УДК 616.12:577.152.34

В.Є. Досенко, Д.В. Михальчук, В.Ю. Загорій, М.В. Хайтович, О.О. Мойбенко

Функціональне значення алельного поліморфізму генів, що кодують каталітичні субодиниці імунопротеасоми

Представлены результаты определения активности протеасомы в изолированных моноцитах людей с различными аллельными вариантами генов, кодирующих большие мультифункциональные протеазы LMP2 (Arg_{60}→His полиморфизм) и LMP7 (Lys_{145}→Gln полиморфизм). Установлено, что трипсиноподобная активность протеасомы при генотипе Arg/Arg в 1,6 раза (P=0,19) выше, чем при генотипе His/His, и в 2,0 раза (P=0,03) меньше по сравнению с гетерозиготами (Arg/His). Наибольшая химотрипсиноподобная активность протеасомы наблюдалась у гетерозигот (на 29,7 % выше, чем при генотипе Arg/Arg, P=0,43), а наименьшая – у гомозигот His/His (на 29,7 % меньше по сравнению с генотипом Arg/Arg, P=0,40). При определении уровня экспрессии РНК LMP2 и LMP7 в изолированных моноцитах с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции установлено, что существенных отличий в активности экспресии генов указанных субъединиц иммунопротеасомы у лиц с различным генотипом не наблюдается. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии аллельного полиморфизма гена LMP2 на пептидазную активность иммунопротеасомы.

ВСТУП

Презентація антигенів у складі білків головного комплексу гістосумісності першого класу забезпечується так званою імунопротеасомою, що утворюється при γ-інтерфероніндукованій заміні трьох конститутійних каталітичних субодиниць (β_1, β_5 та β_2) у внутрішньому кільці протеасоми на три індуцибельні субодиниці – великі мультифункціональні протеїнази (LMP2, LMP7 і LMP10 відповідно) [1, 2, 5–8]. У результаті цієї субституції змінюється гідролітична активність протеасоми: зростає трипсиноподібна (забезпечується β_2 або LMP10) і хімотрипсиноподібна (забезпечується β_5 або LMP7) та зменшується пептидилглютамілпептидгідролазна (забезпечується β_1 або LMP2) [5, 7]. За рахунок цього підвищується ефективність продукції імуногенних пептидів [8]. У генах, що кодують LMP2 та LMP7, описано поліморфізм поодиноких нуклеотидів (SNP) – Arg_{60}→His і Lys_{145}→Gln відповідно [9, 16, 22]. Тривають пошуки асоціації між генетичними варіантами цих генів і ймовірністю розвитку певних захворювань [3, 4, 13, 15, 21]. Зокрема встановлено, що менш розповсюджений алельний варіант гена LMP2 значно частіше зустрічається у пацієнтів з деякими аутоімунними захворюваннями [3, 15]. Проте досі невідомо, чи впливають заміни поодиноких нуклеотидів у LMP на функціональну активність імунопротеасоми або експресію відповідних генів. Було показано зв'язок між Arg_{60}→His поліморфізмом LMP2 і чутливістю моноцитів до TNFa-індукованого апоптозу [17]. Надалі ці автори встановили факт експресії субодиниць імунопротеасоми в клітинах мозку та показали, що активність протеасоми в тканинах мозку вища при генотипі Arg/Arg

© В.Є. Досенко, Д.В. Михальчук, В.Ю. Загорій, М.В. Хайтович, О.О. Мойбенко

порівняно з Arg//His [18]. Визначити активність протеасоми у осіб з генотипом His/His дослідникам не вдалося через низьку частоту алелю His в італійській популяції. Крім того, слід зауважити, що вимірювати активність імунопротеасоми в тканинах, в яких основний внесок у протеасомальну активність робить конституційна форма цього протеїназного комплексу, не досить коректно. Є клітини (моноцити, лімфоцити, спленоцити тощо), які за нормальних умов експресують переважно імунопротеасому [14, 19]. Тому адекватні дані про вплив поліморфізму субодиниць імунопротеасоми на її активність можна отримати, визначаючи пептидазну активність цього макромолекулярного комплексу саме в таких клітинах.

Мета нашої роботи – дослідити активність експресії генів, що кодують каталітичні субодиниці імунопротеасоми, та активність протеасоми в ізольованих моноцитах осіб, яких було генотиповано за LMP2 і LMP7.

МЕТОДИКА

Матеріалом дослідження була венозна кров 30 підлітків, хворих на артеріальну гіпертензію, що проходили лікування в клініці кафедри педіатрії №4 Національного медичного університету ім. О.О.Богомольця. Венозну кров забирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з калієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (11,7 ммоль/л) як антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина). Стабілізовану кров розводили 0,9%-м розчином хлористого натрію в співвідношенні 1:1, після чого нашаровували на заздалегідь підготовлений градієнтний розчин перколу, який складався з 4 шарів з відносною густиною 72, 63, 54, 45 %. Вказані концентрації перколу одержували при змішуванні 9 частин перколу і 1 частини 10-кратного розчину Хенкса (pH 7,4), після чого необхідна густина досягалася розведенням відповідним об'ємом 0,9%-го розчину хлористого натрію. Центрифугування крові проводили в два етапи: 1) при 400 g протягом 5 хв, після чого відбирали перший надосадовий шар, що містить плазму та тромбоцити, а відібраний об'єм заповнювали фізіологічним розчином; 2) при 800 g протягом 15 хв з подальшим відбором клітин між певними шарами: 45 і 54 % (моноцити), 54 і 63 % (лімфоцити), 63 і 72 % (нейтрофільні гранулоцити). Відмивання клітин від перколу проводили центрифугуванням протягом 5 хв при 800 g (моноцити та лімфоцити) і 850 g (нейтрофільні гранулоцити) з подальшим відбором осаду і його ресуспендуванням у розчині Хенкса. Підрахунок кількості моноцитів проводили в камері Горяєва.

Хімотрипсино- та трипсиноподібну активність протеасоми в моноцитах крові визначали за інтенсивністю гідролізу специфічних флюорогенних субстратів – сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (LLVT-AMC) і бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину (LSTA-AMC) відповідно (спектрофлюориметр Hitachi-4000). Довжина хвилі збудження/емісії становила 360/440. При визначенні активності протеасоми в моноцитах після преінкубації із субстратом протягом 1 хв (37°C) до проби (300 мкл) додавали 3 мкл сапоніну (10 мг/мл) для пермеабілізації клітинних мембран. Гідроліз субстрату спостерігався після додавання сапоніну. Реакційний буфер (0,025 моль/л тріс-HCl, pH 7,5) для визначення протеолітичної активності протеасоми містив у кінцевій концентрації 6 мкмоль/л LLVT-AMC або LSTA-AMC. Для підтвердження специфічності протеасомального гідролізу використовували селективний інгібітор протеасоми – кластo-лактацистин β-лактон у концентрації 5 мкмоль/л. Відсоток пригнічення активності гідролізу відповідних субстратів під дією зазначених інгібіторів трактували як активність про-

теасоми та виражали в наномолях 7-аміно-4-метилкумарину на 10^6 клітин за 1 хв.

Виділення РНК з моноцитів проводили із використанням набору Trizol RNA-prep ("Isogen", Росія). Зворотну транскрипцію здійснювали з використанням RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit ("Fermentas", Литва), застосовуючи 500 нг загальної РНК та олігомерний $(dT)_{18}$ праймер. Отриману ДНК використовували для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із застосуванням наступних пар праймерів: 5'-CTTGAACCAGGGAGGCGAAGTTTG-3' і – 5'-CAGCTGAACCAGAGAGTG CATAGT-3' (для оцінки експресії LMP2) та 5'-CGGACAGATCTCTGGGTGCT-3' і 5'-CTTCCCTACTGCCCCAAGCT-3' (для оцінки експресії LMP7). Ампліфікаційна суміш містила 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 2,5 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 пмоль/л кожного з праймерів та 0,5 ОД Taq-полімерази ("Амплисенс", Росія), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагментів генів складалася з 38 циклів: денатурація – 94°С, 1 хв, приєднання праймерів – 63°С, 1 хв і елонгація – 74°С, 1 хв. Для контролю за якістю виділення РНК і порівняння інтенсивності експресії генів імунопротеасоми паралельно ампліфікували фрагмент гена β-актину – одного із house-keeping генів за методом [20].

Для генотипування ДНК виділяли з крові, стабілізованої як указано вище, з використанням наборів «Isogen» (Росія). Методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів визначали Arg_{60}→His-поліморфізм гена LMP2 за методом Vinasco з нашими модифікаціями [23]. Для цього ампліфікували ділянку зазначеного гена за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-CTTGAACCAGGGAGGCGAAGTTTG-3' і зворотного (antisense) – 5'-CAGCTGAACCAGAGAGTGCATAGT-3'. Для цього брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 3 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази («Амплисенс», Росія), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері "GeneAmp System 2700" («Applied Biosystems», США). Ампліфікація фрагмента гена LMP2 складалася з 35 циклів: денатурація – 94°С (1 хв), гібридизація праймерів – 63°С (30 с) і елонгація – 74°С (1 хв). Надалі 6 мкл продукту ПЛР інкубували при 37°С протягом 18 год з 2 ОД рестриктази Hin6I («Fermentas», Литва) у буфері Y^+ наступного складу: 33 ммоль/л тріс-ацетату (pH 7,9), 10 ммоль/л ацетату магнію, 66 ммоль/л ацетату калію, 0,1 мг/мл сироваткового альбуміну бика (BSA) чи із 2 ОД рестриктази Alw21I в буфері O^+ наступного складу: 50 ммоль/л тріс-ацетату (pH 7,5), 10 ммоль/л хлориду магнію, 100 ммоль/л хлориду натрію, 0,1 мг/мл BSA («Fermentas», Литва). Якщо в положенні гена LMP2 знаходився гуанідин, то ампліфікат, що складається з 228 пар основ, розщеплювався рестриктазою Hin6I на два фрагменти – 199 і 29 пар основ. У випадку заміни гуанідину на аденін сайт рестрикції для Hin6I втрачається, а для рестриктази Alw21I, навпаки, з'являється й утворюється два фрагменти зазначеного розміру (рис. 1).

Алельный поліморфізм гена LMP7 (Lys_{145}→Gln-поліморфізм) визначали також шляхом ампліфікацією фрагмента і наступною рестрикцією [23]. Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах була наступною: прямий (sense) – 5'-CGGACAGATCTCTGGGTGCT-3' і зворотний (antisense) – 5'-CTTCCCTACTGCCCCAAGCT-3'. Для ампліфікації брали 50–100 нг ДНК і додавали до суміші, що містить 5 мкл 5-кратного ПЛР-буфера, 3 ммоль/л сульфату магнію, 200 мкмоль/л суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль/л

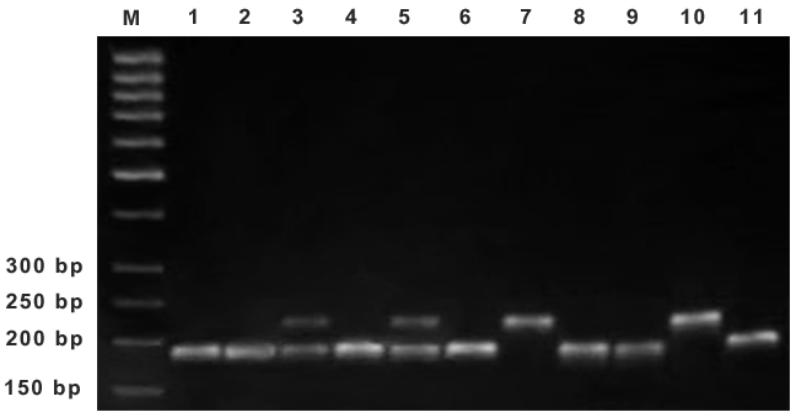

Рис. 1. Результати електрофорезу фрагмента гена LMP2 після рестрикції із використанням ферменту Hin6I. М – маркер молекулярної маси (bp –пари нуклеїнових основ), доріжки 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 відповідають Arg/Arg, 3, 5 – Arg/His, 7 і 10 – His/His -генотипам

кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази («Амплисенс», Росія). Об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Ампліфікація фрагмента гена LMP7 складалася з 38 циклів: денатурація – 94°С, 1 хв, гібридизація праймерів – 63°С, 35 с і елонгація – 74°С, 1 хв. Для визначення SNP LMP7 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°С протягом 20 год з 5 ОД рестриктази HindIII («Сибэнзим», Росія) у буфері наступного складу: 10 ммоль/л трісгідрохлориду (pH 8,5), 10 ммоль/л хлориду магнію, 100 ммоль/л хлориду натрію, 0,1 мг/мл сироваткового амбуліну бика, 1 ммоль/л дитіотреїтолу чи із 2 ОД рестриктази Mva1269I у буфері R^+. Більш розповсюджений алельний варіант гена LMP7 з аденіном (розмір ампліфікату 193 пар основ) розщеплювався рестриктазою HindIII на два фрагменти – 179 і 14 пар основ. У разі заміни аденіну на цитозин ампліфікат розщеплюється рестриктазою Mva1269I на два фрагменти зазначеного розміру.

Ампліфікати генів LMP2 і LMP7 та їх фрагменти, отримані в результаті рестрикції, розділяли в 2,5 %-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофорезу (160 В протягом 40 хв) проводили за допомогою трансілюмінатора і програмного забезпечення ViTran («Биоком», Росія).

Флюорогенні субстрати, класто-лактацистин β-лактон, солі, 7-аміно-4-метилкумарин, сапонін вироблені фірмою «Sigma» (США), синтез праймерів здійснено «Синтол» (Росія).

Отримані результати обробляли статистично з використанням програм Origin 7.0 та Excel 2000. При цьому вірогідність відмінностей визначали за критерієм t Стьюдента. Значення $P<0,05$ вважали достовірним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Трипсиноподібну активність протеасоми в ізольованих моноцитах було виміряно у 26 осіб, з яких 16 (61,5 %) мали генотип Arg/Arg, 5 – Arg/His (19,2 %) та 5 (19,2 %) – His/His при дослідженні алельного поліморфізму гена LMP2. Хімотрипсиноподібна активність протеасоми в цих клітинах була визначена у 22 осіб. Розподіл алельних варіантів гена LMP2 у них був наступним: Arg/Arg – 12 (54,6 %), Arg/His – 5 (18,2 %), His/His – 5 (18,2 %). Усі особи, в яких вимірювалася активність протеасоми, мали генотип Lys/Lys за геном LMP7. Встановлено, що активність протеасоми в моноци-

тах залежить від поліморфізму гена LMP2 (рис. 2). Так, трипсиноподібна активність протеасоми при генотипі Arg/Arg була в 1,6 раза (P=0,19) вищою, ніж при генотипі His/His та у 2 рази (P=0,03) нижчою порівняно з гетерозиготами. Відповідність між хімотрипсиноподібною активністю протеасоми та генотипом за LMP2 мала аналогічний характер. Найбільша активність спостерігалась у гетерозигот (на 29,7 % вище, ніж при генотипі Arg/Arg, P=0,43), а найменша – у гомозигот His/His (на 29,7 % менша порівняно з генотипом Arg/Arg, P=0,40). Найбільш цікавим, на нашу думку, є те, що заміна амінокислоти в субодиниці

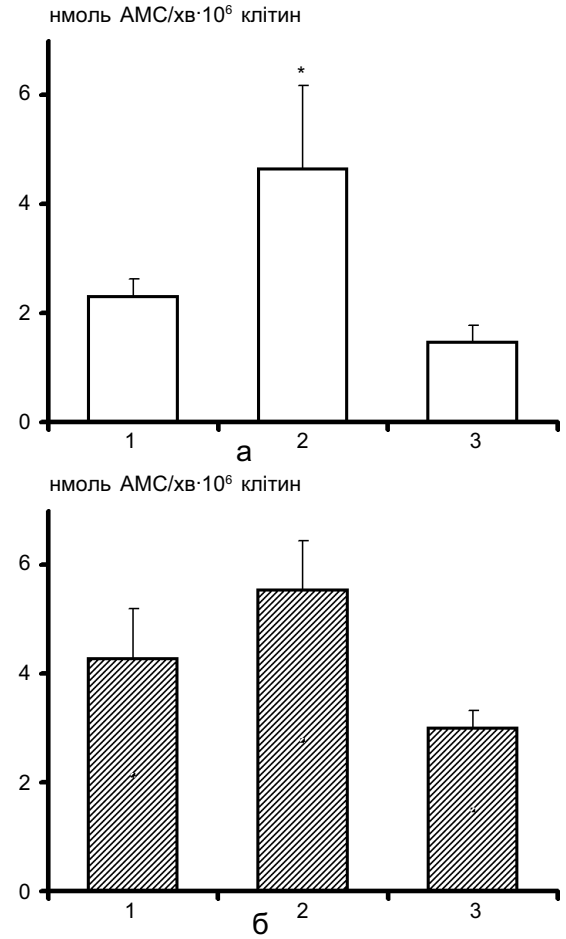

Рис. 2. Трипсиноподібна (а) та хімотрипсиноподібна (б) активність протеасоми в ізольованих моноцитах осіб із різними алельними варіантами LMP2: 1 – Arg/Arg, 2 – Arg/His, 3 – His/His. АМС – 7-аміно-4-метилкумарин

протеасоми, що забезпечує пептилдиглютамілпептидгідролазну активність, суттєво впливає на пептидазну (трипсино- та хімотрипсиноподібну) активність інших субодиниць. Це може свідчити про те, що така заміна впливає на конформацію внутрішнього кільця протеасоми і внаслідок цього змінюється здатність інших субодиниць імунопротеасоми розщеплювати відповідні субстрати. Також не виключено, що встановлені зміни активності залежать від процесів комплексації чи деградації імунопротеасоми, спричинені заміною аргініну на гістидин. За даними Kisselev і співавт. [11] специфічні інгібітори пептидилглютамілпептидгідролазного сайту ізольованої 20S-протеасоми втричі збільшують трипсиноподібну активність, однак не впливають на хімотрипсиноподібну. Одночасно субстрати β_1-субодиниці (містять залишки кислих амінокислот) за алостеричним механізмом зменшують хімотрипсиноподібну активність, а гідрофобні субстрати β_5-субодиниці внаслідок взаємодії з некаталітичними субодиницями протеасоми збільшують активність усіх пептидазних сайтів [11, 12]. Таким чином, є підстави вважати, що пептидилглютамілпептидгідролазний сайт як конформаційно, так і функціонально впливає на активність інших субодиниць. Зважаючи на те, що пептидилглютамілпептидгідролазна активність зменшується при формуванні імунопротеасоми, можна припустити, що заміна аргініну на гістидин у LMP2 при алельному поліморфізмі збільшує вказану активність, внаслідок чого зменшується трипсиноподібна активність мультикаталітичного протеїназного комплексу. Остаточно вирішити це проблематичне питання можна проаналізувавши пептидилглютамілпептидгідролазну активність в осіб з різним генотипом за LMP2. На жаль, нам не вдалося реалізувати цю ідею в нашій роботі внаслідок низької чутливості наявного флюорогенного субстрату (Leu-Leu-Glu-β-нафтиламід).

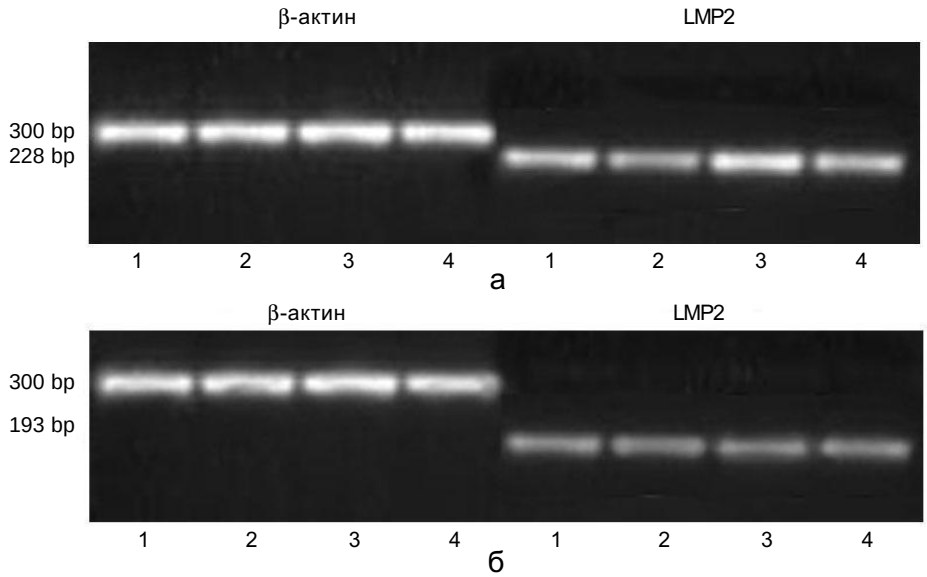

Рис. 3. Інтенсивність експресії генів β-актину і LMP2 (а) та генів β-актину і LMP7 (б) у моноцитах, ізольованих від генотипованих за LMP2 і LMP7 осіб.
На рис. 3,а доріжки 1, 2 відповідають Arg/Arg, 3 – Arg/His; 4 – His/His; на рис. 3,б доріжки 1, 3 відповідають Lys/Lys, 4 – Gln/Lys-генотипам, bp – пари нуклеїнових основ

Слід відмітити і факт найвищої активності протеасоми у гетерозигот. За цих умов у клітинах будуть утворюватись одночасно імунопротеасоми двох видів – із заміною Arg/His та без такої. Якщо припустити, що заміна дійно є патологічною та порушує функцію імунопротеасом, то в організмі виникає необхідність збільшення експресії генів, що кодують субодиниці імунопротеасоми чи конституційної протеасоми (вона також бере участь у процесі презентації пептидів у головному комплексі гістосумісності I класу). Для перевірки цієї гіпотези та для з'ясування рівня, на якому реалізується вплив зазначеного алельного поліморфізму на активність імунопротеасоми, ми провели дослідження з визначення експресії РНК LMP2 та LMP7 в ізольованих моноцитах (рис. 3). Виявилося, що суттєвих відмінностей в експресії генів зазначених субодиниць у осіб з різним генотипом немає, що не є дивним з урахуванням локалізації поліморфного сайту в екзонах генів LMP2 і LMP7. Отже, відмінності в пептидазній активності імунопротеасоми за різних алельних варіантів LMP2 не можуть бути пояснені змінами інтенсивності експресії генів імунопротеасоми. Не виключено, що при патологічних варіантах гена LMP2 змінюється експресія конституційних субодиниць протеасоми, однак для підтвердження або спростування цього припущення необхідно провести додаткові дослідження.

Внаслідок надзвичайно низької частоти алеля Gln гена LMP7 в українській популяції нам не вдалося визначити його функціональне значення, проте за цих умов ми маємо змогу більш впевнено казати про роль поліморфізму гена LMP2.

Загалом отримані результати свідчать про функціональне значення алельного поліморфізму LMP2, що знаходить вираз у змінах каталітичної активності імунопротеасоми. З огляду на те, що імунопротеасома має виняткове значення в імунній відповіді в цілому і в Т-клітинному імунітеті зокрема, ці результати створюють підгрунтя для диференційованого підходу у лікуванні хворих на аутоімунні та хронічні

вірусні захворювання. Єдиним відомим нині засобом стимуляції активності імунопротеасоми є γ-інтерферон, що збільшує експресію генів LMP2, LMP7 і LMP10. Отже, застосування фармакогенетичного підходу в інтерферонотерапії може мати великі перспективи.

V.E. Dosenko, D.A. Mikhalchuk, V.Yu. Zagoriy, N.V. Haitovich, A.A. Moibenko

ALLELIC POLYMORPHISM OF LARGE MULTIFUNCTIONAL PROTEASES AND ITS FUNCTIONAL MEANING

Proteasomal activity in isolated monocytes from subjects with different variants of large multifunctional proteases genes - LMP2 (Arg60→His allelic polymorphism) and LMP7 (Lys145→Gln allelic polymorphism) was determined. Trypsin-like activity of proteasome was 1.6-times (P=0.19) higher at Arg/Arg genotype comparing to His/His genotype, and 2-fold lower than at Arg/His genotype. The highest chymotrypsin-like activity of proteasome was observed in heterozygotes (on 29.7% higher comparing to Arg/Arg genotype, P=0.43) and lowest in homozygotes His/His (on 29.7% less comparing to Arg/Arg genotype, P=0.40). Level of RNA expression in isolated monocytes detetermined by use of RT-PCR did not differed significantly in subjects with different genotypes. Data obtained indicate that LMP2 allelic polymorphism impact peptidase activity of immunoproteasome.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv
Kyiv State University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cascio P., Hilton C., Kisselev A.F. et al. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide // EMBO J. – 2001. – **20**, №10. – P.2357–2366.
2. Craiu A., Akopian T., Goldberg A., Rock K.L. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – **94**, №20. – P.10850–10855.
3. Deng G.Y., Muir A., Maclaren N.K., She J.X. Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies // Amer. J. Hum. Genet. – 1995. – **56**. – P.528–534.
4. Dosenko V.E., Mikhalchyuk D.V., Moibenko A.A. Association between allelic variant of immunoproteasome subunits (LMP2, LMP7) and acute coronary syndrome // Abstracts of Joint 59th Harden EMBO Conf. “The ubiquitin proteasome system in health and disease” (Cirencester, 6–10 Sept., 2004). – P.15.
5. Ehring B., Meyer T.H., Eckerskorn C. et al. Effects of major–histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides // Eur. J. Biochem. – 1996. – 235. – P.404–415.
6. Gaczynska M., Goldberg A.L., Tanaka K. et al. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7 // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, №29. – P.17275–17280.
7. Gaczynska M., Rock K.L., Spies T., Goldberg A.L. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – **91**, №20. – P.9213–9217.
8. Goldberg A.L., Cascio P., Saric T., Rock K.L. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides // Mol. Immunol. – 2002. – **39**, №3–4. – P.147–164.
9. Kawaguchi Y., Ikegami H., Fukuda M. et al. Absence of association of TAP and LMP genes with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus // Life Sci. – 1994. – **54**, №26. – P.2049–2053.
10. Kisselev A.F., Akopian T.N., Castillo V., Goldberg A.L. Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown // Mol. Cell. – 1999. – **4**, №3. – P.395–402.
11. Kisselev A.F., Garcia-Calvo M., Overkleeft H.S. et al. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, №38. – P.35869–35877.
12. Kisselev A.F., Kaganovich D., Goldberg A.L. Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings // Ibid. – 2002. – **277**, №25. – P.22260–22270.
13. Kuzushita N., Sugimoto Y., Sasaki Y., Hayashi N. Involvement of TAP2 and LMP7 gene polymorphisms in HCV infection // Nippon Rinsho. – 2001. – **59**. – P.1248–1253.
14. Li J., Schuler–Thurner B., Schuler G. et al. Bipartite regulation of different components of the MHC class I antigen-processing machinery during dendritic cell maturation // Int. Immunol. – 2001. – **13**, № 12. – P.1515–1523.
15. Maksymowych W.P., Russell A.S. Polymorphism in the LMP2 gene influences the relative risk for acute anterior uveitis in unselected patients with ankylosing spondylitis // Clin. Invest. Med. – 1995. – **18**. – P.42–46.
16. Maksymowych W.P., Wessler A., Schmitt–Egenolf M. et al. Polymorphism in an HLA linked proteasome gene influences phenotypic expression of disease in HLA-B27 positive individuals // J. Rheumatol. – 1994. – **21**, №4. – P.665–669.

17. Mishto M., Bonafe M., Salvioli S. et al. Age dependent impact of LMP polymorphisms on TNFalpha-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells // Exp. Gerontol. – 2002. – **37**, №2–3. – P.301–308.
18. Mishto M., Bellavista E., Santoro A. et al. Immunoproteasome and LMP2 codon 60 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains // Abstracts of Joint 59th Harden EMBO Conf. "The ubiquitin proteasome system in health and disease"i (Cirencester, 6–10 Sept., 2004). – P. 9.
19. Nagata N., Oshida T., Yoshida N.L. et al. Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2003. – **132**, №2. – P.156–167.
20. Ovstebo R., Haug K.B.F., Lande K., Kierulf P. PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation // Clin. Chem. – 2003. – **49**, №3. – P.425–432.
21. Pryhuber K.G., Murray K.J., Donnelly P. et al. Polymorphism in the LMP2 gene influences disease susceptibility and severity in HLA-B27 associated juvenile rheumatoid arthritis // J. Rheumatol. – 1996. – **23**. – P.747–752.
22. van Endert P.M., Liblau R.S., Patel S.D. et al. Major histocompatibility complex-encoded antigen processing gene polymorphism in IDDM // Diabetes. – 1994. – **43**, №1. – P.110–117.
23. Vinasco J., Fraile A., Nieto A. et al. Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 1998. – **57**. – P.33–37.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;
Нац. мед. ун-т ім. О.О.Богомольця, Київ

Матеріал надійшов до редакції 16.06.2005