ гліциновому буфері з 20 % метанолу при силі струму 200 мА та напрузі 20 В. Пасивний перенос білків на нітроцелюлозну мембрану здійснювали в буфері PBS протягом ночі. Сайти неспецифічної сорбції блокували 5 %-м розчином сухого знежиреного молока в буфері PBS-T. Усі подальші процедури, включаючи інкубацію зі специфічною анти-сироваткою або очищеними антитілами, виконували в буфері PBS-T–молоко за кімнатної температури. Вторинними антитілами слугували антитіла проти IgG кроля, кон'юговані з пероксидазою хрому фірми «Sigma». Результати візуалізували за допомогою реакції хемілюмінесценції з використанням набору ECL «Amersham», Велика Британія) та експонували на рентгенівську плівку фірми Кодак.

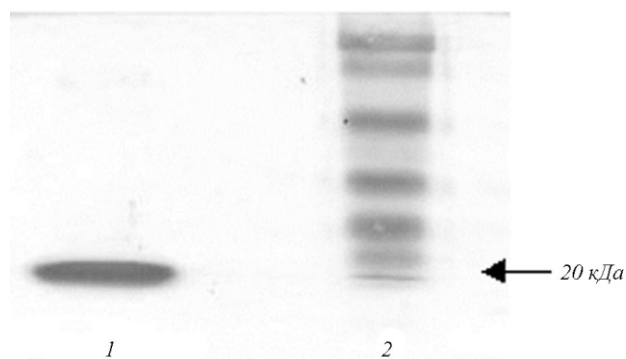


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз чистоти рекомбінантного Sgt1 людини (С-фрагмент), використаного як антиген для імунізації кролів: 1 – рекомбінантний Sgt1 людини (С-фрагмент); 2 – суміш стандартних білкових маркерів («Sigma»)

Результати і обговорення. Вивчення особливостей регуляції про- і антиапоптичних сигнальних каскадів у клітинах вищих еукаріотів виявило участь молекулярних шаперонів висококонсервативної родини Hsp90 у механізмах як активації, так і супресії цих каскадів [17, 18]. Нещодавно також встановлено, що Hsp90 причетний до контролю якості білків через процеси полі-убіквітинування та протеасомної деградації субстратів [19]. Визначення структури молекули Hsp90 показало присутність С-кінцевого домену димеризації і N-кінцевого АТР-азного домену, обидва з яких взаємодіють як з різними субстратами, так і з цілою низкою так званих кошаперонів [20]. Аналізом послідовності нещодавно відкритого білка SGT1 [6], залученого до механізмів вродженого імунітету проти мікробних патогенів як рослин, так і тварин, показано наявність трьох консервативних доменів, визначено подібність центрального CS-домену до Hsp90-зв'язувального кошаперону p23 [7, 8] і відповідно здатність до взаємодії з шапероном Hsp90 [10]. С-кінцевий домен молекули Sgt1 (SGS) взаємодіє з Ca^{2+} -зв'язувальними білками родини S100 [21], серед яких анексини, псоріазин, кальциклін, парвальбумін, кальмодулін та тропоніни. Тому можна припустити важливу роль білка Sgt1 не лише в механізмах регуляції сигнальних шляхів, а й у скоротливому циклі м'язових клітин, зокрема кардіоміоцитів [22].

Дослідження вищезазначених проблем гальмується відсутністю доступних і високоафінних

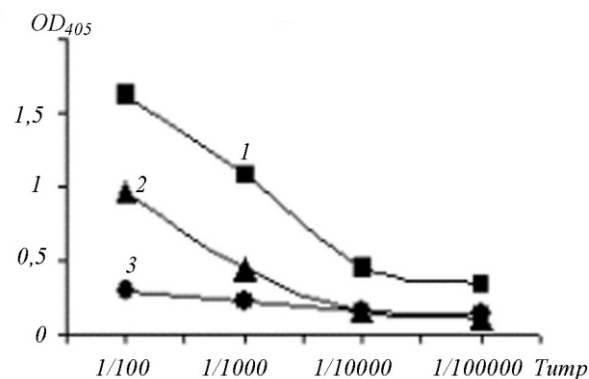


Рис. 2. Імунореактивність специфічної анти-Sgt1 антисироватки (2) та моноспецифічних анти-Sgt1 антитіл (1), визначена імуноферментним аналізом (ELISA); 3 – антисироватка інтактного (неімунізованого) кроля

препаратів специфічних анти-Sgt1 антитіл, одержати які є складним завданням через високу еволюційну консервативність і відповідно низьку імуногенність молекули Sgt1. У зв'язку з цим першим етапом одержання згаданих антитіл був підбір умов імунізації тварин (кролів) препаратом Sgt1 високої чистоти. Як антиген використовували С-кінцевий фрагмент (м. м. близько 20 кДа) рекомбінантного білка Sgt1 людини 95 %-ї чистоти (рис. 1). Нам вдалося одержати високий (більше 10^4) титр анти-Sgt1 антисироватки тільки після п'ятої імунізації, але завдяки розробленій нами раніше схемі імунізації тварин нативними білковими антигенами було витрачено лише 300 мкг білка.

Після всіх етапів очищення одержаних антитіл визначали їхню афінність, специфічність та можливість імуно крос-реактивність з іншими антигенами родини молекулярних шаперонів, що є логічним з огляду на однакову структурну організацію шаперонів, які належать до різних родин. На рис. 2 представлено результати визначення за допомогою імунохімічного аналізу (ELISA) титру специфічних анти-Sgt1 сироваток та анти-Sgt1 антитіл після послідовного очищення на різних сорбентах. Видно, що з кожним етапом очищення підвищується афінність одержаних антитіл, про що свідчить порівняльне імунотитрування специфічної імуноної анти-Sgt1 антисироватки та сироватки інтактного (тобто неімунізованого) кроля.

При одержанні антитіл проти рекомбінантних антигенів дослідники часто стикаються з тим, що

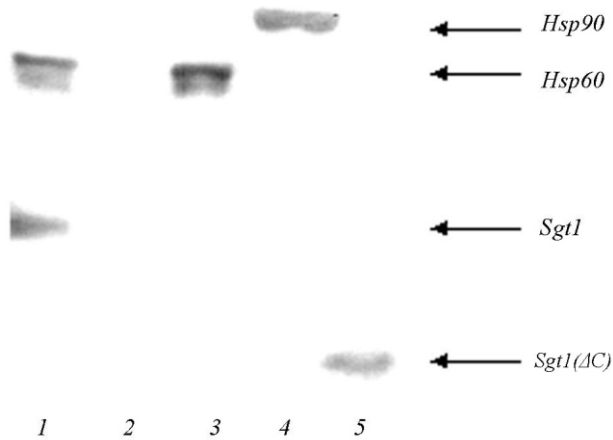


Рис. 3. Імунологічна крос-реактивність моноспецифічних анти-Sgt1 антитіл, визначена методом імуноблотингу (Western-blot аналіз): 1 – екстракт цитоплазматичної фракції міокарда миші; 2 – бичачий сироватковий альбумін; 3 – рекомбінантний GroEL (прокаріотний гомолог еукаріотного Hsp60); 4 – Hsp90, очищений з мозку бика; 5 – рекомбінантний Sgt1 (C фрагмент)

отриманий *de novo* препарат антитіл розпізнає тільки рекомбінантний поліпептид, але не взаємодіє з нативними білками (в лізатах клітин і тканин тварин), навіть якщо показано експресію гена досліджуваного білка. На сьогодні немає чіткого розуміння природи цього феномену, але, скоріш за все, це може бути пов'язано з розбіжностями у фолдингу рекомбінантних і нативних білків. Тому важливим етапом характеристики нових антитіл є визначення їхньої специфічності методом імуноблотингу (Western-blot аналіз). Аналіз специфічності та можливої імунної крос-реактивності анти-Sgt1 антитіл за допомогою методу імуноблотингу виявив, що одержані антитіла не лише специфічно взаємодіють з рекомбінантним антигеном, яким імунізували тварин, але й розпізнають поліпептид з м. м. 40 кДа, що відповідає нативному Sgt1, у лізаті кардіоміоцитів миші (рис. 3). Крім того, одержані нами моноспецифічні анти-Sgt1 антитіла розпізнавали препарат нативного Hsp90 (очищеного з мозку бика), виділений нами раніше рекомбінантний GroEL (прокаріотний аналог еукаріотного шаперону Hsp60) [23], а також нативний білок Hsp60 у лізаті кардіоміоцитів миші. Ми припустили, що Sgt1 має спільний домен(и) з шапероном Hsp60, про що свідчить крос-реактивність анти-Sgt1 ан-

титіл у реакції імуноблотингу. Якщо це так, то подальші дослідження з використанням одержаних нами антитіл логічно сконцентрувати на пошуку спільних доменів з наступним аналізом послідовностей останніх і на визначенні того, чи є Sgt1 кошапероном, білком-мішенню, або ж білком – партнером для Hsp60. Останнє вкрай важливе для розуміння участі Sgt1, як і інших CHORD-вмісних білків, у функціонуванні кардіоміоцитів та в механізмах їхнього анти-стресового захисту, порушення якого призводить до розвитку різних серцевих патологій або ж до апоптичної загибелі кардіоміоцитів.

Висновки. Вперше одержано моноспецифічні поліклональні анти-Sgt1 антитіла високого ступеня чистоти та афінності. Одержані анти-Sgt1 антитіла працюють як у реакції ELISA, імуноблотингу (Western-blot аналіз), так і в імунопреципітації (імуноафінне очищення антитіл).

Вперше показано крос-реактивність анти-Sgt1 антитіл з шаперонами Hsp90 та Hsp60.

L. N. Kapustian, O. T. Rozhko, V. I. Bobyk, I. V. Kroupskaya, L. L. Sidorik

Development and characterization of monospecific anti-Sgt1 antibodies

Summary

The method of development and purification of monospecific polyclonal antibodies against Sgt1 was described and their characteristics were presented. Protein Sgt1 plays an important role in the regulation of cell cycle, Hsp90-related proteasome degradation of proteins and pro/anti-apoptotic signaling along with other molecular chaperons and co-chaperons. The further investigation of Sgt1 role and its functioning with other members of Hsp90-chaperons family is important for elucidation of the cell signaling regulation, which is significant for cardio-vascular pathologies progression, particularly, for dilated cardiomyopathy.

Keywords: monospecific antibodies, Sgt1, chaperons.

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

Получение и характеристика анти-sgt1 моноспецифических антител

Резюме

Описан метод получения и очистки, а также охарактеризованы свойства моноспецифических поликлональных антител против высококонсервативного эукаріотного белка Sgt1, играющего важную роль в регуляции клеточного цикла, в Hsp90-опосредованной протеасомной деградации белков и

вместе с другими молекулярными шаперонами и ко-шаперонами являющегося важным регулятором про- и антиапоптотических сигнальных путей. Изучение роли и функций Sgt1 в комплексах с белками шаперонового семейства Hsp90 необходимо для понимания механизмов регуляции сигнальных процессов, контролирующей жизнь и смерть клетки, что критично для развития сердечно-сосудистых патологий, в частности, дилатационной кардиомиопатии.

Ключевые слова: моноспецифические антитела, Sgt1, шапероны.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kitagawa K., Skowrya D., Elledge S. J., Harper J. W., Hieter P. SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex // *Mol. Cell.*–1999.–**4**.–P. 21–33.
2. Rodrigo-Brenni M. C., Thomas S., Bouck D. C., Kaplan K. B. Sgt1p and Skp1p modulate the assembly and turnover of CB3F complexes required for proper kinetochore function // *Mol. Cell. Biol.*–2003.–**15**.–P. 3366–3378.
3. Yamamoto T., Mori Y., Ishibashi T., Uchiyama Y., Sakaguchi N., Furukawa T., Hashimoto J., Sakaguchi K. Characterization of RAD6 from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with Sgt1, a subunit of the SCF ubiquitin ligase complex // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*–2004.–**314**.–P. 434–439.
4. Gray W. M., Muskett P. R., Chuang H. W., Parker J. E. Arabidopsis SGT1b is required for SCF(TIFR1)-mediated auxin response // *Plant Cell.*–2003.–**15**.–P. 1310–1319.
5. Spiechowicz M., Filipek A. The expression and function of Sgt1 protein in eukaryotic cells // *Acta Neurobiol. Exp.*–2005.–**65**.–P. 161–165.
6. Zou X., Ji C., Wang L., Wu M., Zheng H., Xu J., Jin F., Gu S., Ying K., Xie Y., Mao Y. Molecular cloning and characterization of SGT1.2, a novel splice variant of *Homo sapiens* SGT1 // *DNA Sequencing*.–2004.–**15**.–P. 140–143.
7. Filipek A., Kuznicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin // *J. Neurochem.*–1998.–**70**.–P. 1793–1798.
8. Matsuzawa S., Reed J. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 response // *Mol. Cell.*–2001.–**7**.–P. 915–926.
9. Никандров В. Н., Чаплинская Е. В. Протеин S-100: структурно-функциональные свойства и роль в нервной ткани // *Біополімери і клітина*.–2005.–**21**, № 1.–С. 12–22.
10. Lee Y.-T., Jacob J., Michowski W., Nowotny M., Kuznicki J., Chazin W. J. Human Sgt1 binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 domain and not tetratricopeptide repeat domain // *J. Biol. Chem.*–2004.–**279**.–P. 16511–16517.
11. Sidorik L., Rybkinska T., Bakhiya N., Rodnin N., Filonenko V., Entelis N., Martin R., Tarassov I., Matsuka G. Kh. The immunochemical cross-reactivity between cytoplasmic and mitochondrial mammalian lysyl-tRNA synthetases // *Біополімери і клітка*.–2000.–**16**.–P. 363–368.
12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 // *Nature*.–1970.–**227**.–P. 680–685.
13. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*–1976.–**46**.–P. 193–200.
14. Sidorik L. L., Gudzera O. L., Dragovoz V. A., Tukalo M. A., Beresten S. F. Immunochemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // *FEBS Lett.*–1991.–**292**.–P. 76–78.
15. Matsiota P., Dosquet P., Guilbert B., Avrameas S. Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.*–1987.–**69**.–P. 79–88.
16. Ternynck T., Bleux C., Gregoige J., Avrameas S., Kanellopoulos-Langevin C. Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies // *J. Immunol.*–1990.–**144**.–P. 1504–1511.
17. Dispens G. D., Borgers M. Apoptosis in the heart: About programmed cell death and survival // *News Physiol.*–2001.–**16**.–P. 41–46.
18. Gobbesman S., Wockner S., Maurizi M. Protein quality control: triage by chaperones and proteases // *Genes and Develop.*–1997.–**11**.–P. 815–823.
19. Welchman R. L., Gordon C., Mayer R. J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals // *Nat. Rev.*–2005.–**6**.–P. 599–609.
20. Jakob U. HSP90 – news from the front // *Frontiers Biosci.*–1996.–**1**.–P. d309–317.
21. Nowotny M., Spiechowicz M., Jastrzebska B., Filipek A., Kitagawa K., Kuznicki J. Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (Calcylin) and other S100 proteins // *J. Biol. Chem.*–2003.–**78**.–P. 26923–26928.
22. Snoeckx L. H. E. H., Cornelussen R. N., VanNieuwenhoven F. A., Reneman F. A., Reneman R. S., VanDerVusse G. J. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology // *Physiol. Rev.*–2001.–**81**.–P. 1461–1497.
23. Капустян Л. Н., Киямова Р. Г., Гришкова В. С., Терентьев А. Г., Филоненко В. В., Сидорик Л. Л. Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // *Біополімери і клітина*.–2006.–**22**, № 2.–С. 117–120.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 31.08.07